

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Ecole Doctorale Des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)

CNRS UMR 7104 – INSERM U1258 – Université de Strasbourg – Illkirch, France

THÈSE

Présentée par **Amélie Jaulin**

Soutenue publiquement le 29 Juin 2022

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**

Etude du mécanisme d'action de la MMP11 dans le cancer du sein

Thèse dirigée par : Docteur Catherine TOMASETTO (Université de Strasbourg, Strasbourg)
Docteur Nassim DALI-YOUCHEF (Université de Strasbourg, Strasbourg)

Rapporteurs externes : Docteur Erik Maquoi (Université de Liège, Liège, Belgique)
Docteur Jean-Pierre Segain (Université de Nantes, Nantes)

Examinatrice interne : Docteur Isabelle Gross (Université de Strasbourg, Strasbourg)

Examinatrice externe : Professeur Carine Pourié (Université de Lorraine, Nancy)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, le Docteur Erik Maquoi, le Docteur Jean-Pierre Segain, le Docteur Isabelle Gross et le Docteur Carine Pourié, d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse présentés dans ce manuscrit. Je remercie aussi les membres du jury d'assister à ma soutenance de thèse.

Ma thèse a été financée par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation pendant 3 ans et 4 mois puis j'ai bénéficié du soutien de l'association Seins et vie (SEVE) durant 8 mois, et de l'IGBMC pendant 9 mois. Merci à Catherine d'avoir trouvé les financements nécessaires.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Cancers du Sein à l'IGBMC, dirigé par le Docteur Catherine-Laure Tomasetto. Je remercie Catherine de m'avoir accueillie dans son équipe pendant presque 7 ans. J'ai en effet réalisé mes stages de Master 1 et Master 2 dans son équipe avant de poursuivre sur la thèse. C'est une équipe que je recommande aux futurs étudiants, vous y serez encadrés à la perfection. Catherine, je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté. Je retiendrai votre gentillesse, votre patience, votre partage de connaissances, votre pédagogie, et toutes vos corrections sans lesquelles nos rapports et nos présentations ne seraient pas ce qu'ils sont. Merci pour tout le temps que vous m'avez consacré ainsi que pour vos valeurs humaines. Nassim, je te remercie de m'avoir encadrée et d'avoir partagé ton savoir sur un sujet bien complexe, le métabolisme. Catherine et Nassim, je vous remercie pour votre soutien, je suis reconnaissante de vous avoir eu comme directeurs de thèse. Je tiens également à remercier Fabien pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide durant ces années de thèse.

Je voudrais aussi remercier tous les autres membres de l'équipe, sans qui rien n'aurait été pareil durant toutes ces années. Corinne (alias Coco), au-delà de tous tes précieux conseils techniques, j'ai surtout adoré toutes nos discussions et surtout tous nos fous rires (vive la rigologie !), ne change surtout pas et reste aussi gentille que tu l'es déjà. Arthur, merci pour ta bienveillance, ton aide et tes conseils, on a bien parlé et bien ri dans ce box 3064, surtout lorsqu'Arlie était de la partie. De plus, je tiens à m'excuser auprès de toi et Corinne pour les moments où je chantais très faux, et où vous me parliez alors que mes appareils étaient éteints. Mehdi (ou Zouzouille, principal actionnaire de La Peau d'Vache), merci d'avoir squatté « ma chaise de bureau », merci pour tes massages, merci de m'avoir fait autant rire, et pour te montrer toute ma gratitude, je te lègue enfin mon « pschitt » rose. Julie, toujours de bonne humeur même quand tu te casses la figure (il fallait bien que j'en parle), je me souviendrai de nos discussions et surtout de nos bons moments passés en rando-apéro, j'espère que l'on en fera très vite.

Sébastien, je te remercie d'avoir été mon co-équipier MMP11, ton expertise en radiologie m'aura été d'une précieuse aide, et surtout merci pour tout le chocolat que tu m'as ramené. Sophie, je te remercie d'avoir le même humour que moi (je confirme que tu as été un très bon public) et je te remercie aussi pour nos discussions sur notre passion commune, la bouffe et le chocolat. Catherine, même si cela fait peu de temps que tu es parmi nous, j'ai beaucoup apprécié nos discussions du soir. Merci à tous, pour tous ces moments passés au labo mais également en dehors du labo, j'espère sincèrement que l'on gardera contact et que nous aurons l'occasion de nous revoir. En plus d'être une équipe du tonnerre qui a fait régner une superbe ambiance de travail, je vous remercie également de m'avoir supportée (moi et mes oreilles bouchées ^^).

Je tenais également à remercier les « anciens » de l'équipe. Laetitia, alias casse-tout, merci d'avoir été ma voisine de box, et surtout merci pour tous les bons moments passés, tu es une très belle personne et j'espère vraiment garder contact avec toi encore longtemps. Thomas, merci pour tous tes croche-pieds, et merci surtout d'avoir animé comme il se doit notre box, tu m'auras beaucoup fait rire. Thiên-Nga, merci de m'avoir fait découvrir les bons restos avec Laetitia, et merci pour toutes nos discussions. Léa, merci pour ta bonne humeur et surtout pour ton aide à mes débuts au labo. Massimo, je ne te remercierai jamais assez d'avoir oublié de me remercier. Bing, merci pour toutes les connaissances théoriques et techniques que tu m'as apporté sur notre sujet commun. Je termine par Duygu, Mélanie et Lucile (bientôt une ancienne !), même si vous ne faites pas partie de l'équipe, vous êtes de très belles rencontres bien que tardives, merci pour tout votre soutien et tous les moments passés ensemble.

Je remercie également tous les gens avec qui j'ai pu collaborer durant ma thèse. Un merci tout particulier à mes collègues de l'animalerie (Alex, William, Michael, Sylvie, Sabine, ...), où j'y ai passé une bonne partie de mon temps, vous m'avez beaucoup aidée et j'ai apprécié échanger avec chacun de vous. Sylvie merci de t'être si bien occupée de mes souris. Alex, merci pour ton aide précieuse pour les longues manips d'injection durant lesquelles on a bien discuté et bien ri. Merci également à l'ICS (Ghina, Emilie,...), au service de culture cellulaire, au service d'histopathologie et à la plateforme de microscopie. Delphine, merci aussi à toi pour ton expertise sur le tissu adipeux et le muscle, c'était un plaisir de travailler avec toi. Enfin, merci à l'ensemble des personnes de l'institut avec qui j'ai pu échanger, je ne peux malheureusement pas tous vous citer.

Pour terminer, je tenais également à remercier toute ma famille, et plus particulièrement mon papa, ma maman et mon frère, Manu ! Merci de m'avoir suivie et soutenue dans tout ce que j'ai entrepris au cours de ma vie. Manu, courage pour ta thèse et deviens qui tu es ! Je n'oublie pas non plus mes chers amis de Vendée, merci à vous pour tout ce que vous m'avez

apporté, et je ne vous oublie pas même si j'ai déserté la Vendée depuis presque 7 ans maintenant.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	I
-------------------------------------	----------

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	IV
---	-----------

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	VI
--	-----------

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN	1
---	----------

I. EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS DU SEIN	1
--	---

A. Incidence et mortalité.....	1
--------------------------------	---

B. Etiologie/facteurs de risque	1
---------------------------------------	---

1. Les facteurs génétiques	1
----------------------------------	---

2. Les facteurs hormonaux	3
---------------------------------	---

3. Les facteurs environnementaux et le mode de vie	5
--	---

II. ANATOMO-PHYSIO-PATHOLOGIE DU SEIN.....	7
--	---

A. Anatomophysiologie du sein : Anatomie du sein normal.....	7
--	---

1. Anatomie de la glande mammaire.....	7
--	---

2. Organisation cellulaire de la glande mammaire	7
--	---

3. Développement du sein au cours de la vie	8
---	---

a) De la vie embryonnaire jusqu'à la puberté.....	8
---	---

b) A la puberté	9
-----------------------	---

c) Au cours de la grossesse et à l'accouchement.....	9
--	---

d) Au cours de la lactation.....	10
----------------------------------	----

e) A la ménopause	10
-------------------------	----

B. Anatomopathologie du sein.....	10
-----------------------------------	----

1. Classification moléculaire	10
-------------------------------------	----

2. Classification histologique	11
--------------------------------------	----

a) Les carcinomes non invasifs ou <i>in situ</i>	12
--	----

b) Les carcinomes invasifs ou infiltrants	12
---	----

c) Les formes rares de carcinome	12
--	----

III. LA BIOLOGIE DU CANCER	13
----------------------------------	----

A. Histoire naturelle du cancer du sein	13
---	----

B.	<i>De la cellule normale à la cellule cancéreuse</i>	14
C.	<i>L'orchestration du développement tumoral</i>	14
1.	Modifications génétiques et épigénétiques	14
a)	Modifications génétiques	15
b)	Modifications épigénétiques	15
2.	Le métabolisme énergétique ou switch énergétique	15
3.	L'influence du microenvironnement	15
a)	Les cellules souches cancéreuses (CSC)	16
b)	Les fibroblastes associés au cancer (CAF)	16
c)	Adipocytes associés au cancer (CAA)	16
d)	Les cellules immunitaires inflammatoires	17
e)	Les cellules endothéliales (artères, veines et capillaires)	17
IV.	LES MODELES PRECLINIQUES DU CANCER DU SEIN	17
CHAPITRE 2 : LA MMP11		20
I.	DESCRIPTION DE LA MMP11	20
A.	<i>Les MMP</i>	20
B.	<i>Découverte de la MMP11</i>	21
C.	<i>Organisation génomique de la MMP11</i>	21
D.	<i>Régulation de l'expression du gène de la MMP11</i>	22
E.	<i>Structure de la protéine MMP11</i>	22
F.	<i>Structure cristallographique de la MMP11</i>	23
G.	<i>Processus de synthèse et d'activation de la MMP11</i>	23
H.	<i>Substrats de la MMP11</i>	23
I.	<i>Rôle physiologique de la MMP11</i>	24
1.	Développement embryonnaire	24
2.	Développement de la glande mammaire	25
3.	Adipogenèse	25
4.	Métabolisme	26
II.	MMP11 ET CANCER	26
A.	<i>MMP11 et cancer du sein</i>	26
1.	Implications biologiques de MMP11 dans le cancer du sein invasif	26
2.	La MMP11 est un marqueur de mauvais pronostic	27
3.	La MMP11 est un marqueur prédictif du risque de récurrence	28

B. <i>MMP11 et autres cancers</i>	28
C. <i>MMP11 et autres maladies</i>	28

RESULTATS

I. OBJECTIFS DE LA THESE	30
II. ETUDE <i>IN VITRO</i> DU MECANISME MOLECULAIRE D'ACTION DE LA MMP11	30
A. <i>Interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP2</i>	30
1. Contexte	30
2. Vérification des activités catalytiques des MMP11 recombinantes humaine et murine.....	31
3. Mesure de l'activité catalytique de la MMP11 recombinante murine sur la pro-MMP2 recombinante humaine	32
a) Essai de clivage <i>in vitro</i> et analyse par zymographie.....	32
b) Essai de clivage <i>in vitro</i> et analyse sur gel SDS-PAGE.....	33
4. Production de la MMP11 humaine dans un système de mammifère	34
B. <i>Rôle pathologique de l'interaction fonctionnelle MMP11-MMP2</i>	36
1. Contexte	36
2. Impact de la MMP2 sur la migration/invasion des cellules cancéreuses	37
III. ETUDE <i>IN VIVO</i> DE L'IMPACT DE LA MMP11 SUR LE CANCER DU SEIN	38
A. <i>Impact de la MMP11 sur le métabolisme tumoral - Publication Cancers</i>	38
1. Contexte	38
2. Manuscrit.....	38
B. <i>Impact de la MMP11 adipocytaire sur la croissance tumorale</i>	40
1. Contexte	40
2. Description de la construction aP2-MMP11	41
3. Validation de la construction aP2-MMP11 <i>in vitro</i>	41
4. Description et validation de la lignée transgénique aP2-MMP11.....	42
5. Impact de la MMP11 sur la croissance tumorale mammaire	42

CONCLUSION, DISCUSSION, PERSPECTIVES

I. LA MMP11 SEMBLE IMPLIQUEE DANS UNE INTERACTION FONCTIONNELLE AVEC LA MMP2.....	46
A. <i>La production de la MMP11 humaine active est un enjeu majeur</i>	46
B. <i>La pro-MMP2 possède un profil de clivage complexe</i>	48
II. LA MMP11 JOUE UN ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DU CANCER DU SEIN	49
A. <i>L'impact direct de la MMP11 sur IGFBP1 reste à confirmer in vivo</i>	49

B. <i>La lignée cancéreuse mammaire E0771 est controversée</i>	51
C. <i>Le mode de suivi des tumeurs n'est pas assez précis et/ou biaisé</i>	52
D. <i>L'injection des cellules cancéreuses dans le tissu adipeux n'est pas adaptée</i>	53

MATERIELS ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE	55
II. SDS-PAGE ET ANALYSE PAR IMMUNOBLOT OU COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE .	55
III. MESURE DE L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE LA MMP11 RECOMBINANTE MURINE SUR LA PRO-MMP2 RECOMBINANTE HUMAINE	56
A. <i>Etablissement des protéines recombinantes</i>	56
B. <i>Analyse de l'activité gélatinolytique de la MMP2 par SDS-Page en présence de gélatine</i>	57
C. <i>Analyse de l'activité protéolytique de la MMP11 sur la MMP2 et sur IGFBP1 par SDS-Page coloré au bleu de Coomassie</i>	57
IV. PRODUCTION DE LA MMP11 HUMAINE RECOMBINANTE DANS UN SYSTEME DE MAMMIFERE	58
A. <i>Transfections transitoires des cellules de mammifère</i>	58
B. <i>Concentration du milieu conditionné au PEG ou au sulfate d'ammonium</i>	58
1. Concentration au PEG	58
2. Concentration au sulfate d'ammonium	59
C. <i>Test indirect de clivage de l'α1-Pi (α1-proteinase inhibitor)</i>	59
V. ETUDE DE LA MIGRATION CELLULAIRE DEPENDANTE DE LA MMP2 CHEZ LES U87MG	60
A. <i>Etablissement des lignées stables U87MG</i>	60
B. <i>Test de migration par blessure</i>	60
VI. CARACTERISATION DU MODELE AP2-MMP11 ET ETUDE DE L'IMPACT DE LA MMP11 ADIPOCYTAIRE SUR LA CROISSANCE TUMORALE.....	61
A. <i>Génération et génotypage des souris</i>	61
B. <i>Transfection transitoire de la construction aP2-MMP11 et différenciation des cellules 3T3-L1</i>	62
C. <i>Analyse de la structure des adipocytes par coloration à l'hématoxyline-éosine des sections histologiques de tissus adipeux blancs de la glande mammaire</i>	62
D. <i>Suivi cinétique de la croissance tumorale</i>	62
E. <i>Extraction protéique dans les tissus adipeux de souris</i>	63

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	64
----------------------------------	----

LISTE DES ABBREVIATIONS

α 1-PI : Alpha1-proteinase inhibitor	DES : Diéthylsilbestrol
α CT : Alpha-chymotrypsine	DMEM(/F12) : Dulbecco's modified Eagle's medium(/Nutrient mixture F-12)
ADN : Acide désoxyribonucléique	dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
Akt(2) : Protein kinase B	<i>E. Coli</i> : <i>Escherichia coli</i>
AMP : Assistance Médicale à la Procréation	EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
AP1 : Activator protein 1	EGF : Epidermal growth factor
aP2 : Adipocyte protein 2	EGFR : Epidermal growth factor receptor
APS : Ammonium persulfate	EMT : Epithelial to mesenchymal transition
ARN : Acide ribonucléique	FABP4 : Fatty acid-binding protein 4
ARNm : Acide ribonucléique messenger	FCS : Fetal calf serum
ATCC : American type culture collection	FGF2 : Fibroblast growth factor 2
BAT : Brown Adipose Tissue	GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
BB-94 : Batimastat	GOF : Gain of function
BCA : Bicinchonic acid assay	GPI : Glycosylphosphatidylinositol
BLG : β -lactoglobulin	HCl : Acide chlorhydrique
BRCA1 : Breast cancer 1	HeLa : Initiales de Henrietta Lacks
BRCA2 : Breast cancer 2	HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
BSA : Bovine serum albumin	HER2 : Human epidermal growth factor receptor 2 (aussi appelé ErbB2 ou EGFR2)
C3 : Complement component 3	HGF : Hepatocyte growth factor
C-terminale : Carboxy-terminale	HIF(1-2) : Hypoxia Inducible Factor
CAA : Cancer-associated adipocyte	hMMP11(/FL) : human MMP11(/full-length)
CaCl ₂ : Chlorure de calcium	hMMP14(/Cat) : human MMP14(/catalytic domain)
CAF : Cancer-associated fibroblast	hPro-MMP2 : human Pro-MMP2
CCL(2-5) : C-C motif chemokine ligand	HRV-3C : Human rhinovirus 3C
CEBP(β) : CCAAT/enhancer-binding protein	IDC : Invasive ductal carcinoma
CHO : Chinese hamster ovary	IGBMC : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CMV : Cytomégalovirus	IGF1 : Insulin-like growth factor 1
CO ₂ : Dioxyde de carbone	IGF1R : Insulin-like growth factor 1 receptor
CSC : Cellule souche cancéreuse	
CSM : Cellule souche mésenchymateuse	
Ctrl : Contrôle	
CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12	
DCIS : Ductal carcinoma <i>in situ</i>	
DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane	

IGFBP(1-2) : IGF-binding protein	(NH ₄) ₂ SO ₄ : Sulfate d'ammonium
IL(1-6) : Interleukin	NK : Natural killer
IMC : Indice de masse corporelle	P3C : Protease 3C
INCa : Institut national du cancer	PAM50 : Prediction analysis of microarray 50
IRM : Imagerie par résonance magnétique	PBS : Phosphate buffered saline
kb : kilobase	PCB : Polychlorobiphényles
kDa : kilodalton	PCR : Polymerase chain reaction
KM : Kaplan Meier	PEG : Polyéthylène glycol
KO : Knock-out	pH : potentiel Hydrogène
LFS : Li-Fraumeni syndrome	PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
LOF : Loss of function	PPAR : Peroxisome proliferator-activated
LTR : Long terminal repeat	receptor
MCF7 : Michigan cancer foundation 7	PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
MCF10A : Michigan cancer foundation 10A	PyMT : Polyoma virus middle T antigen
MDA-MB231 : M.D. Anderson - Metastatic	qsp : quantité suffisante pour
Breast 231	RAR : Retinoic acid receptor
MDSC : Myeloid-derived suppressor cells	RARE : Retinoic acid response element
MEC : Matrice extracellulaire	RE : Récepteur aux œstrogènes
MEF : Mouse embryonic fibroblast	ROI : Region of interest
MEM : Eagle's minimal essential medium	RP : Récepteur à la progestérone
MgCl ₂ : Chlorure de magnésium	rpm : rotation par minute
mgWAT : Mammary gland white adipose	RT-qPCR : Reverse transcription –
tissue	Quantitative polymerase chain reaction
MMP : Matrix metalloproteinase	SATB1 : Special AT-rich sequence-binding
MMP2 : Matrix metalloproteinase 2	protein-1
MMP11 : Matrix metalloproteinase 11	SDS : Sodium dodecyl sulfate
MMP14 : Matrix metalloproteinase 14	SDS-Page : Sodium dodecyl sulfate-
MMTV : Mouse mammary tumor virus	Polyacrylamide gel electrophoresis
mMMP11 : mouse MMP11	shRNA : Small hairpin RNA
mMMP11/Cat : mouse MMP11/catalytic	SNP : Single nucleotide polymorphism
domain	SV40 : Simian virus 40
mMMP11/Cat E220A : mouse	T3 : Triiodothyronine
MMP11/catalytic domain E220A	TEB : Terminal end bud
MT : Metallothionein	TEMED : Tétraméthyléthylènediamine
N-terminale : Amino-terminale	Tg : Transgénique
NaCl : Chlorure de Sodium	THS : Traitement hormonal substitutif
NCS : Newborn calf serum	TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase

TNF : Tumor necrosis factor

TP53 : Tumor protein 53

TPA : Tissue plasminogen activator

TRE : Thyroid hormone response elements

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

Tris HCl : Tris hydrochloride

U87MG : Uppsala 87 Malignant Glioma

UPR^{mt} : Mitochondrial unfolded protein
response

UTR : Untranslated transcribed region

VEGF : Vascular endothelial growth factor

WAP : Whey acidic protein

WT : Wild type, sauvage

ZnCl₂ : Chlorure de zinc

Å : ångström

® : Registered

™ : Trademark

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Rappels bibliographiques

Tableaux

Tableau I1 : Caractéristiques des gènes de prédisposition au cancer du sein

Tableau I2 : Classification moléculaire des cancers du sein

Tableau I3 : Avantages, limites et recommandations pour chaque modèle préclinique de cancer du sein

Figures

Figure I1 : Le cancer du sein en chiffres : Incidence et mortalité en France et dans le monde

Figure I2 : Anatomophysiologie du sein normal

Figure I3 : Développement embryologique normal de la glande mammaire humaine

Figure I4 : Evolution de la glande mammaire murine au cours de la vie

Figure I5 : Classification histologique des cancers du sein : Représentation schématique de la transition du stade *in situ* au stade invasif

Figure I6 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses

Figure I7 : Les différents types cellulaires du microenvironnement tumoral dans le cancer du sein

Figure I8 : Organisation structurale des MMP

Figure I9 : Caractérisation de la MMP11 (stromélysine-3) humaine

Figure I10 : Processus de synthèse et d'activation de la MMP11

Figure I11 : Les substrats de la MMP11

Figure I12 : Impact de la MMP11 lors du développement embryonnaire murin

Figure I13 : Impact de la MMP11 dans le développement de la glande mammaire murine

Figure I14 : Fonction négative de la MMP11 sur l'adipogenèse

Figure I15 : Relation entre la dédifférenciation adipocytaire et l'expression de la MMP11 dans un cancer du sein invasif

Figure I16 : La MMP11 (ST3) favorise la croissance tumorale

Figure I17 : La MMP11 est un marqueur de mauvais pronostic

Résultats

Figure R1 : Interaction fonctionnelle entre MMP11-MMP14 et MMP14-MMP2

Figure R2 : Etablissement des protéines recombinantes utilisées pour l'étude *in vitro* de l'interaction fonctionnelle MMP11- MMP2

Figure R3 : Mesure de l'activité catalytique de la MMP11 recombinante murine sur la pro-MMP2 recombinante humaine

Figure R4 : Production de la MMP11 humaine mature et active dans un système de mammifère (concentration du milieu conditionné au PEG)

Figure R5 : Production de la MMP11 humaine mature et active dans les cellules HeLa (concentration du milieu conditionné au sulfate d'ammonium)

Figure R6 : Impact de la MMP2 sur la migration des cellules U87MG

Figure R7 : Etablissement des modèles de souris constitutifs (GOF/LOF) pour la MMP11 croisés avec le modèle murin génétique de cancer du sein (MMTV-PyMT)

Figure R8 : Mesure de l'activité catalytique de la MMP11 recombinante murine sur IGFBP1

Figure R9 : Etablissement des modèles murins d'inactivation conditionnelle (MMP11-/-::aP2-Cre) et de surexpression tissu-spécifique (aP2-MMP11) de la MMP11

Figure R10 : Validation de la construction aP2-MMP11 *in vitro* et de la lignée transgénique aP2-MMP11

Figure R11 : Expérience pilote d'optimisation de l'analyse de l'impact de la MMP11 sur la croissance tumorale

Figure R12 : Analyse de l'impact de la MMP11 sur la croissance tumorale

Discussion

Figure D1 : Etude *in vitro* du mécanisme moléculaire d'action de la MMP11

Figure D2 : Etude *in vivo* de l'impact de la MMP11 sur le cancer du sein

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications

- Dali-Youcef N, Vix M, Costantino F, El-Saghire H, Lhermitte B, Callari C, D'Agostino J, Perretta S, Paveliu S, Gualtierotti M, Dumeny E, Oudot MA, Jaulin A, Dembélé D, Zeisel MB, Tomasetto C, Baumert TF, Doffoël M. Interleukin-32 Contributes to Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Hepatol Commun*. 2019 Jul 19;3(9):1205-1220.

- Tan B[§], Jaulin A[§], Bund C, Outilaft H, Wendling C, Chenard MP, Alpy F, Cicek AE, Namer IJ, Tomasetto C, Dali-Youcef N. Matrix Metalloproteinase-11 Promotes Early Mouse Mammary Gland Tumor Growth through Metabolic Reprogramming and Increased IGF1/AKT/FoxO1 Signaling Pathway, Enhanced ER Stress and Alteration in Mitochondrial UPR. *Cancers (Basel)*. 2020 Aug 20;12(9):2357.

§ Ces auteurs ont contribué à parts égales à ce travail.

- Jaulin A, Molière S, Tomasetto C, Dali-Youcef N. Metabolic Functions Of Matrix Metalloproteinases And Their Inhibitors In Health And Disease. (Revue en cours de rédaction)

Communications orales

- Matrix Metalloproteinase-11 favors MMTV-PyMT Mouse Mammary Tumor Progression. Tan B, Jaulin A, Alpy F, Rio MC, Dali-Youcef N, Tomasetto C. 20th World Congress of Senologic International Society on Breast Healthcare, Workshop on fundamental research in breast cancer, 6 Décembre 2018, Strasbourg, France. (Congrès international)

- Study of the mechanism of action of MMP11 (matrix metalloproteinase 11) in breast cancer. Jaulin A, Molière S, Tan B, Dali-Youcef N, Tomasetto C. Retraite du département Génomique Fonctionnelle et Cancer de l'IGBMC (FGC retreat), 7 décembre 2021, Illkirch, France.

Communications par poster

- Matrix Metalloproteinase-11 Favors MMTV-PyMT Mouse Mammary Tumor Progression. Tan B, Jaulin A, Alpy F, Rio MC, Dali-Youcef N, Tomasetto C. 19ème Journée Scientifique Régionale de la Ligue contre le cancer, 9 Novembre 2018, Illkirch, France.

- Matrix Metalloproteinase-11 Favors MMTV-PyMT Mouse Mammary Tumor Progression. Tan B, Jaulin A, Alpy F, Rio MC, Dali-Youcef N, Tomasetto C. Retraite du département Génomique Fonctionnelle et Cancer de l'IGBMC (FGC retreat), 7-8 Octobre 2019, La Petite Pierre, France.

- Matrix Metalloproteinase-11 favors MMTV-PyMT Mouse Mammary Tumor Progression. Tan B, Jaulin A, Alpy F, Rio MC, Dali-Youcef N, Tomasetto C. 20th World Congress of Senologic International Society on Breast Healthcare, Workshop on fundamental research in breast cancer, 6 Décembre 2018, Strasbourg, France. (Congrès international)

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1 : LE CANCER DU SEIN

I. Epidémiologie des cancers du sein

A. Incidence et mortalité

En France, sur 177 400 nouveaux cas de cancers détectés, le cancer du sein est la cause la plus fréquente de décès chez la femme avec 58 459 nouveaux cas et 12 146 décès, en 2018 (Figure I1A) (Defossez et al., 2019). Entre 1980 et 2005, l'incidence du cancer du sein a doublé puis semble s'être stabilisée et le taux de mortalité baisse légèrement depuis 1990 grâce aux progrès thérapeutiques, au diagnostic plus précoce encouragé par les campagnes de sensibilisation et de dépistage organisé depuis 2004, et grâce à une meilleure prise en charge des patientes (Figure I1B) (Daubisse-Marliac et al., 2011; Fahad Ullah, 2019). Le taux de survie à 5 ans est de 87 % pour les femmes diagnostiquées entre 2005 et 2010 (Cowppli-Bony et al., 2017) et cette survie est optimisée si le cancer du sein est détecté à un stade précoce (Cronin et al., 2018; Defossez et al., 2019). A l'échelle mondiale, le cancer du sein représente 11,7 % des cancers avec 2 261 419 millions nouveaux cas et 684 996 décès en 2020 (Figure I1C) (Global Cancer Observatory, 2020). Le cancer du sein chez l'homme représente 1 % des cas de cancers du sein dans le monde (Gucalp et al., 2019).

B. Etiologie/facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque existent et interagissent entre eux ce qui rend l'étude du cancer du sein complexe. Les facteurs de risque majeurs sont le sexe et l'âge étant donné que 99 % des cancers du sein touchent les femmes et 80 % de ces cancers se développent à partir de 50 ans (Defossez et al., 2019). Les autres facteurs majeurs qui influencent l'apparition du cancer du sein sont les prédispositions génétiques au cancer, les facteurs hormonaux et histologiques ainsi que le mode de vie (Key et al., 2001; Sancho-Garnier and Colonna, 2019; (World Cancer Research Fund International, 2017).

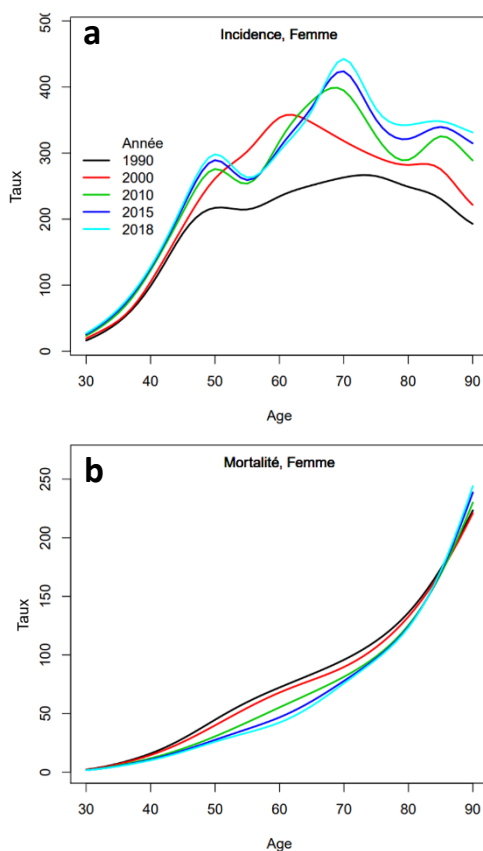
1. Les facteurs génétiques

Les antécédents familiaux de cancers du sein au premier degré doublent le risque de développer un cancer puis ce risque diminue avec des antécédents connus au deuxième degré (Pharoah et al., 1997). Parmi ces antécédents familiaux de cancers du sein, seulement 5 à 10 % des cancers peuvent être héréditaires, autrement dit il existe un (ou plusieurs) gène(s) de

A

Année	Femme			
	Cas	TSM Incidence	Décès	TSM Mortalité
1990	29970	72.8	10172	20.2
1991	30968	74.4	10321	20.2
1992	31987	75.9	10461	20.2
1993	32990	77.3	10582	20.2
1994	33943	78.6	10687	20.1
1995	34835	79.8	10774	20.0
1996	35763	81.0	10837	19.8
1997	36873	82.6	10883	19.6
1998	38292	84.9	10918	19.3
1999	40005	87.7	10952	19.1
2000	41882	90.7	10999	18.8
2001	43712	93.3	11049	18.5
2002	45318	95.3	11099	18.3
2003	46634	96.5	11137	18.0
2004	47688	97.1	11202	17.7
2005	48468	97.0	11290	17.4
2006	48911	96.5	11365	17.1
2007	49183	95.7	11434	16.8
2008	49514	95.1	11503	16.5
2009	50036	95.0	11567	16.2
2010	50755	95.2	11637	16.0
2011	51647	95.6	11709	15.7
2012	52621	96.2	11780	15.4
2013	53640	96.7	11855	15.2
2014	54677	97.4	11948	14.9
2015	55698	98.0	12025	14.7
2016	56714	98.7	12093	14.5
2017	57726	99.3	12163	14.2
2018	58459	99.9	12146	14.0

B



C

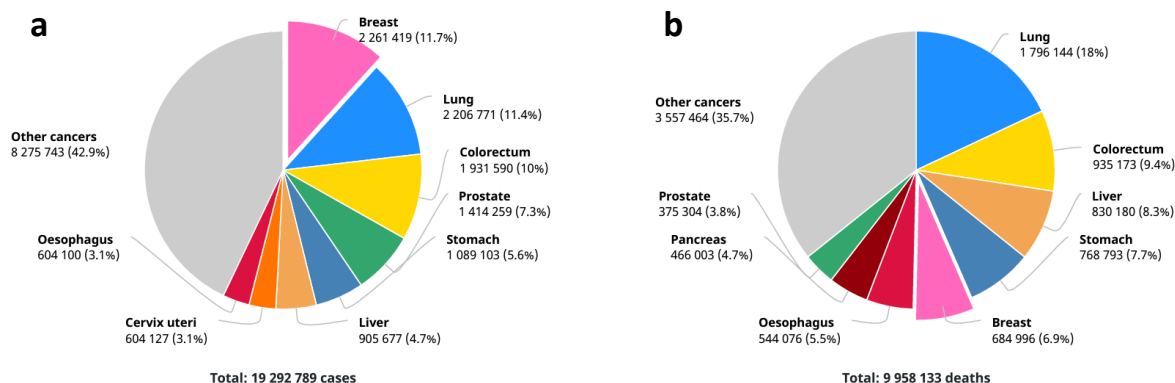


Figure I1 : Le cancer du sein en chiffres : Incidence et mortalité en France et dans le monde

A-B. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein en France chez la femme entre 1990 et 2018 : A. Le nombre de cas et de décès sont standardisés selon la population mondiale (TSM : Taux Standardisés Monde) et selon l'année. B. Le taux de cancer du sein (a) et le taux de mortalité (b) sont représentés en fonction de l'âge pour les années 1990, 2000, 2010, 2015 et 2018 (Defossez et al., 2019).

C. Incidence (a) et mortalité (b) par cancer du sein dans le monde pour les deux sexes, tous âges confondus, en 2020 (Global Cancer Observatory, 2020).

susceptibilité au cancer du sein dans la famille ([Tableau I1](#)) (de Jong et al., 2002; Newman et al., 1988). Dans 65 et 90 % des cas, les gènes incriminés sont les gènes *BRCA1* (Breast cancer 1) et *BRCA2* (Breast cancer 2), mais il existe environ 30 gènes qui sont connus pour être impliqués dans les cancers du sein héréditaires lorsqu'ils sont mutés. (Apostolou and Fostira, 2013; Collins and Politopoulos, 2011; Gage et al., 2012; van der Groep et al., 2011; Tan et al., 2008).

Les patientes avec des mutations germinales des gènes *BRCA1* ou *BRCA2* possèdent des risques élevés de cancers du sein, et cancers de l'ovaire.

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont respectivement situés sur les chromosomes 17q21 et 13q12-q13 (Ford et al., 1994; Hall et al., 1990; Wooster et al., 1995). Ce sont des gènes suppresseurs de tumeurs (Daly et al., 2021) impliqués dans la recombinaison homologue, un mécanisme essentiel de réparation de l'ADN, dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la transcription en réponse au stress cellulaire (Collins and Politopoulos, 2011). Les mutations pathogènes de *BRCA1/2* sont associées au développement précoce du cancer du sein (Daly et al., 2021). Dans 80 % des cas, une mutation du gène *BRCA1* est associée à des tumeurs agressives de haut grade, de mauvais pronostic et avec un phénotype de type triple négatif, mais seulement 7 à 16 % des tumeurs de type triple-négatif ont la mutation *BRCA1*. (Daly et al., 2021; Shannon and Chittenden, 2012). Une mutation du gène *BRCA2* est souvent associée à un cancer de haut grade, et les caractéristiques des tumeurs *BRCA2* sont plus diffuses mais les tumeurs ont un phénotype luminal de type RE+ et RP+. A 80 ans, le risque cumulé de cancer du sein est de 72 % et 69 % pour *BRCA1* et *BRCA2* respectivement (Kuchenbaecker et al., 2017). Le risque cumulé moyen de développer un cancer du sein controlatéral est estimé à 83 % et 62 % chez les femmes porteuses des mutations *BRCA1* et *BRCA2* respectivement (Graeser et al., 2009; Mavaddat et al., 2013; Metcalfe et al., 2011).

Les patientes avec des mutations germinales des gènes *TP53* et *PTEN* possèdent également des risques très élevés de développer un cancer.

Le gène *TP53* est localisé sur le chromosome 17 (Lane, 1992; Levine, 1997). Les mutations germinales du gène *TP53* prédisposent au syndrome de Li-Fraumeni (LFS) qui est un trouble héréditaire de prédisposition au cancer dans différents tissus (cancers du sein pré-ménopausiques, ostéosarcomes, leucémies, tumeurs cérébrales et adénocorticales, cancers de la peau, du colon ou du pancréas) chez les enfants et les jeunes adultes (Guha and Malkin, 2017). Ce syndrome est responsable de 1 % des cancers du sein (Shannon and Chittenden, 2012). *TP53* est un gène suppresseur de tumeurs qui code pour la protéine p53 et qui est un gène clé du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose. Lorsqu'il est muté, il confère un risque

Gènes	Localisation chromosomique	Risque de cancer du sein	Syndromes associés	Fonction(s)
<i>Gènes avec des mutations à haute pénétrance</i>				
BRCA1	17q21	Elevé	Syndromes héréditaires du cancer du sein et des ovaires	Gardien de l'intégrité du génome (Réparation ADN)
BRCA2	13q12.3	Elevé		
TP53	17q13.1	Elevé	Syndrome de Li-Fraumeni	Protection contre la réplication de l'ADN endommagé (Réparation ADN ou apoptose)
PTEN	10q23.3	Intermédiaire	Syndrome de Cowden	Régulation de l'arrêt du cycle cellulaire et induction de l'apoptose
STK11	19p13.3	Intermédiaire	Syndrome de Peutz-Jeghers	Régulateur de l'apoptose
CDH1	16q22.1	Intermédiaire	Syndrome du cancer gastrique héréditaire de type diffus	Adhérence cellulaire
<i>Gènes avec des mutations à pénétrance modérée</i>				
ATM	11q22.3	Intermédiaire	Syndrome de Louis-Bar	Senseur des cassures double-brin Réparation ADN
CHEK2	22q12.1	Intermédiaire	Syndrome de Lynch Li-Fraumeni 2 syndrome ?	Contrôle du cycle cellulaire Réparation ADN
PALB2	16p12	Intermédiaire	Anémie de Fanconi	Réparation ADN

Tableau I1 : Caractéristiques des gènes de prédisposition au cancer du sein (Adapté de Collins et Politopoulos, 2011/Vogelstein and Kinzler, 2004/Jong et al., 2002/Apostolou and Fostira, 2013/Gage et al., 2012/van der Groep et al., 2011/Tan et al., 2008)

de développer un cancer de près de 100 % à l'âge de 70 ans (Daly et al., 2021; Mai et al., 2016). Pour prendre en charge les patients porteurs du LFS, il est notamment recommandé de pratiquer l'autopalpation ainsi qu'une surveillance par IRM (Daly et al., 2021).

Le gène *PTEN* est localisé sur le chromosome 10q23 (Maehama and Dixon, 1999). Des mutations germinales de *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog) sont présentes dans la grande majorité des patients atteints du syndrome de Cowden, qui est également un syndrome de prédisposition héréditaire aux cancers (Mester and Eng, 2015). Il se caractérise par l'apparition d'hamartomes (malformations tissulaires) de la peau et des muqueuses (Molière and Mathelin, 2020). Ce syndrome est associé à un risque élevé de développer un cancer du sein. Les autres cancers possibles sont ceux de la thyroïde, de l'utérus, du colon et du rein (Pilarski et al., 2013). Des problèmes neurologiques et développementaux peuvent également être observés (Shannon and Chittenden, 2012). *PTEN* est un gène suppresseur de tumeurs impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et de la croissance cellulaire.

Ces gènes, et bien d'autres, étant connus pour être associés à un risque élevé de développer un cancer du sein, des recommandations de prévention ou de dépistage des personnes porteuses de mutations de ces gènes existent. Parmi ces recommandations, il est fortement conseillé de réaliser une surveillance annuelle par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou par mammographie, bien que cette dernière soit moins sensible et à éviter notamment dans le cas des patientes porteuses des mutations *BRAC1/2* du fait de la potentielle radiosensibilité des femmes porteuses de ces mutations (Drooger et al., 2015; Friedenson, 2000). Il peut également être proposé à la patiente de réaliser une mastectomie bilatérale totale. La chimioprévention est aussi une possibilité pour laquelle il n'y a pas encore assez de données (Daly et al., 2021).

2. Les facteurs hormonaux

Le développement physiologique et pathologique de la glande mammaire de la femme est sous le contrôle des hormones ovariennes (œstrogènes et progestérone) jusqu'à la ménopause. Ce sont donc les fluctuations des taux d'œstrogènes et de progestérone au cours de la vie qui influencent le développement du cancer du sein. Le risque de développer un cancer du sein est également proportionnel au temps d'exposition à ces hormones. L'apparition de carcinomes mammaires hormonodépendants augmente ainsi après la ménopause avec 75 % de carcinomes hormonodépendants alors qu'avant la ménopause, ils représentent 60 % des carcinomes mammaires.

Les facteurs hormonaux endogènes (œstradiol et progestérone) impliqués dans le risque de développer un cancer du sein sont :

- La grossesse : Avoir eu au moins un enfant réduit le risque d'environ 25 % et ce risque diminue davantage avec le nombre d'enfants (Ewertz et al., 1990; Layde et al., 1989; Pathak et al., 1986). Cette protection engendrée par la grossesse reste cependant à nuancer car les femmes qui accouchent d'un gros bébé auraient plus de risque de développer un cancer du sein (Bukowski et al., 2012).

- L'âge de la première grossesse : Plus cet âge est jeune, plus le risque est réduit car lors de la grossesse, les glandes mammaires subissent une différenciation terminale qui les rend par la suite moins sensibles aux carcinogènes. Cependant, cet effet peut être contrebalancé par le fait que l'involution de la glande mammaire après l'accouchement favorise l'initiation tumorale et les métastases. A l'inverse, plus l'âge de la première grossesse est élevé (>30 ans), plus le risque augmente (Albrektsen et al., 2005).

- L'allaitement : Il joue un rôle protecteur chez les femmes pré-ménopausées s'il est prolongé puisque le risque diminue de 4,3 % par année d'allaitement. A l'inverse, ne pas avoir allaité, ou avoir allaité sur une courte durée, augmente légèrement le risque de développer un cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer and al., 2002; Lipworth et al., 2000).

- La puberté précoce (avant 13 ans) et la ménopause tardive (après 55 ans) : Elles augmentent le risque de cancer du sein de 10 et 30 % respectivement. Le risque diminue de 5 % par année de retard dans les règles et augmente de 3 % par année dépassant l'âge moyen de la ménopause (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997; MacMahon, 2006). Cette augmentation du risque de développer un cancer du sein serait notamment liée à une trop forte exposition aux œstrogènes endogènes ainsi qu'à la testostérone.

Les facteurs hormonaux exogènes impliqués dans le risque de développer un cancer du sein sont :

- Les contraceptifs oraux : Pour le moment, il n'existe pas de données fiables permettant d'associer de manière significative l'utilisation des diverses formes de contraception au risque de développer un cancer du sein. Des études ont cependant révélé que la prise des contraceptifs oraux chez les femmes pourrait augmenter le risque mais ce dernier ne serait pas lié à la durée ou à la récurrence de la prise des contraceptifs oraux (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1996; Shapiro et al., 2000).

- Le Traitement Hormonal Substitutif (THS) visant à réduire les risques d'ostéoporose, de maladies cardio-vasculaires, de troubles cognitifs, et à améliorer la qualité de vie chez les

femmes ménopausées : Il augmenterait le risque d'environ 35 % si le traitement a été pris pendant 10 ans, et ce risque augmente avec les années de prise du traitement (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997; Magnusson et al., 1999).

- Le diéthylstilbestrol (DES) et les autres traitements visant à traiter l'infertilité : Les femmes exposées au DES entre 1940 et 1960 ont vu le risque augmenté de 30 % ultérieurement à la période de stimulation ovarienne (Malone, 1993). Son utilisation est désormais interdite.

- Les stimulations hormonales lors de l'AMP (Assistance Médicale à la Procréation) : Les données récoltées ne sont pas exploitables et fiables.

- L'interruption volontaire ou spontanée de grossesse : Pas de données fiables.

- Les perturbateurs endocriniens et les xéno-œstrogènes (pesticides : DDT ; produits industriels : PCB) : Il s'agit majoritairement de molécules de synthèse que l'on retrouve dans l'industrie ou l'alimentation et dont le rôle sur le risque de développer un cancer du sein n'est pas encore clairement établi (Brody et al., 2007).

3. Les facteurs environnementaux et le mode de vie

L'influence des facteurs environnementaux et du mode de vie sur le risque de développer un cancer du sein est assez mal caractérisée. Ces facteurs sont principalement :

- Le surpoids et l'obésité : A l'âge adulte, un indice de masse corporelle (IMC) élevé réduit le risque pré-ménopause (entre 18 et 40 ans) mais augmente le risque post-ménopause (van den Brandt et al., 2000). A la naissance, les bébés de sexe féminin pesant plus de 3 kg 840 auraient un risque plus élevé de développer un cancer pré-ménopause par rapport aux bébés plus légers (Vatten et al., 2005).

- La taille élevée : A l'âge adulte, elle entraîne une légère augmentation du risque pré- et post-ménopause selon de nombreuses études (van den Brandt et al., 2000; Hunter and Willett, 1993). Quant à la naissance, les bébés mesurant plus de 53 cm auraient un risque plus élevé de développer un cancer pré-ménopause par rapport aux bébés mesurant moins de 50 cm (Vatten et al., 2005).

- Une alimentation trop riche en graisses : Indépendamment de son lien avec le surpoids et l'obésité, elle aurait un impact limité et controversé sur l'augmentation du risque (Hunter et al., 1996). En revanche, la consommation de légumes pourrait avoir un effet protecteur modéré (Gandini et al., 2000).

- La consommation excessive d'alcool : Elle augmenterait le risque de développer des cancers du sein post-ménopausiques et probablement aussi pré-ménopausiques. Son effet dose-risque n'est pas bien défini bien que le risque de développer un cancer du sein semble augmenter

de manière linéaire dans la fourchette de consommation d'alcool légère à modérée mais n'augmente pas plus en cas de forte consommation ou d'alcoolisme (Johnson, 2005; Smith-Warner et al., 1998).

- Le tabac : Il existe un lien probable entre le tabagisme actif ou passif et le risque de développer un cancer du sein mais les résultats sont assez controversés (Howell et al., 2014; Reynolds, 2013).

- La sédentarité et le manque d'activité physique : Une activité physique modérée régulière (environ 30 minutes par jour) diminue le risque de cancer du sein post-ménopausique de manière limitée (25 % en moyenne) par rapport à la sédentarité surtout chez les femmes entre 35 et 50 ans. Ce risque diminue plus l'intensité et le temps d'activité augmente (Friedenreich, 2010; McTiernan et al., 2003).

- Le travail de nuit, le décalage horaire, l'éclairage artificiel nocturne et le manque de sommeil : Ils entraînent des perturbations hormonales et/ou perturbation du rythme circadien qui favorisent les cancers du sein (Leonardi et al., 2012).

- La carence en vitamine D est un facteur de risque (Hossain et al., 2019; de La Puente-Yagüe et al., 2018).

- L'exposition à des rayonnements ionisantes : Au début du 20^{ème} siècle, les femmes exposées à des radiations ionisantes lors des bombardements atomiques d'Hiroshima et Nagasaki, mais également dans le cadre médical lors des suivis pour tuberculose, présentaient un risque plus élevé, surtout si elles y ont été exposées avant l'âge de 20 ans (Ronckers et al., 2004; Tokunaga et al., 1994). De plus, l'exposition répétée aux rayonnements ionisants lors des mammographies, même à des doses faibles, a augmenté le risque au fur et à mesure (Hendrick, 2010). Cependant, au 21^{ème} siècle, ce risque est nettement plus limité du fait de l'optimisation des mammographies.

- L'incidence de la zone géographique : Les femmes provenant d'une zone géographique (ex : Asie orientale) à faible incidence qui migrent vers une autre zone à forte incidence (ex : Etats-Unis) voient leur risque de développer un cancer du sein atteindre celui de la population de la nouvelle zone en deux générations (Ziegler et al., 1993).

Pour finir, plusieurs facteurs de risque peuvent se cumuler. Par exemple, les hôtesses de l'air sont soumises à des décalages horaires et sont exposées aux radiations cosmiques, ce qui explique que l'incidence du cancer du sein soit significativement élevée dans cette profession (Buja et al., 2006; Gassmann et al., 2015). A l'inverse, il est important de mentionner que, du fait de leur complexité, beaucoup de cancers du sein surviennent en l'absence de tout facteur de risque identifié.

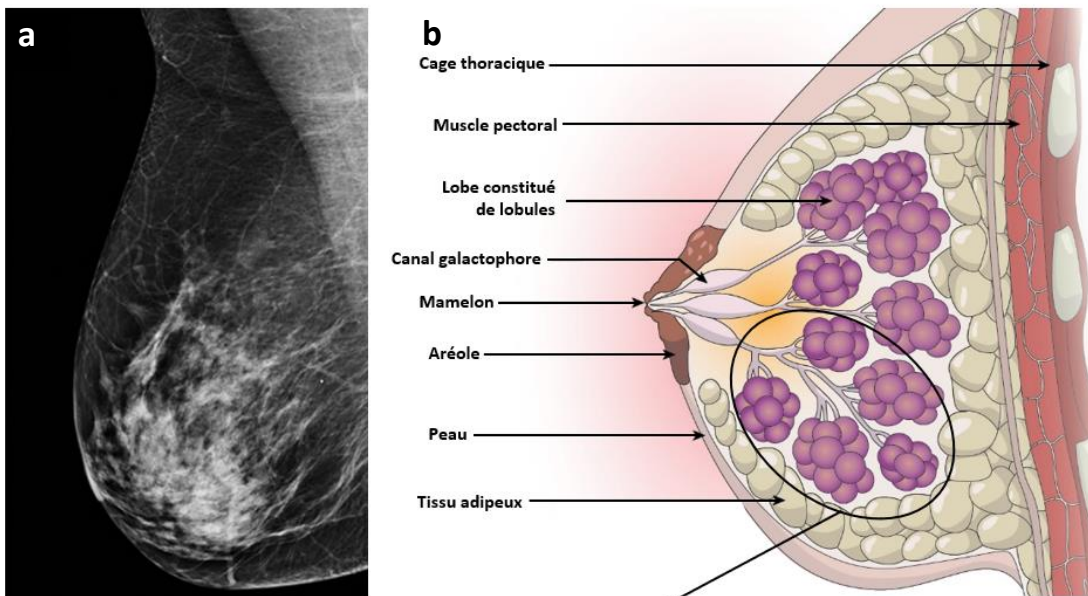
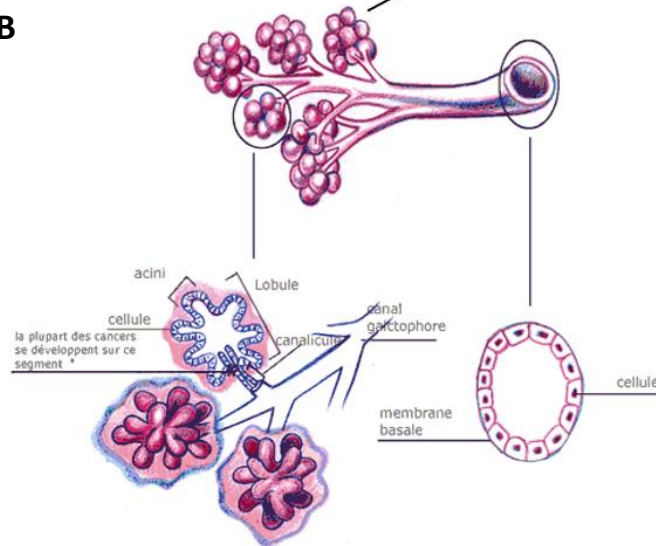
A**B**

Figure I2 : Anatomophysiologie du sein normal

A. Anatomie du sein de la femme adulte. Mammographique en médio-latérale oblique (a) et illustration du sein en coupe verticale (b). La glande mammaire est constituée de lobules drainés par des canaux galactophores jusqu'au mamelon. L'ensemble est entouré de tissu adipeux (Adapté de Sante-medecine.net et Jesinger 2014).

B. Représentation schématique de l'organisation cellulaire des lobules et du réseau galactophorique. Un lobe est formé de plusieurs lobules. Les lobules sont formés d'acini et de canaux intralobulaires qui se regroupent en canaux interlobulaires. Les canaux interlobulaires d'un lobe débouchent sur un canal galactophore. Les canaux et lobules comportent des cellules épithéliales entourées de cellules myoépithéliales qui reposent sur une membrane basale (Adapté de SIRIC Curie-institut Curie).

II. Anatomo-physio-pathologie du sein

A. Anatomophysiologie du sein : Anatomie du sein normal

Les données de cette partie sont issues de cinq sources principales (Hassiotou and Geddes, 2013; Macias and Hinck, 2012; Sherwood, 2022; Editions Masson, 2007; Jesinger, 2014).

1. Anatomie de la glande mammaire

Les seins sont attachés au muscle pectoral par des ligaments de soutien au niveau de la partie antéro-postérieure du thorax ([Figure I2A](#)).

D'un point de vue extérieur, le sein présente en son centre une aréole (disque) plus ou moins pigmentée qui entoure le mamelon (papille mammaire). L'aréole contient des bourgeons de glandes sudoripares et sébacées.

D'un point de vue interne, le sein possède une vingtaine de lobes mammaires, chacun étant drainé par un canal galactophore qui débouche sur le mamelon. Chaque lobe est constitué de 20 à 40 lobules et chaque lobule est formé par 10 à 100 acini mammaires (alvéoles contractiles). Chaque acinus débouche sur un canalicule alvéolaire, puis l'ensemble de ces canalicules débouchent sur un canal intralobulaire, et l'ensemble des canaux intralobulaires se regroupent en un canal interlobulaire. Les canaux interlobulaires débouchent sur un canal galactophore dont l'extrémité se dilate en sinus galactophorique à l'extrémité du mamelon. Les lobules produisent le lait qui est acheminé vers le mamelon via les canaux galactophores. Le sein est également parcouru par de nombreux vaisseaux sanguins et canaux lymphatiques qui assurent la nutrition et le drainage du tissu mammaire. Les canaux lymphatiques sont reliés à différents ganglions lymphatiques du corps (ganglions axillaires, ganglions sus-claviculaires, ganglions sous-claviculaires et ganglions mammaires internes), et l'ensemble forme le système lymphatique responsable de la lutte contre les infections.

2. Organisation cellulaire de la glande mammaire

Au niveau de la glande mammaire saine, les canaux galactophores et les acini présentent une couche concentrique de cellules épithéliales luminales et de cellules myoépithéliales qui reposent sur une membrane basale ([Figure I2B](#)) (Pillay and Davis, 2022). Le tissu conjonctif adjacent est constitué de cellules mésenchymateuses dont la majorité sont des adipocytes.

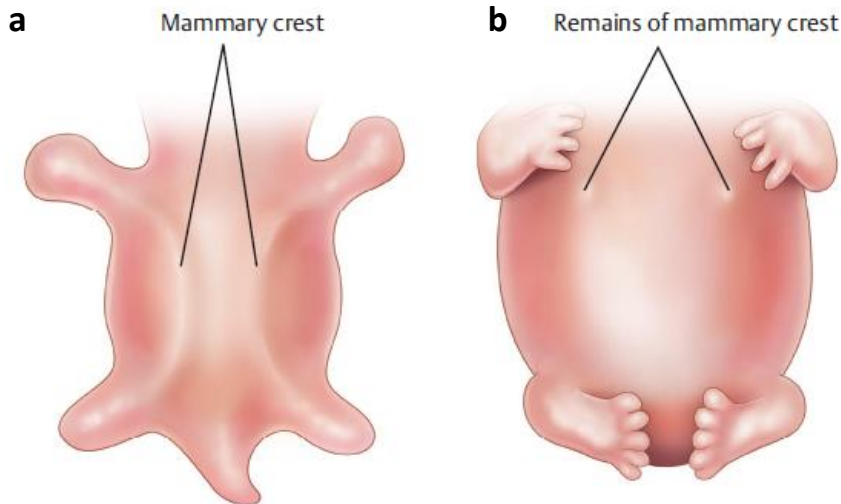
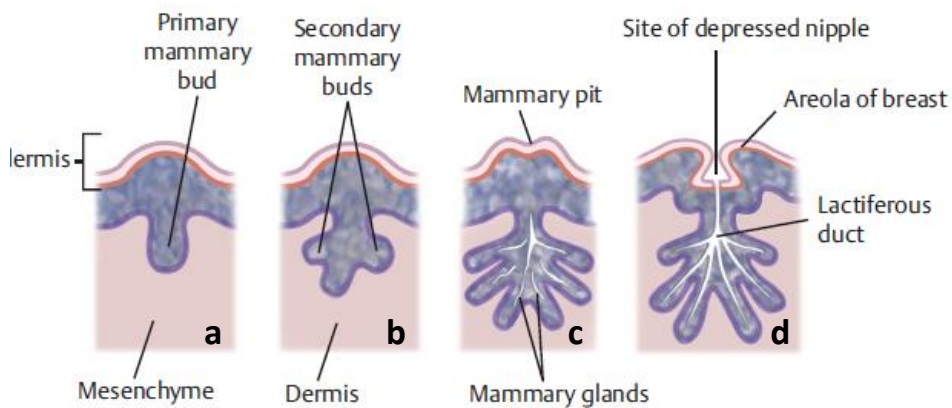
A**B**

Figure I3 : Développement embryologique normal de la glande mammaire humaine

A. Vue ventrale d'un embryon. (a) A 28 jours de gestation : présence de crêtes mammaires. (b) A 6 semaines de gestation : présence de restes des crêtes mammaires (Adapté de Jones, 2020).

B. Coupe transversale d'une crête mammaire montrant les étapes successives du développement de la glande mammaire entre la 5^{ème} semaine de gestation et la naissance : (a) Croissance du bourgeon mammaire au-delà de la 5^{ème} semaine de gestation. (b) Formation des bourgeons secondaires entre la 5^{ème} et la 12^{ème} semaine de gestation. (c-d) Poursuite de la croissance des lobules mammaires au-delà de la 12^{ème} semaine de gestation, avec allongement et ramification des canaux en un réseau complexe de canaux mammaires disposés radialement qui relie le mamelon en développement (Adapté de Jones, 2020).

Les cellules épithéliales luminales permettent de produire le lait lors de la lactation alors que les cellules myoépithéliales qui entourent les cellules luminales possèdent une fonction contractile qui permet le transport du lait vers le mamelon en réponse au stimulus de succion. La membrane basale sépare les cellules épithéliales et myoépithéliales des cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif.

Les cellules mésenchymateuses regroupent les cellules immunitaires, les adipocytes, les fibroblastes, les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ces cellules sécrètent et sont en contact avec des protéines et facteurs de croissance. L'ensemble participe au bon développement de la glande mammaire (Inman et al., 2015).

3. Développement du sein au cours de la vie

Les données de cette partie sont issues d'un ensemble conséquent de sources (Howard and Gusterson, 2000; Inman et al., 2015; Javed and Lteif, 2013; Jesinger, 2014; Jones, 2020; Knight and Peaker, 1982; McNally and Stein, 2017; Paine and Lewis, 2017; Pandya and Moore, 2011; Russo and Russo, 2004; Stines and Tristant, 2005; Truchet and Honvo-Houeto, 2015).

Contrairement aux autres tissus et organes du corps, la glande mammaire évolue tout au long de la vie dépendamment des hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone). Les œstrogènes sont responsables du développement des seins lors de la puberté et durant toute la grossesse. La progestérone est responsable de la différenciation cellulaire mammaire et est impliquée dans le remaniement de l'utérus au cours des cycles menstruels. Il est à noter que la taille et la forme des glandes mammaires varient d'une femme à une autre en fonction de la quantité de tissus adipeux, glandulaires et conjonctifs qu'ils contiennent. De plus, il est rare que les deux seins d'une femme soient de la même proportion.

a) De la vie embryonnaire jusqu'à la puberté

In utero, la glande mammaire se développe grâce aux hormones maternelles. Le développement embryonnaire de la glande mammaire est initié vers la 5^{ème} semaine de grossesse. Des crêtes mammaires (épaississements épidermiques) se forment de chaque côté de la partie ventrale de l'embryon et s'étendent entre l'aisselle et l'aîne (Figure I3A). Au fur et à mesure du temps, ces crêtes disparaissent pour laisser seulement deux bourgeons mammaires. Ces deux bourgeons persistants forment l'aréole puis s'invaginent dans le mésoderme sous-jacent en plusieurs (entre 15 et 20) prolongements cylindriques pleins qui se dilatent à leur extrémité. Ces prolongements cylindriques se creusent pour former la lumière de ce qui devient l'ébauche des canaux galactophores. Ces canaux s'ouvrent au niveau de

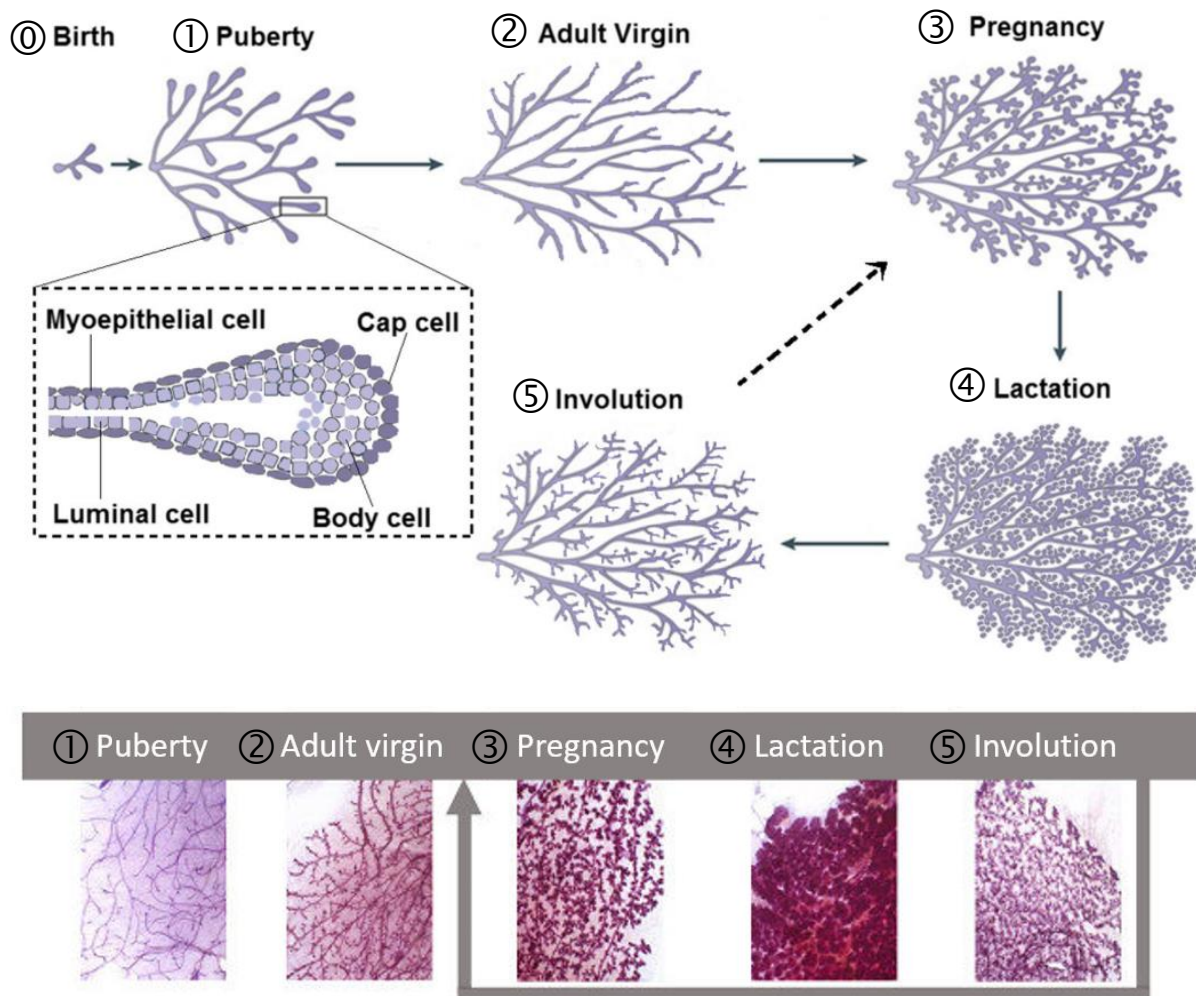


Figure I4 : Evolution de la glande mammaire murine au cours de la vie

① Au cours de la puberté, l'épithélium mammaire entre dans une phase de croissance importante (élongation extensive, bifurcation et ramification latérale).

② Au début de la gestation, une prolifération importante et rapide ainsi que des ramifications latérales se produisent, conduisant à une expansion considérable de l'épithélium mammaire, qui envahit entièrement le coussinet adipeux mammaire.

③ L'épithélium mammaire atteint un état fonctionnel hautement différencié pendant la lactation, lorsque les cellules épithéliales luminales sécrètent du lait.

④ Lorsque la lactation cesse après le sevrage, la glande mammaire involue. Les cellules épithéliales sécrétrices sont éliminées par apoptose et phagocytose, entraînant la disparition des structures lobulo-alvéolaires qui sont remplacées par du tissu adipeux.

(Adapté de Truchet et Honvo-Houéto, 2015/Paine et Lewis, 2017)

l'emplacement du futur mamelon (Figure I3B). A la naissance, le nouveau-né possède des glandes mammaires qui se présentent sous forme de petits reliefs cutanés avec en leur centre un mamelon entouré d'une aréole contenant des bourgeons de glandes sudoripares et sébacées apocrines. Les glandes mammaires resteront dans un état de repos immature jusqu'à la puberté chez les femmes et jusqu'à la fin de leur vie chez les hommes. Avant la puberté, les glandes mammaires subissent tout de même quelques modifications mineures avec une légère augmentation des ramifications des canaux galactophores ainsi que la formation des lobules.

b) A la puberté

A la puberté, des modifications majeures interviennent au niveau la glande mammaire vers l'âge de 10-12 ans (Figure I4). La puberté enclenche la production d'hormones (œstrogènes et progestérone), ce qui permet aux canaux galactophores et aux lobules de se différencier. Les œstrogènes stimulent la croissance et la multiplication des canaux alors que la progestérone déclenche le développement des lobules et des alvéoles, et entraîne l'apparition des premiers bourgeons des acini à l'extrémité des canaux qui ne se différencieront qu'au moment d'une potentielle grossesse. Sous l'effet de la progestérone, le tissu conjonctif et le tissu adipeux prennent également de plus en plus de place ce qui entraîne une modification de la forme des seins et une augmentation du volume mammaire. Cela s'accompagne d'un élargissement de l'aréole qui devient de plus en plus rosée.

Lors de chaque cycle menstruel, la glande mammaire subit des modifications du fait des variations d'œstrogènes et de progestérone qui influent sur les canaux galactophores et le volume mammaire.

c) Au cours de la grossesse et à l'accouchement

Au cours de la grossesse, les hormones stéroïdes placentaires (œstrogènes : 1^{er} trimestre, progestérone : 2nd et 3^{ème} trimestres) déclenchent la différenciation terminale de la glande mammaire. Les œstrogènes entraînent la prolifération des canaux galactophores, puis la progestérone stimule le développement des lobules et des acini. Les cellules épithéliales des acini se différencient en cellules sécrétrices au 6^{ème} mois en vue de l'allaitement du bébé. Par conséquent, la structure canaliculaire qui ne représentait que 10 % de la masse mammaire au début de la grossesse se transforme en une structure tubulo-alvéolaire qui représente 90 % du volume mammaire à la fin de la grossesse (Figure I4).

Deux ou trois jours après l'accouchement, la chute des hormones stéroïdes placentaires, associé un pic de prolactine, entraîne la stimulation des cellules sécrétrices des acini, qui produisent ainsi les différents composants du lait.

d) Au cours de la lactation

Lors de la lactation, la succion des mamelons lors des tétées du nourrisson a une double conséquence réflexe. Elle déclenche la sécrétion de prolactine qui permet la production continue de lait, ainsi que la sécrétion d'ocytocine qui entraîne la contraction des cellules myoépithéliales entourant les cellules sécrétrices des acini afin d'acheminer le lait jusqu'au mamelon. Sans la succion du mamelon, la lactation n'est pas maintenue.

Lors du sevrage, l'arrêt des suctions annule la production réflexe de prolactine et entraîne un engorgement en lait ce qui diminue l'accessibilité des cellules myoépithéliales à l'ocytocine. Le lait fini donc par s'accumuler ce qui entraîne une dislocation de l'épithélium mammaire, une digestion de la matrice extracellulaire (MEC) par des enzymes protéolytiques (gélatinases) puis l'apoptose des cellules épithéliales et la dégradation du tissu sécréteur par les macrophages. La glande mammaire revient à son état latent antérieur mais la structure tubulo-alvéolaire formée durant la grossesse ne disparaît pas complètement ([Figure I4](#)). Son involution permet d'éliminer de potentielles cellules mutées et précancéreuses d'où le rôle protecteur de la grossesse dans le cancer du sein.

e) A la ménopause

A la ménopause, les canaux mammaires et la structure tubulo-alvéolaire restante perdent de leur importance. Ils sont soit remplacés par du tissu graisseux ou la glande mammaire s'atrophie. La glande mammaire perd également son tonus à cause du relâchement des ligaments de soutien.

B. Anatomopathologie du sein

Les données de cette partie sont principalement issues d'un ouvrage sur le cancer du sein publié chez Masson (Brettes et al., 2007).

1. Classification moléculaire

Le cancer du sein est une maladie complexe car très hétérogène. Il est donc important de différencier les différents types de cancers de sein qui existent afin d'adapter au mieux les traitements pour éviter le plus possible les effets secondaires. Cette maladie comporte ainsi 5

Sous-types moléculaires	Caractéristiques moléculaires	Traitements médicamenteux
Luminal A	RE+ et/ou RP+/HER2- Ki67 bas	Hormonothérapie exclusive (sauf si facteurs de risque)
Luminal B	RE+ et/ou RP+/HER2- Ki67 élevé	Hormonothérapie +/- Chimiothérapie
	RE+ et/ou RP+/HER2+ Ki67 indifférent	Chimiothérapie Trastuzumab Hormonothérapie
HER2+ non luminal	RE-/RP-/HER2+	Chimiothérapie Trastuzumab
Triple-négatif	RE-/RP-/HER2-	Chimiothérapie

Tableau I2 : Classification moléculaire des cancers du sein

Les cancers du sein peuvent être classés en cinq sous-types moléculaires principaux : luminal A et B (qui surexpriment les récepteurs hormonaux mais pas forcément HER2), HER2+ luminal ou non, et les triples négatifs. Cette classification permet d’adapter au mieux les traitements (Adapté de Harbeck and Gnant, 2017/Tsang and Tse, 2020/Dai et al., 2015/Goldrith et al., 2011/Waks et Winer, 2019).

sous-types moléculaires avec les cancers dits luminaux (luminal A et B), HER2+ luminal ou non, et les triples négatifs ([Tableau I2](#)) (Dai et al., 2015; Goldhirsch et al., 2011; Harbeck and Gnant, 2017; Provenzano et al., 2018; Tsang and Tse, 2020). Les différents sous-types moléculaires des tumeurs ont été déterminés par des études génomiques (puces à ADN). Ces différentes tumeurs présentent des réponses variables en termes de survie et d'efficacité thérapeutique, de grade tumoral, et de propagation métastatique.

Les 5 sous-types moléculaires identifiés de cancers du sein ont différentes caractéristiques (Waks and Winer, 2019):

- Les cancers du sein « luminaux » (« luminal A » ou « luminal B ») représentent 70 % des cancers du sein : Ils sont caractérisés par la surexpression du récepteur aux œstrogènes (RE) et/ou du récepteur à la progestérone (RP). Les tumeurs associées ont un profil d'expression proche de celui des cellules épithéliales des canaux mammaires et des acini. Les tumeurs « luminal A » (50 % des cancers du sein) ont un faible statut prolifératif alors que les tumeurs « luminal B » (10 à 20 % des cancers du sein) ont un statut prolifératif élevé. Les tumeurs « luminal A » ont un bon pronostic alors que les tumeurs « luminal B » ont un moins bon pronostic.

- Les cancers du sein HER2-positifs (HER2+) représentent 15 à 20 % des cancers du sein : Ils n'expriment pas les récepteurs hormonaux pour la plupart et ils sont caractérisés par l'amplification et la surexpression du gène *HER2*. Ils sont de mauvais pronostic.

- Les cancers du sein de phénotype basal ou « triple-négatif » représentent 15 % des cancers du sein : Ils n'expriment ni les récepteurs hormonaux, ni l'oncoprotéine *HER2*. Ils touchent généralement les femmes jeunes, sont agressifs et avec un mauvais pronostic puisque le risque de récurrence à 5 ans est élevé et qu'ils sont associés à une mauvaise survie globale par rapport aux autres types de cancer. Cela est notamment dû au fait que leur prise en charge est compliquée à cause de l'absence de véritables cibles thérapeutiques.

2. Classification histologique

Les cancers du sein ne sont pas seulement caractérisés au niveau moléculaire, mais également de manière histologique par un examen anatomopathologique qui permet de déterminer si le cancer est non invasif (*in situ*) ou invasif (infiltrant) avec une atteinte ou non des ganglions lymphatiques. Ainsi, selon le stade du cancer, le traitement sera également différent.

Les adénocarcinomes représentent 95 % des cancers mammaires et sont divisés en deux catégories : les adénocarcinomes *in situ* (25 % des cas) et les adénocarcinomes infiltrants (75 %

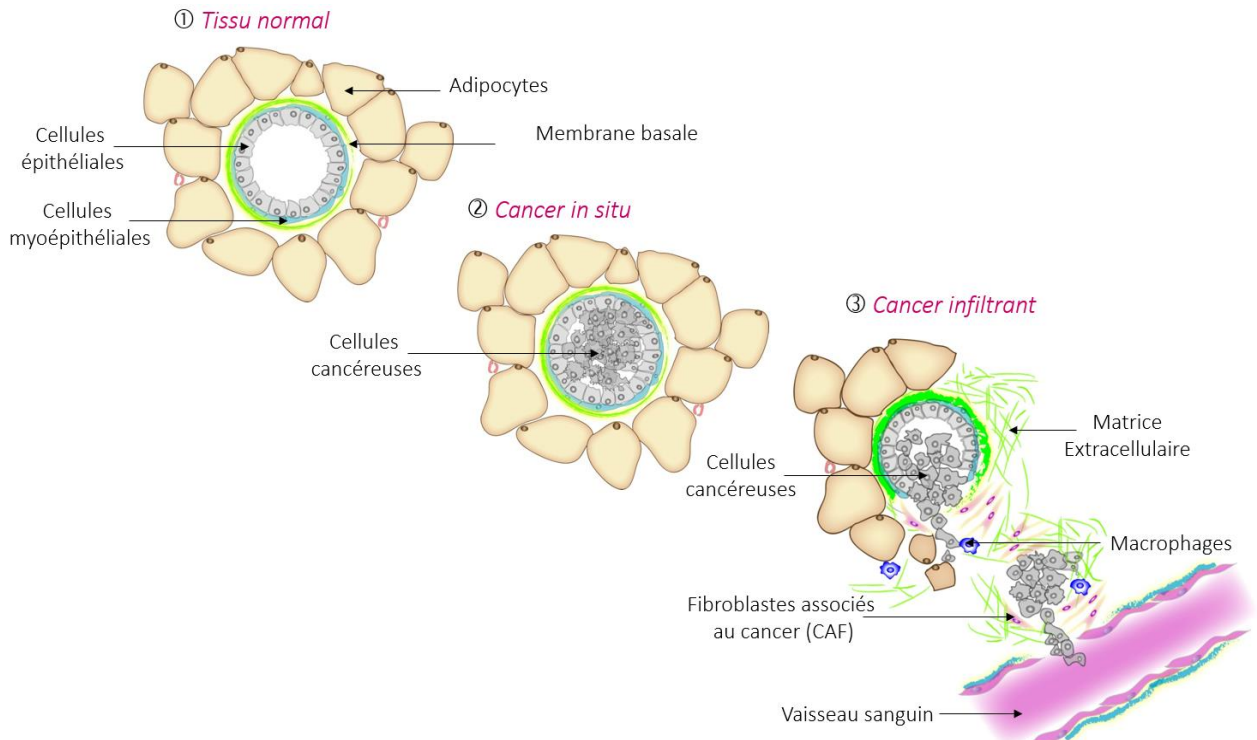


Figure I5 : Classification histologique des cancers du sein : Représentation schématique de la transition du stade *in situ* au stade invasif

Au niveau de la glande mammaire saine ①, les canaux galactophores présentent une couche concentrique de cellules épithéliales et myoépithéliales reposant sur une membrane basale. Le tissu conjonctif adjacent est principalement constitué d'adipocytes.

Lors d'un carcinome mammaire, une cellule épithéliale de la lumière du canal galactophore se transforme irréversiblement en cellule cancéreuse. Cette cellule épithéliale initiée prolifère anormalement dans le canal : c'est le stade *in situ* ②. La transition du stade *in situ* au stade invasif ③ se fait suite à la dégradation de la membrane basale. Les cellules cancéreuses interagissent avec le stroma. De ces interactions découlent la libération de nombreux facteurs favorisant le remodelage intense de la matrice extracellulaire et le développement de vaisseaux sanguins qui apportent les nutriments essentiels à la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules tumorales peuvent éventuellement envahir les tissus et les organes environnants via les vaisseaux sanguins et lymphatiques : c'est le stade métastatique.

des cas) (Cowell et al., 2013; Hanahan and Weinberg, 2011; Polyak, 2007). Les adénocarcinomes se développent à partir des cellules épithéliales (=carcinome) luminales de la glande (=adéno) mammaire. Les 5 % restants sont des lymphomes mammaires et des sarcomes qui se développent à partir des cellules conjonctives (Harrison and Dillon, 2018).

a) Les carcinomes non invasifs ou *in situ*

Lors d'un carcinome mammaire, une cellule épithéliale de la lumière du canal galactophore (carcinome canalaire) ou d'un lobule (carcinome intracanaire) se transforme irréversiblement en cellule cancéreuse. Cette cellule épithéliale initiée prolifère anormalement dans le canal sans altérer et franchir la membrane basale : c'est le stade *in situ* (Figure I5). Les carcinomes canaux *in situ* sont les plus fréquents puisqu'ils représentent 8 à 9 cancers *in situ* sur 10 (INCa).

b) Les carcinomes invasifs ou infiltrants

La transition du stade *in situ* au stade invasif se fait suite à la dégradation de la membrane basale par les cellules épithéliales cancéreuses. Ces dernières envahissent et interagissent avec le tissu conjonctif modifié, le stroma tumoral. De ces interactions découlent la libération de nombreux facteurs favorisant le remodelage intense de la matrice extracellulaire et le développement de vaisseaux sanguins qui apportent les nutriments essentiels à la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules tumorales peuvent éventuellement envahir les autres tissus et organes environnants du corps via les vaisseaux sanguins et lymphatiques : c'est le stade métastatique (Figure I5). Les carcinomes canaux infiltrants sont les plus fréquents puisqu'ils représentent 75 % des cancers du sein invasifs alors que les carcinomes lobulaires sont plus rares puisqu'ils correspondent à 5-15 % des cancers du sein invasifs.

La transition du stade *in situ* au stade infiltrant est une étape clé de la progression des carcinomes mammaires. Cette transition est conditionnée par des interactions entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral mais les acteurs impliqués dans cette transition ne sont que partiellement caractérisés (Cowell et al., 2013; Hanahan and Weinberg, 2011; Polyak, 2007).

c) Les formes rares de carcinome

Chaque forme rare de carcinome représente 1 à 2 % des carcinomes infiltrants et est généralement de meilleur pronostic que les carcinomes canaux infiltrants.

Le carcinome médullaire possède une bordure ronde bien limitée et les cellules qui le constituent sont peu différenciées et dans un stroma peu abondant (Park et al., 2013).

Le carcinome mucineux ou colloïde est formé de cellules cancéreuses sécrétant du mucus (Harrison and Dillon, 2018).

Le carcinome tubuleux est constitué de cellules cancéreuses avec un aspect tubuleux au microscope. Ce type de carcinome ne se propage généralement pas aux ganglions lymphatiques axillaires (Min et al., 2013b).

Le carcinome papillaire, infiltrant ou non, possèdent des structures papillaires (Pal et al., 2010).

III. La biologie du cancer

A. Histoire naturelle du cancer du sein

L'histoire d'un cancer débute par la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse à la suite de l'accumulation d'évènements. Cette transformation se fait en plusieurs étapes (Fidler, 2003):

- Phase d'initiation : transformation d'une cellule épithéliale normale en une cellule cancéreuse.
- Phase de promotion = expansion clonale : formation de la tumeur primaire locale sous l'influence du microenvironnement tumoral (hormones, facteurs de croissance, cytokines).
- Phase de progression : développement de vaisseaux sanguins qui apportent l'oxygène et les nutriments essentiels aux cellules cancéreuses qui acquièrent des propriétés migratoires et invasives d'autres tissus ou organes via les vaisseaux.

Pour rejoindre le stroma et passer au travers du stroma pour rejoindre les vaisseaux, les cellules cancéreuses dégradent la membrane basale et les composants de la matrice extracellulaire grâce aux enzymes protéolytiques (MMP) qu'elles sécrètent.

Les cellules cancéreuses interagissent avec le stroma composé d'une matrice extracellulaire insoluble et de cellules associées (fibroblastes, adipocytes, vaisseaux sanguins, et lymphatiques). Ces interactions entraînent la libération de nombreux facteurs favorisant le remodelage de la matrice extracellulaire afin que les cellules cancéreuses rejoignent la circulation vasculaire ou lymphatique. Les cellules passent dans les vaisseaux par intravasation puis rejoignent d'autres tissus ou organes. Une fois dans les tissus ou organes cibles, les cellules cancéreuses passent à nouveau à travers la paroi vasculaire ou lymphatique par extravasation et interagissent avec leur stroma d'accueil (cellules comprises) tout en sécrétant des facteurs de croissance diffusibles de manière à survivre et à former une métastase. Les cellules

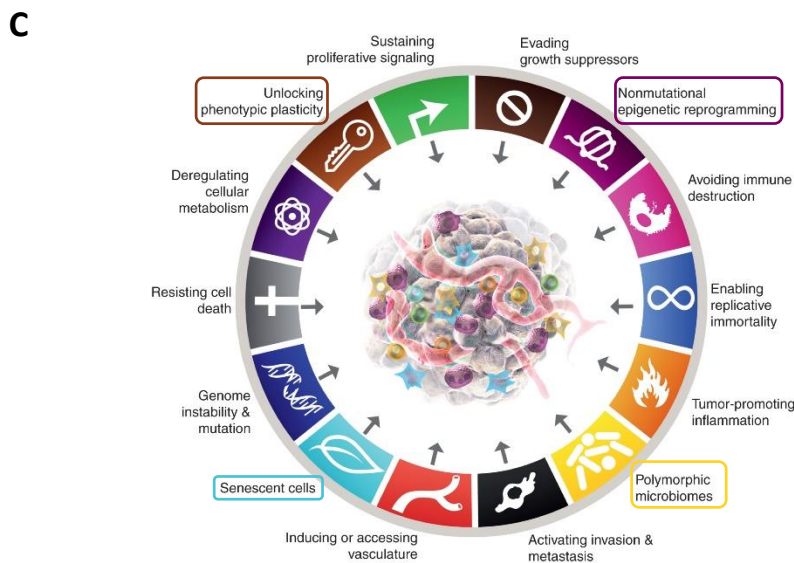
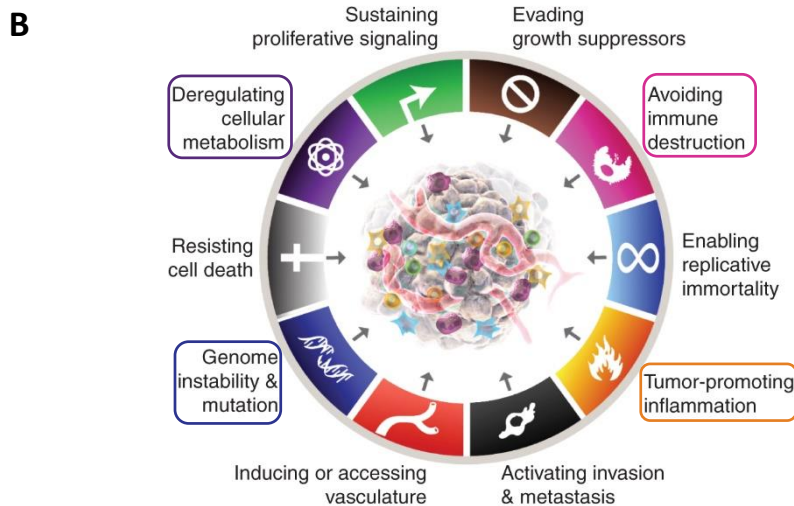
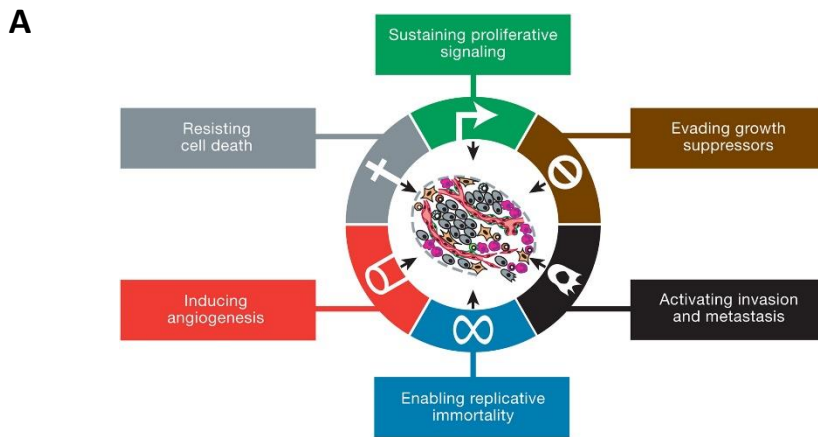


Figure I6 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses

En 2000, les cellules cancéreuses sont définies par 6 caractéristiques (A) (Hanahan and Weinberg, 2000), puis 4 autres caractéristiques viennent s'ajouter en 2011 (B) (Hanahan and Weinberg, 2011), et à nouveau en 2022 (C) (Hanahan, 2022).

métastatiques peuvent cependant rester en état de latence pendant un moment avant de former des métastases (Fidler, 2003).

B. De la cellule normale à la cellule cancéreuse

Les cellules normales se transforment en cellules néoplasiques à la suite d'aberrations dans les mécanismes de contrôle de l'expression génique (modifications épigénétiques, régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles) qui induisent des expressions aberrantes des gènes cibles. Les cellules perdent leurs caractéristiques intrinsèques et acquièrent de nouvelles caractéristiques : instabilité et mutations du génome, reprogrammation épigénétique, résistance à l'apoptose et au système immunitaire, autosuffisance en signaux de croissance, insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance et dérégulation du métabolisme énergétique, prolifération continue, réplication infinie (cellules immortelles), plasticité phénotypique, pouvoir d'induire de l'angiogenèse, des métastases et de l'inflammation tumorale (Figure I6) (Hanahan, 2022; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses perdent leurs caractéristiques épithéliales (jonctions intracellulaires) et acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses (motilité cellulaire) : c'est la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est régulée par différents signaux en provenance du microenvironnement tumoral et engendre le remodelage de la matrice extracellulaire (Bissell and Hines, 2011). Ce remodelage nécessite l'action d'enzymes, les endopeptidases, qui sont sécrétées par les cellules cancéreuses et/ou par des cellules du microenvironnement tumoral (Rakashanda et al., 2012). Ces enzymes sont divisées en six groupes selon la nature du ou des acides aminés de leur site actif : 1/ les protéases à sérine, 2/ les protéases à cystéine, 3/ les protéases à thréonine, 4/ les protéases acides, 5/ les protéases à acide glutamique et 6/ les métalloprotéases (López-Otín and Bond, 2008; Rakashanda et al., 2012).

C. L'orchestration du développement tumoral

1. Modifications génétiques et épigénétiques

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs subissent des modifications génétiques (mutations, translocations, amplifications, délétions) et épigénétiques menant à une tumorigenèse progressive.

a) Modifications génétiques

Les oncogènes (ex : *ERBB2*, *RAS*, *MYC*, *AKT2*) subissent des modifications génétiques activatrices alors que les suppresseurs de tumeurs (ex : *TP53*, *PTEN*) subissent des modifications génétiques réductrices de leur activité. Ainsi, l'activation des oncogènes entraîne une prolifération anarchique des cellules cancéreuses, et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur entraîne une inhibition de la mort des cellules anormales et un arrêt du cycle cellulaire. En plus de ces gènes, les gènes de stabilité (ex : *BRAC1*, *BRCA2*) sont également impliqués dans la tumorigenèse. Lorsqu'ils subissent des modifications génétiques, la surveillance de l'instabilité génomique, due à la réplication ou à la réparation de l'ADN, n'est plus assurée (Kontomanolis et al., 2020; Lee and Muller, 2010; Vogelstein and Kinzler, 2004).

b) Modifications épigénétiques

A l'échelle épigénétique, la méthylation des promoteurs, les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation) ainsi que le remodelage de la chromatine (ex : hyperméthylation de la région promotrice du gène *BRCA1*) favorisent le développement tumoral (Klarmann et al., 2008; Korkola and Gray, 2010). Les mécanismes qui régulent ces modifications épigénétiques sont cependant assez peu connus. Il existe des coordonnateurs de modifications épigénétiques spécifiques tels que *SATB1*, dont l'expression est induite dans les cellules cancéreuses du sein de manière à promouvoir le processus métastatique (Han et al., 2008).

2. Le métabolisme énergétique ou switch énergétique

Les cellules cancéreuses subissent des changements métaboliques (ou « switch métabolique ») pour pouvoir fournir assez d'énergie aux cellules cancéreuses qui prolifèrent à l'infini. En effet, la mutation de l'oncogène *RAS* ainsi que l'hypoxie induisent l'expression des facteurs de transcription *HIF1 α* et *HIF2 α* qui activent la glycolyse pour produire l'énergie des cellules cancéreuses (Kroemer and Pouyssegur, 2008). Une partie des cellules tumorales utilisent donc le glucose comme source énergétique et sécrète du lactate, puis l'autre partie des cellules utilise ce lactate sécrété pour fournir de l'énergie au cycle de Krebs (Hanahan and Weinberg, 2011; Xing et al., 2015).

3. L'influence du microenvironnement

Le microenvironnement tumoral correspond au stroma qui entoure la lame basale sur laquelle repose les cellules épithéliales et myoépithéliales de la glande mammaire. Les cellules

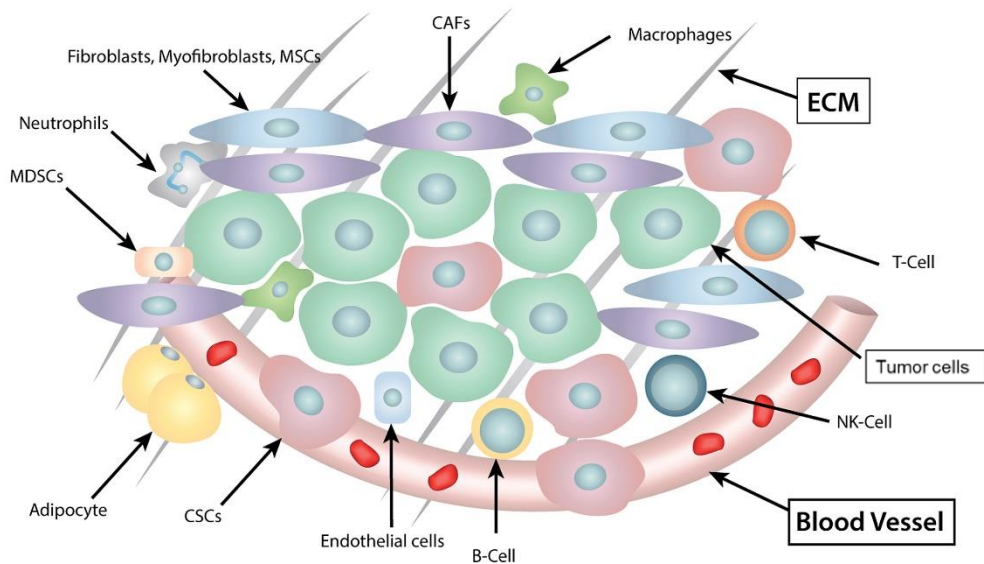


Figure I7 : Les différents types cellulaires du microenvironnement tumoral dans le cancer du sein

Le microenvironnement tumoral est un mélange complexe de cellules tumorales, mais aussi de nombreuses lignées cellulaires et d'une matrice extracellulaire (MEC). La composante cellulaire comporte des cellules d'origine mésenchymateuse [les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules souches mésenchymateuses (CSM), les fibroblastes associés au cancer (CAF), les adipocytes, les cellules endothéliales], et des cellules d'origine hématopoïétique : les cellules lymphoïdes [les cellules T, les cellules B et les cellules tueuses naturelles (NK-Cell)] et les cellules myéloïdes (les macrophages), les neutrophiles et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC). La composante non cellulaire est la matrice extracellulaire (MEC). Le microenvironnement tumoral est un important régulateur du cancer du sein qui influence finalement le phénotype du cancer de part les interactions qui s'y déroulent (Adapté de Heesch et al., 2020/McCuaig et al., 2017).

cancéreuses invasives y sont au contact de multiples types cellulaires et d'une matrice extracellulaire, le tout interagissant de manière complexe. La composante cellulaire est formée de cellules mésenchymateuses (fibroblastes, adipocytes), cellules souches, cellules endothéliales et cellules immunitaires. La composante non-cellulaire (matrice extracellulaire) est formée de : protéoglycanes, acide hyaluronique, protéines fibreuses (collagène, élastine, fibronectine, laminine), facteurs solubles (facteurs de croissance, cytokine, chimiokine) et métabolites (Figure 17). L'ensemble de ces éléments sont impliqués dans la tumorigenèse (Egeblad et al., 2010; Heesch et al., 2020; McCuaig et al., 2017; Mehraj et al., 2021; Mittal et al., 2018; Soysal et al., 2015).

a) Les cellules souches cancéreuses (CSC)

L'origine des cellules souches cancéreuses est mal définie, mais elles sont connues pour former des tumeurs après avoir été injectées dans des souris (Atashzar et al., 2020).

b) Les fibroblastes associés au cancer (CAF)

Les fibroblastes en contact avec les cellules cancéreuses au centre de la tumeur sont appelés les fibroblastes associés au cancer (CAF). Leur origine est débattue. Les données suggèrent plusieurs origines telles que les fibroblastes résidents du tissu mammaire, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules épithéliales ayant subi une EMT, et enfin les adipocytes (Shiga et al., 2015). Les CAF participent à la tumorigenèse en recevant et/ou sécrétant des signaux pro-tumorigéniques. Ils favorisent la croissance tumorale, l'angiogenèse, et le recrutement des cellules inflammatoires en sécrétant des facteurs mitogéniques (EGF, HGF), des chimiokines (CXCL12), des molécules de surface (intégrine $\alpha 11$, syndecan-1), des protéases (MMP2, MMP11) et d'autres constituants de la matrice extracellulaire (Giorello et al., 2021).

c) Adipocytes associés au cancer (CAA)

Les adipocytes sont présents en majorité dans le tissu conjonctif de la glande mammaire ainsi que dans le microenvironnement tumoral. Les adipocytes en contact avec les cellules cancéreuses au centre de la tumeur sont appelés les adipocytes associés au cancer (CAA). Lorsque les cellules cancéreuses se retrouvent au contact des CAA, des modifications surviennent dans ces deux types cellulaires. En effet, les cellules cancéreuses prolifèrent et acquièrent des propriétés migratoires et invasives alors que les CAA subissent une délipidation

Modèles précliniques du cancer du sein	Exemples	Avantages	Limites	Recommandations
Lignées de cellules cancéreuses (<i>in vitro</i>)	BT474, HCC1954, MCF10A, MCF7, MDA-MB231	.Peu coûteuses .Facilement traitables (médicaments) .Prolifèrent à l'infini	.Absence de microenvironnement .Impossibilité de conserver les propriétés des cellules d'origine	.Doivent être utilisées pour des études de base et aux premiers stades de développement d'un médicament .La coculture avec des FACs ou des cellules immunitaires pour améliorer la fiabilité des résultats obtenus
Xénogreffes de lignées cellulaires		.Taux de prise de greffe élevé .Récapitulent légèrement le microenvironnement tumoral .Prennent peu de temps à établir	.Ne reproduisent pas l'hétérogénéité des tumeurs d'origine .Perte des propriétés des lignées de cellules cancéreuses d'origine	.Doivent être utilisées aux stades relativement précoces du développement de médicaments avec un grand nombre de souris ce qui peut refléter l'hétérogénéité inter-tumorale
Souris génétiquement modifiées	MMTV-PyMT, WAP-c-myc, MT-TGFα	.Récapitulent l'initiation de la tumeur, son développement précoce .Le gène d'intérêt peut être étudié en détail	.Ne reproduisent pas l'hétérogénéité des tumeurs humaines .Prennent du temps à être établi	.Doivent être utilisées pour étudier comment un gène spécifique d'intérêt pourrait contribuer à l'initiation de la tumeur et à la rechute
Xénogreffes de tumeurs mammaires		.Récapitulent partiellement le microenvironnement tumoral .Conservent les caractéristiques histologiques et génétiques des tumeurs originales des patientes .Peuvent être utilisées comme modèle métastatique	.Taux de prise de greffe faible .Très coûteux .Très long à établir	.La mise au point de nouvelles souris immunodéficientes et/ou de meilleures méthodes de transplantation de tumeurs permettra d'améliorer les taux de réussite et le coût

Tableau I3 : Avantages, limites et recommandations pour chaque modèle préclinique de cancer du sein (Adapté de Murayama and Gotoh, 2019/Menezes et al., 2014)

et leur morphologie tend vers celle des fibroblastes (Andarawewa et al., 2005; Motrescu and Rio, 2008a; Tan et al., 2011).

Le comportement des cellules cancéreuses est modifié par les CAA qui sécrètent des facteurs inflammatoires tels que des chimiokines (CCL2, CCL5), des interleukines (IL-1 β et IL-6), des facteurs de nécrose tumorale (TNF- α) et des facteurs de croissance endothélial (VEGF). Ces facteurs favorisent la prolifération et l'invasion des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse (Wu et al., 2019).

Les CAA subissent également une reprogrammation métabolique afin de soutenir la prolifération des cellules cancéreuses. Cette reprogrammation implique la régulation de presque tous les macronutriments tels que les glucides, lipides et acides aminés. Les CAA libèrent notamment des acides gras qui sont absorbés par les cellules cancéreuses pour produire l'énergie nécessaire à leur croissance tumorale (Wu et al., 2019).

d) Les cellules immunitaires inflammatoires

Les cellules immunitaires inflammatoires regroupent les macrophages, les cellules natural killer (NK), les lymphocytes T cytotoxiques, les mastocytes et les neutrophiles. Elles sont présentes à la périphérie des tumeurs en grande quantité. Elles sécrètent des facteurs de croissance, des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF2), des chimiokines ainsi que des MMP et d'autres protéases impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire afin de favoriser la migration, l'invasion et la dissémination des cellules cancéreuses (Qian and Pollard, 2010).

e) Les cellules endothéliales (artères, veines et capillaires)

Au sein des tumeurs, certains facteurs pro-angiogéniques activent les cellules endothéliales quiescentes afin de générer de nouveaux vaisseaux sanguins. Les cellules cancéreuses interagissent avec les cellules endothéliales pour permettre l'invasion de tissus ou organes à distance de la tumeur primaire (Egeblad et al., 2010; Nagy et al., 2010).

IV. Les modèles précliniques du cancer du sein

Historiquement, les modèles précliniques de cancer du sein utilisés sont (Tableau I3) (Murayama and Gotoh, 2019):

- Les lignées de cellules cancéreuses (*in vitro*) : Il s'agit de l'outil le plus fréquemment utilisé pour la recherche sur le cancer du sein car elles sont peu coûteuses, peuvent être utilisées et analysées très facilement et surtout elles sont très nombreuses. En effet, 51 lignées de cancer

du sein (ex : BT474, HCC1954, MCF10A, MCF7, MDA-MB231) sont utilisées et reflètent les caractéristiques génomiques et transcriptionnelles de 145 types de tumeurs primaires mammaires (Neve et al., 2006). Cependant, les cellules cancéreuses cultivées *in vitro* manquent d'interaction avec le microenvironnement tumoral (Imamura et al., 2015).

- Les modèles de xénogreffes de lignées cellulaires : Elles sont très largement utilisées pour étudier l'interaction entre les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral. Les lignées cellulaires cancéreuses sont cultivées *in vitro* puis transplantées dans des souris immunodéficientes de façon orthotopique pour que le microenvironnement tumoral ressemble à celui des patientes. Cependant, la culture cellulaire *in vitro* des lignées de cellules cancéreuses sur le long terme entraîne la perte des caractéristiques hétérogènes des tumeurs d'origine et peut modifier les propriétés des lignées de cellules cancéreuses.

- Les modèles de souris génétiquement modifiées : Ce sont des outils très pratiques pour comprendre l'impact d'un gène spécifique sur le processus d'initiation de la tumeur, son développement précoce et sa rechute après traitement (Shibata et al., 2018). Ils sont établis par différentes approches (Menezes et al., 2014). Une de ces approches consiste à injecter directement l'ADN d'un gène exogène d'intérêt (ex : oncogènes *PyMT*, *RAS*, *c-MYC*, *HER2/NEU*) sous l'influence d'un promoteur spécifique de la glande mammaire (ex : MMTV-LTR, WAP, C3, BLG, MT) dans un ovule fécondé (Voncken, 2011). Une autre approche consiste à neutraliser le gène d'intérêt (ex : gènes suppresseurs de tumeurs *TP53*, *PTEN*) en introduisant une version modifiée du gène suppresseur de tumeurs dans des cellules souches embryonnaires de souris. Le système Cre/LoxP a permis les knock-in et knock-out conditionnels dans la glande mammaire. Cependant, ces modèles ne peuvent pas imiter complètement les tumeurs humaines et reproduire leur hétérogénéité. De plus, l'établissement de tous ces modèles prend plus de temps.

Récemment, de nouveaux modèles précliniques sont apparus et présentent des avantages par rapport aux modèles précédents :

- Les modèles de xénogreffes de cancer du sein dérivés de patients (Murayama and Gotoh, 2019; Zhang et al., 2013) : Ce sont des outils puissants pour mieux prédire l'efficacité des médicaments, mieux comprendre les caractéristiques des tumeurs mammaires et mieux refléter l'hétérogénéité des tumeurs. Ils sont établis par le transfert de tumeurs humaines dans des souris hautement immunodéficientes. Ces modèles permettent de conserver les caractéristiques histologiques et génétiques originales des tumeurs des patientes, et sont capables de présenter des réponses aux traitements similaires à celles observées chez les patientes. Ces modèles sont également utilisés pour étudier les métastases (Eyre et al., 2016;

Liu et al., 2019). Cependant, ces modèles coutent très cher à mettre en place et ne peuvent pas prédire complètement l'efficacité des médicaments car ils ne récapitulent pas le microenvironnement d'origine (cellules immunitaires).

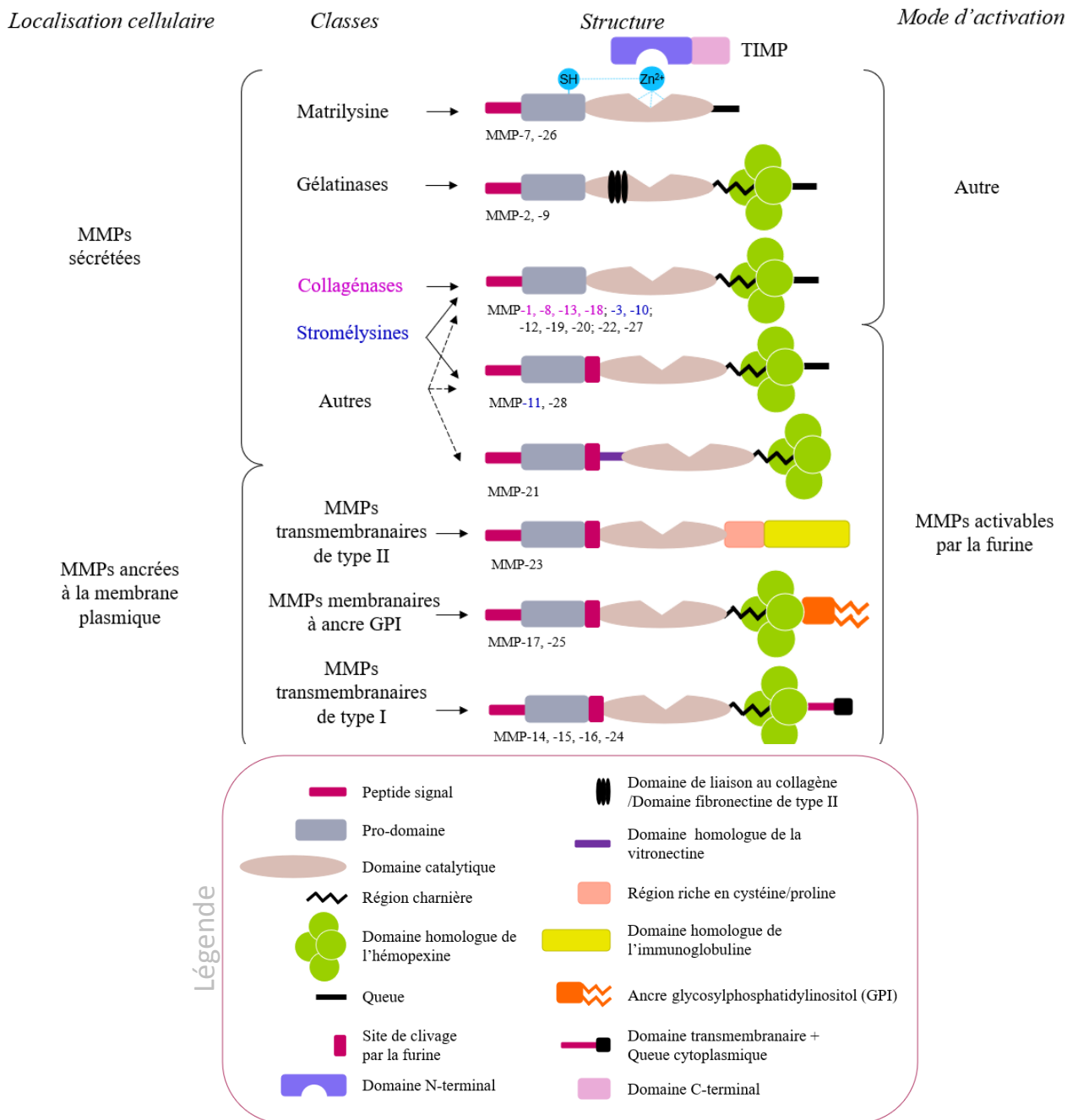


Figure I8 : Organisation structurale des MMP

Les MMP peuvent être classées selon plusieurs critères :

A gauche. Les MMP peuvent être classées selon leur localisation cellulaire : (i) sécrétées dans le milieu extracellulaire ou (ii) ancrées à la membrane plasmique. *Au centre.* Elles peuvent être réparties selon leur structure et leur spécificité de substrat. Elles possèdent plusieurs domaines en commun : le peptide signal, le prodomaine et le domaine catalytique dont l'ion zinc interagit avec le groupement thiol du prodomaine pour maintenir l'enzyme sous sa forme zymogène. Elles possèdent également des domaines spécifiques incluant les domaines d'homologie à l'hémopexine, à la vitronectine, à l'immunoglobuline ; le site de clivage par la furine ; des domaines hydrophobes transmembranaires (région riche en cystéine/proline, ancre GPI, domaine transmembranaire). *A droite.* Une autre classification prend en compte leur mécanisme d'activation : (i) par une protéase à sérine du réseau trans-golgien (la furine) ou (ii) par d'autres mécanismes plus complexes dans le milieu extracellulaire (Inspiré de Ra et Parks, 2007).

CHAPITRE 2 : LA MMP11

I. Description de la MMP11

A. Les MMP

Les métalloprotéases matricielles (MMP) appartiennent au groupe des metzincines et regroupent 30 endopeptidases dépendantes du zinc et du calcium. Elles présentent un motif consensus de fixation du zinc dans leur site catalytique (Visse and Nagase, 2003). Fonctionnellement, les MMP dégradent les composants de la matrice extracellulaire tels que les fibres de collagène et d'élastine, et les glycoprotéines (fibronectine, laminine, etc.), ainsi que les composants non matriciels (protéases, facteurs de croissance, cytokines, etc.) (Kessenbrock et al., 2010).

Les MMP sont divisées en 6 classes selon leur structure et leur spécificité de substrat : 1/ les matrilysines, 2/les gélatinases, 3/les collagénases, 4/les stromélysines, 5/les MMP liées aux membranes et 6/les autres (**Figure I8**) (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010).

Les MMP sont synthétisées sous forme de proenzyme inactive (ou zymogène). Elles possèdent plusieurs domaines en commun (**Figure I8**) (Bassiouni et al., 2021; Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010; Ra and Parks, 2007) :

- Le peptide signal, qui permet l'adressage extracellulaire des proenzymes
- Le prodomaine, qui garde la proenzyme sous forme inactive
- Le domaine catalytique, qui fixe un ion zinc pour assurer l'activité enzymatique
- Le domaine hémapexine (pour certaines MMP), qui permet la reconnaissance du substrat et donne la spécificité de substrat à l'enzyme

En outre, il existe des domaines spécifiques à chacune des 6 classes de MMP (**Figure I8**) :

- Le domaine homologue de la vitronectine (ex : MMP21)
- Le domaine de liaison au collagène/domaine fibronectine de type II (ex : MMP2)
- Le domaine riche en cystéine/proline (ex : MMP23)
- Le domaine homologue de l'immunoglobuline (ex : MMP23)
- L'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) (ex : MMP17)
- Le domaine transmembranaire (et la queue cytoplasmique) qui permet l'ancrage des MMP dans la membrane plasmique (ex : MMP14)

Les MMP sont maintenues sous forme inactive par interaction du groupement thiol du prodomaine avec l'ion zinc du site catalytique. Cette inactivation est nécessaire pour réguler de

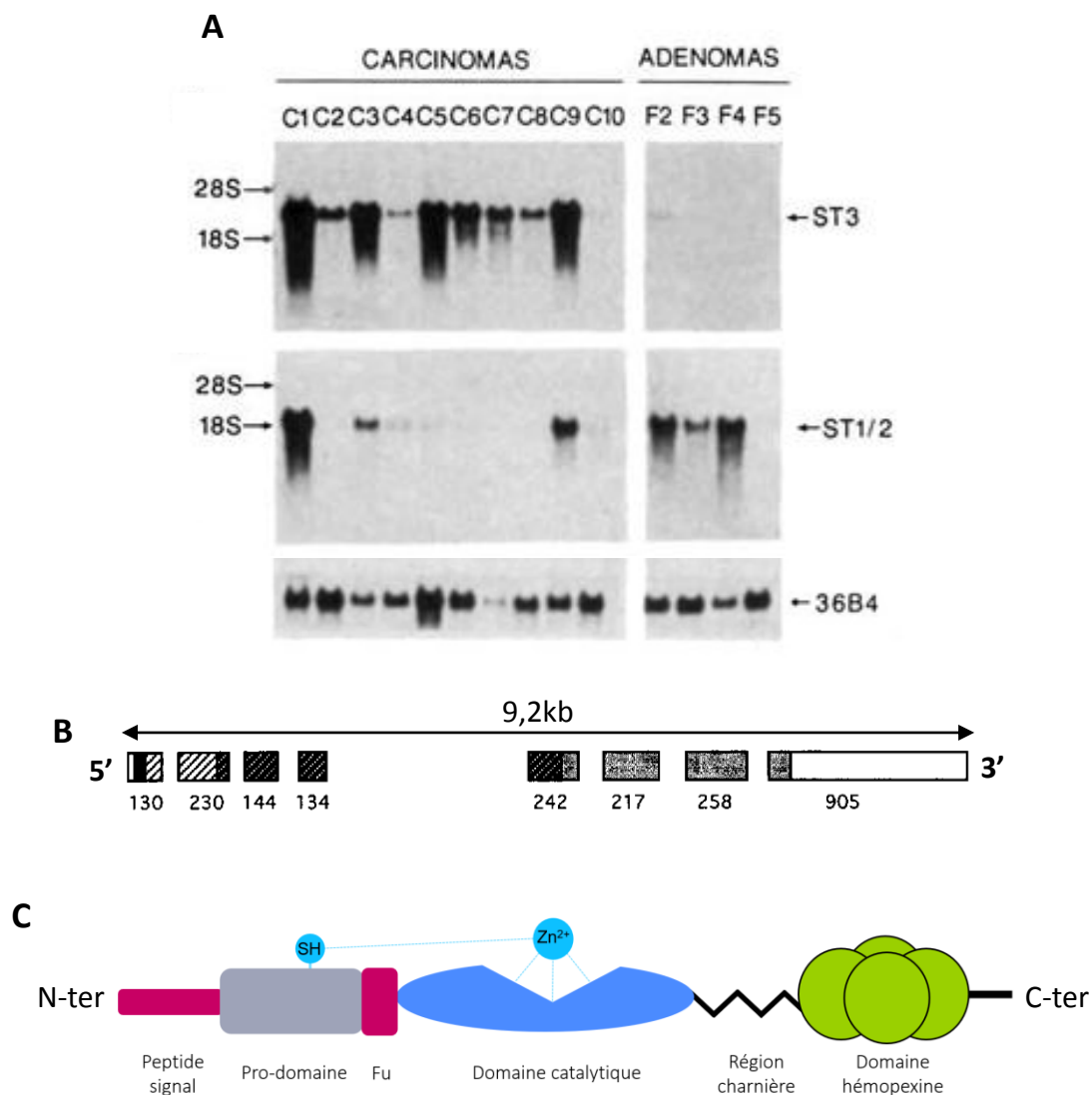


Figure I9 : Caractérisation de la MMP11 (stromélysine-3) humaine

A. Découverte de la MMP11. Analyse par Northern blot de l'ARN des stromélysine-1 (MMP3), -2 (MMP10) et -3 (MMP11) humaines dans les tumeurs mammaires. L'ARN total a été préparé à partir de quatre carcinomes mammaires RE- (C1 à C4), six carcinomes mammaires RE+ de différents grades (C5 à C10), et quatre fibroadénomes mammaires (F2 à F5). Le signal 36B4 correspond à l'ARN d'un gène témoin. L'ARN de stromélysine-3 est détecté dans les carcinomes mammaires mais pas dans les fibroadénomes (Adapté de Basset et al., 1990).

B. Organisation des exons du gène de la MMP11. Le gène de la MMP11 s'étend sur 9,2 kb et contient 8 exons. Les régions des exons correspondent aux domaines protéolytiques suivants : (de gauche à droite) peptide signal (case noire pleine), pro-domaine (case claire rayée en diagonale), domaine catalytique (case sombre rayée en diagonale), domaine homologue à l'hémapexine (case grise). Les cases blanches représentent les séquences non traduites 5' et 3' (Adapté de Anglard et al., 1995).

C. Représentation schématique de la protéine MMP11. La protéine MMP11 comporte 5 domaines fonctionnels : un peptide signal en N-terminal, un pro-domaine avec un groupement thiol (SH), un site de clivage par la furine (Fu), un domaine catalytique avec un ion zinc (Zn²⁺) et un domaine hémapexine (Adapté de Basset et al., 1993).

manière spatio-temporelle l'activité de ces enzymes puisque certaines possèdent de nombreux substrats (<http://cutdb.burnham.org/>). Ainsi, en temps et lieu, le prodomaine est enlevé afin de libérer le site catalytique de l'enzyme qui devient active. Cette activation se produit intra- ou extra-cellulairement et nécessite une ou plusieurs étapes selon les MMP. Dans les tissus, l'activité protéolytique des MMP peut être bloquée par quatre inhibiteurs spécifiques de MMP, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) (Bassiouni et al., 2021; Bode and Maskos, 2005; Löffek et al., 2011).

Les MMP sont en général faiblement exprimées en conditions physiologiques mais leur expression est fortement induite lors de nombreux processus associés au remodelage physiologique (l'embryogenèse) et pathologique (progression tumorale) (López-Otín and Bond, 2008; Overall and Blobel, 2007; Quesada et al., 2009). Les MMP forment la plus importante famille de protéases impliquées dans la tumorigenèse (Kessenbrock et al., 2010).

B. Découverte de la MMP11

La MMP11 (ou stromélysine-3) a été découverte par Paul Basset, suite à un criblage différentiel entre un carcinome mammaire et un fibroadénome. Quatre gènes ont été identifiés qui étaient surexprimés dans le carcinome mammaire mais pas dans le fibroadénome (Figure I9A). Un gène parmi les quatre gènes identifiés a été sélectionné du fait de son manque d'expression dans plusieurs tissus normaux. A partir de la séquence d'ADN complémentaire de ce gène, la séquence protéique a été obtenue puis comparée aux séquences de la banque de données Swiss-Prot. Cela a permis de déterminer que la protéine d'intérêt était une MMP avec des similarités de séquences avec les stromélysines-1 (MMP3) et -2 (MMP10), elle a donc été nommée stromélysine-3 (MMP11) (Basset et al., 1990). Contrairement aux stromélysines-1 et -2, la stromélysine-3 a un mécanisme d'action et une activité protéolytique bien distincts (Murphy et al., 1993; Pei and Weiss, 1995; Santavicca et al., 1996). De plus, la MMP11 a un profil d'expression particulier, puisqu'elle est exprimée par les cellules stromales des cancers du sein, et a des fonctions particulières (Rio, 2002, 2005).

C. Organisation génomique de la MMP11

Le gène *MMP11* est localisé sur le chromosome humain 22q11.2 et sur la bande C du chromosome 10 de la souris (Cole et al., 1998; Levy et al., 1992). Ce gène s'étend sur 9,2 kb chez l'Homme et sur 11,5 kb chez la souris. Il contient 8 exons et 7 introns. L'exon 1 code pour le peptide signal et une partie du pro-domaine, l'exon 2 code pour le reste du pro-domaine et une partie du domaine catalytique, les exons 3 à 5 codent pour le reste du domaine catalytique

et une partie du domaine hémapexine, et les exons 6 à 8 codent pour le reste du domaine hémapexine et la région 3'UTR non traduite (Figure 19B) (Anglard et al., 1995).

Chez l'Homme et la souris, le promoteur du gène *MMP11* contient dans la région 5' en amont de la boîte TATA, un élément RARE proximal de type DR-1 et deux éléments RARE distaux de type DR-2 (Anglard et al., 1995; Dupé et al., 1999; Guérin et al., 1997). D'autres éléments distaux sont présents au niveau du promoteur, dont un élément de type AP1 qui n'est pas présent chez la souris, et un (humain) ou deux (souris) site(s) de liaison à CEBP β . Le promoteur contient aussi un site de liaison au facteur GAGA et un élément sensible aux hormones thyroïdiennes (TRE) (Ludwig et al., 2000; Luo et al., 1999).

D. Régulation de l'expression du gène de la MMP11

L'activité du promoteur du gène *MMP11* est induite par l'acide rétinoïque en se fixant sur les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) agissant ainsi sur l'élément de réponse à l'acide rétinoïque DR1. Le DR1 est suffisant pour assurer l'activité du promoteur du gène *MMP11* *in vitro* et est responsable, au moins partiellement, de l'expression de la MMP11 *in vivo* (Dupé et al., 1999; Guérin et al., 1997). L'élément de type AP1 est responsable de l'activité basale de la MMP11. Les sites CEBP sont impliqués dans l'induction de l'expression du gène *MMP11* par le TPA (Ludwig et al., 2000; Luo et al., 1999). L'élément TRE est fonctionnel chez la grenouille puisqu'il répond directement et immédiatement aux hormones thyroïdiennes (T3) (Shi et al., 2007).

Outre l'importance qui est donnée à la régulation de l'expression du gène *MMP11*, par la suite, la protéine MMP11 est également régulée via la conversion du zymogène en enzyme active par la furine, au moment de son interaction avec des inhibiteurs, et également par sa compartimentalisation.

E. Structure de la protéine MMP11

Le gène *MMP11* code pour une pré-pro-protéine qui possède plusieurs domaines en commun avec les autres MMP tels qu'un peptide signal, un pro-domaine et un domaine catalytique dont l'ion zinc interagit avec le groupement thiol du pro-domaine pour bloquer l'enzyme qui se retrouve donc sous sa forme inactive. En plus de ces domaines, la MMP11 possède également deux autres domaines spécifiques que sont le site de clivage par la furine et le domaine hémapexine (Figure 19C) (Basset et al., 1993; Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010; Luo et al., 1999; Visse and Nagase, 2003).

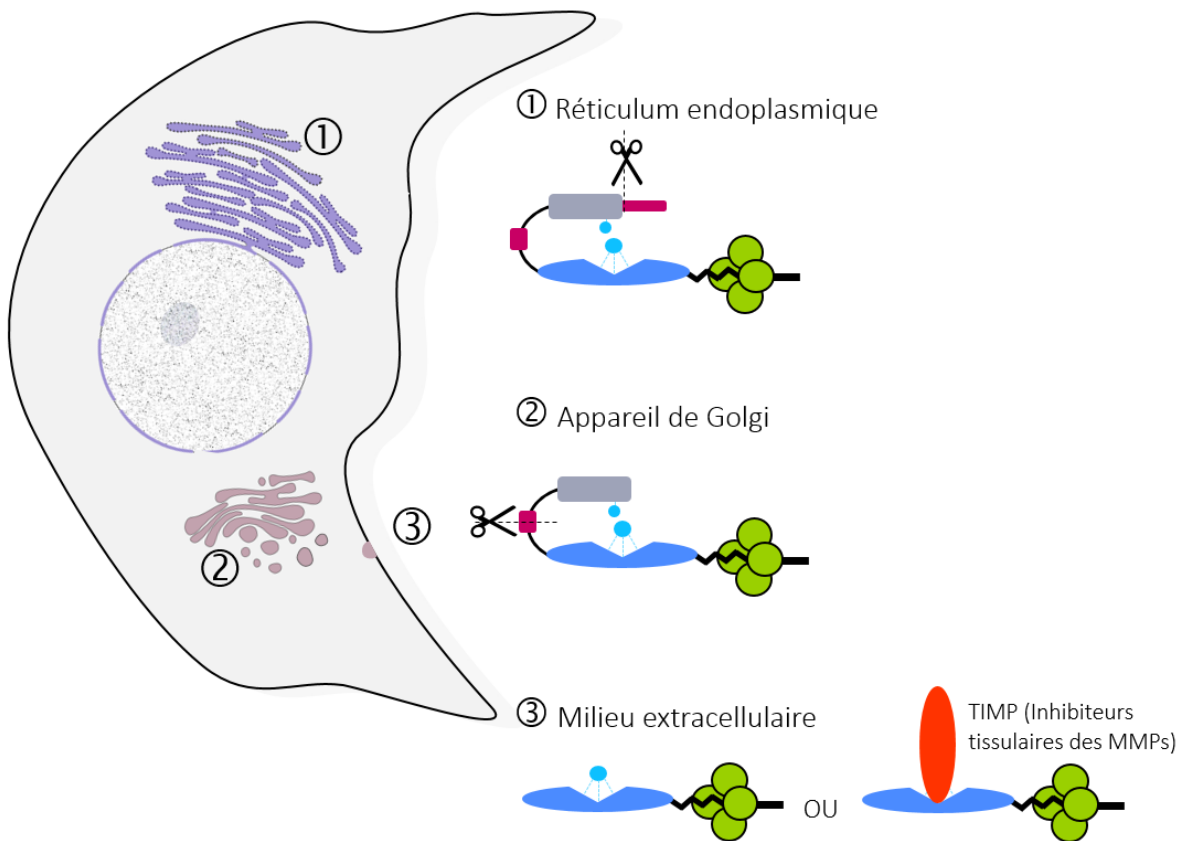


Figure I10 : Processus de synthèse et d'activation de la MMP11

Lors de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, la MMP11 se replie de manière à ce que l'ion zinc et le groupement thiol interagissent ensemble et bloquent l'enzyme sous forme inactive. Le peptide signal est également clivé. A la fin de sa synthèse, la MMP11 est transportée dans le Golgi pour être clivée par la furine au niveau d'un motif spécifique entre le domaine catalytique et le pro-domaine. Le pro-domaine est donc retiré, le domaine catalytique est libéré, la MMP11 est donc sous sa forme mature active. La MMP11 est ensuite sécrétée sous sa forme active dans le milieu extracellulaire où des inhibiteurs (ex : TIMP) peuvent interagir avec elle.

F. Structure cristallographique de la MMP11

La structure du domaine catalytique de la MMP11 a été découverte dans le laboratoire de biologie structurale de Dino Moras par Marc Ruff et Anne-Laure Gall. La structure obtenue est celle du complexe entre une forme recombinante du domaine catalytique de la MMP11 de souris et un inhibiteur phosphinique. Elle a été déterminée par cristallographie aux rayons X et a une résolution de 2.6Å. Cette structure montre que le domaine catalytique de la MMP11 de souris adopte le repliement canonique des MMP et que la poche de spécificité (ou site actif) des MMP correspond à un long tunnel, chargé négativement, traversant l'enzyme. A la surface de ce tunnel, l'atome de zinc catalytique est fixé par les chaînes latérales de trois résidus histidines. Le domaine catalytique comprend un feuillet β à 5 brins et 3 hélices α . L'inhibiteur mimant l'intermédiaire réactionnel formé au cours de la réaction de protéolyse, la structure renseigne également sur le mécanisme de protéolyse des MMP. A partir des informations relatives au mode de fixation de l'inhibiteur phosphinique dans le site actif de la MMP11, des inhibiteurs synthétiques plus spécifiques pourront être développés (Gall et al., 2001).

G. Processus de synthèse et d'activation de la MMP11

Lors de sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, la MMP11 se replie pour que l'ion zinc du domaine catalytique et le groupement thiol du pro-domaine interagissent ensemble et bloquent l'enzyme sous forme inactive. Le peptide signal est également clivé. A la fin de sa synthèse, la pro-forme de la MMP11 (54kDa) est transportée dans l'appareil de Golgi pour être clivée par la furine au niveau du C-terminal d'un motif unique Arg-X-Arg-X-Lys-Arg situé entre le domaine catalytique et le pro-domaine (Pei and Weiss, 1995; Santavicca et al., 1996). Par conséquent, le pro-domaine est retiré, le domaine catalytique est libéré, la MMP11 est donc sous sa forme mature active (45kDa). Contrairement aux autres MMP, La MMP11 est donc ensuite sécrétée sous sa forme active dans le milieu extracellulaire où des inhibiteurs spécifiques (TIMP) peuvent interagir avec elle (Figure I10). La MMP11 peut également être inactivée par la MMP14 (Buache et al., 2014).

H. Substrats de la MMP11

Les MMP sont des enzymes capables de dégrader des composants de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, fibronectine, laminine), ainsi que des composants non matriciels (protéases, facteurs de croissance, cytokines, etc.) (Kessenbrock et al., 2010), cependant la MMP11 a une spécificité de substrat restreinte étant donné que ces seuls substrats

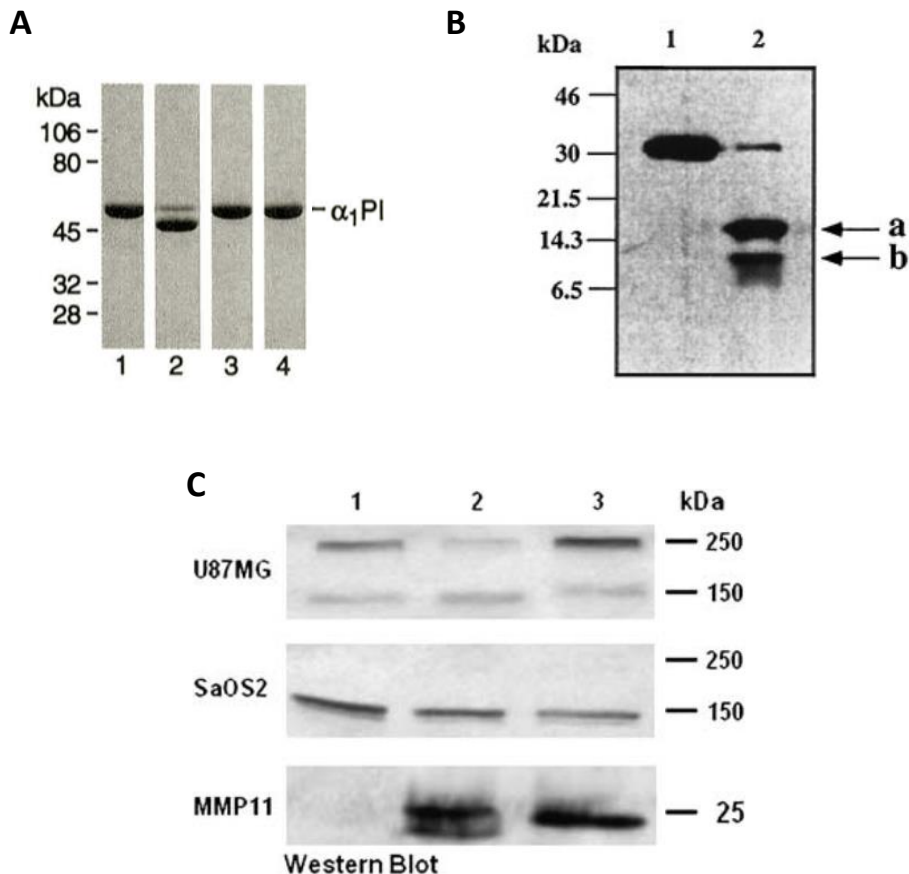


Figure I11 : Les substrats de la MMP11

A. Clivage de l' α_1 -PI par la MMP11 humaine : L' α_1 -PI purifié a été incubé seul (1) ou avec la MMP11 en l'absence (2) ou en présence d'inhibiteurs de la MMP11 [TIMP-1 (3) et BB-94 (4)] pendant 3 heures à 37°C. Les produits de digestion ont ensuite été analysés par immunoblot. La MMP11 clive α_1 -PI par un processus qui est inhibé par ses inhibiteurs (Adapté de Pei et al., 1994).

B. Clivage d'IGFBP1 par la MMP11 : L'IGFBP1 humaine recombinante est incubée seule (1) ou en présence de la MMP11 humaine recombinante (2) pendant 18 heures à 37°C. Les produits de digestion sont analysés par immunoblot. On remarque que le clivage d'IGFBP1 par la MMP11 génère deux fragments de 16 kDa (a) et 9 kDa (b) (Adapté de Mañes et al., 1997).

C. Clivage de la chaîne α_3 (250 kDa) du collagène VI par la MMP11 : Le collagène VI natif présent dans le milieu concentré conditionné par les cellules humaines U87MG (chaînes α_1 , α_2 , α_3) et SaOS2 (chaînes α_1 , α_2), est incubé seul (1), ou avec la MMP11 recombinante humaine active (2) et inactive (3) pendant 4,5 heures à 37°C. Les produits de digestion sont analysés par immunoblot. Le traitement par la MMP11 active n'a pas d'effet sur la bande de 150 kDa (chaînes α_1 , α_2) du collagène VI des deux lignées cellulaires. L'intensité de la bande de 250 kDa (chaîne α_3) du collagène VI des cellules U87MG est cependant considérablement réduite en présence de MMP11 active, ce qui indique que la chaîne α_3 est clivée par la MMP11. La MMP11 inactive n'a aucun effet (Adapté de Motrescu et al., 2008).

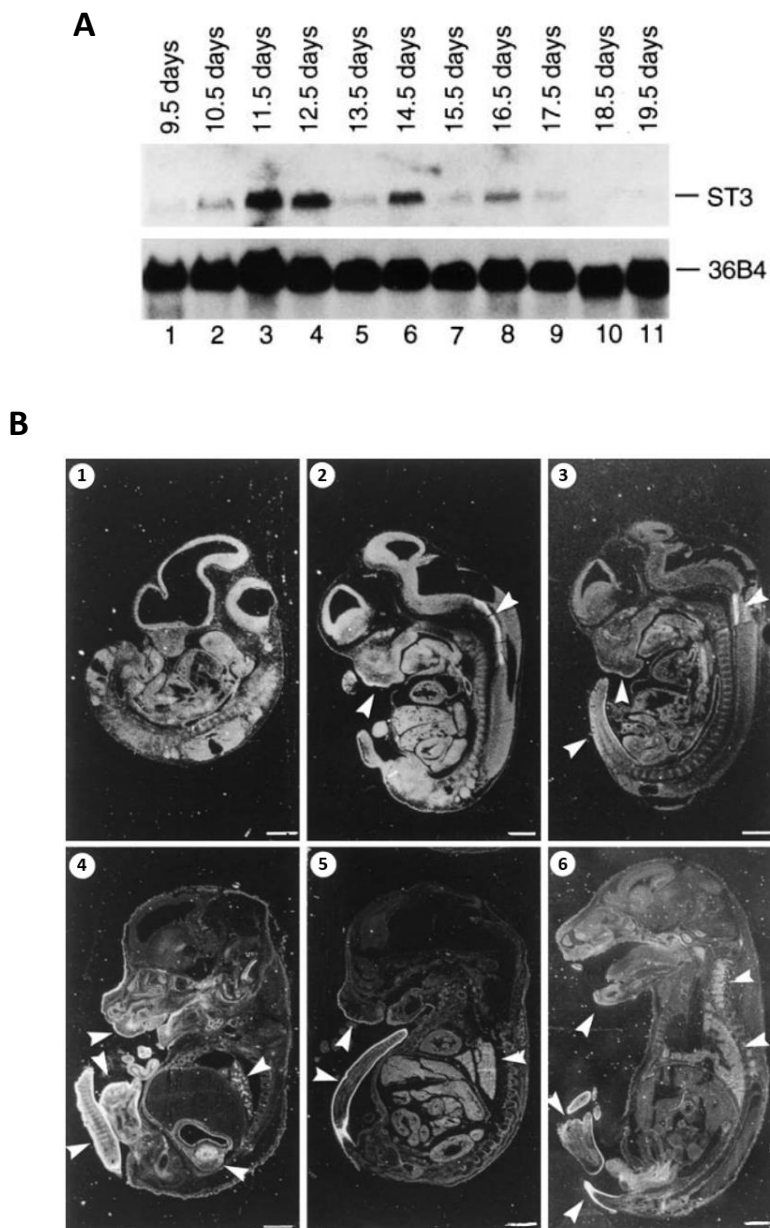


Figure I12 : Impact de la MMP11 lors du développement embryonnaire murin

A. Expression de la MMP11 au cours de l'embryogenèse. L'ARNm de la MMP11 provenant d'embryons murins, âgés de 9,5 jours à 19,5 jours (1 à 11), est analysé par Northern blot. L'ARNm de 36B4 a été utilisé comme contrôle interne positif. L'ARNm de la MMP11 est exprimé à différents niveaux tout au long du développement de la souris (Adapté de Lefebvre et al., 1995).

B. Distribution tissulaire de la MMP11 dans les embryons murins. Photographies en fond noir de sections midsagittales d'embryons âgés de 11,5 (1), 12,5 (2), 13,5 (3), 14,5 (4), 15,5 (5) et 16,5 (6) jours, hybridées avec une sonde d'ARN antisens spécifique de la MMP11 de souris. Les pointes de flèche indiquent la présence d'ARN de MMP11. De 12,5 à 16,5 jours, la présence de l'ARN de MMP11 est évidente dans le museau en développement (2 à 6), la moelle épinière (2 et 3), la queue (3 à 6), les membres (4 et 6), les testicules (4), les poumons (4 à 6) et les os (6) (Adapté de Lefebvre et al., 1995).

connus sont l' α 1-PI (Figure I11A), l'IGFBP1 (Figure I11B) et le collagène VI (Figure I11C) (Mañes et al., 1997; Motrescu et al., 2008; Pei et al., 1994).

I. Rôle physiologique de la MMP11

La MMP11 est impliquée dans le métabolisme et surtout dans différents processus de remodelage tissulaire chez les mammifères et les amphibiens tels que le développement embryonnaire, le développement de la glande mammaire et l'adipogenèse. En revanche, elle n'est pas indispensable à la vie car les souris déficientes pour la MMP11 sont viables et fertiles (Masson et al., 1998; Rio, 2005).

1. Développement embryonnaire

La MMP11 est impliquée dans le remodelage tissulaire lors de la période embryonnaire chez les mammifères (Lefebvre et al., 1995).

Lors du développement embryonnaire de la souris, l'ARN de MMP11 est détecté dans les cellules trophoblastiques au niveau du site d'implantation embryonnaire de la souris puis elle est détectée dans de nombreux tissus embryonnaires murins en développement tels que les membres, la queue, le museau, les os et la moelle épinière (Figure I12) (Lefebvre et al., 1995; Masson et al., 1998). Dans les membres, la queue et le museau, la MMP11 est exprimée dans les cellules mésenchymateuses tapissant la membrane basale à la jonction du derme et de l'épiderme primitifs et dans les cellules mésenchymateuses adjacentes aux cellules épithéliales en cours de prolifération et/ou d'apoptose. Dans les os, la MMP11 est exprimée dans les cellules mésenchymateuses invasives. Dans la moelle épinière, la MMP11 est exprimée dans les cellules neuroépithéliales de la plaque du plancher (Lefebvre et al., 1995). La MMP11 est également exprimée dans le tissu musculaire strié squelettique de la langue chez la souris (Chin et Werb, 1997). La MMP11 est aussi exprimée dans la zone de plus en plus petite de cellules indifférenciées vers la marge externe de la decidua au niveau du site d'implantation (Alexander et al., 1996).

Au cours de la placentation humaine, la MMP11 est exprimée dans les trophoblastes extravillaires qui envahissent la decidua maternelle et elle est exprimée dans les syncytiotrophoblastes qui tapissent les espaces vasculaires intervillaires dans les villosités flottantes (Maquoi et al., 1997).

Pour finir, la MMP11 intervient également lors du remodelage tissulaire dans divers organes des amphibiens durant leur métamorphose puis son expression se perd lors de la vie terrestre (Ishizuya-Oka et al., 1996; Mathew et al., 2010; Patterson et al., 1995). Elle est

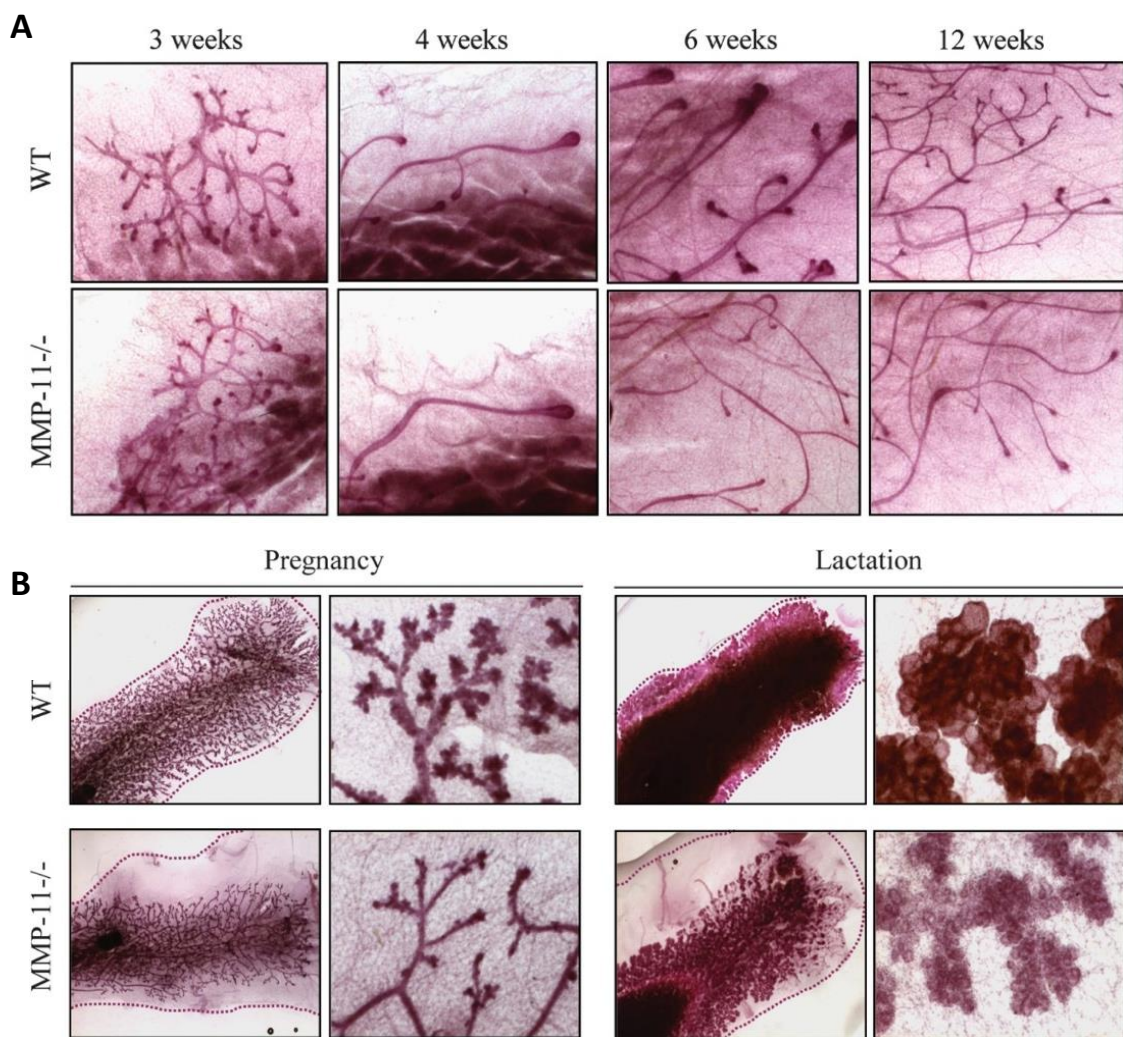


Figure I13 : Impact de la MMP11 dans le développement de la glande mammaire murine

A. Coloration au rouge carmin de glandes mammaires de souris sauvages (WT) et knock-out pour la MMP11 (MMP11^{-/-}) âgées de 3, 4, 6 et 12 semaines. On observe moins de TEB (bourgeons terminaux) et les canaux galactophores sont moins développés dans les glandes mammaires des souris MMP11^{-/-} (Adapté de Tan et al., 2014).

B. Coloration au rouge carmin de glandes mammaires de souris sauvages (WT) et knockout pour la MMP11 pendant la grossesse (10^{ème} jour) et la lactation (3^{ème} jour). Les lignes pointillées violettes délimitent les contours du tissu adipeux de la glande mammaire. La morphogenèse et la différenciation alvéolaire sont altérées dans les glandes mammaires des souris MMP11^{-/-} (Adapté de Tan et al., 2014).

également requise pour la migration cellulaire et l'apoptose pendant le remodelage des tissus chez *Xenopus laevis* (Damjanovski et al., 1999; Ishizuya-Oka et al., 2000).

2. Développement de la glande mammaire

Chez les mammifères adultes, la MMP11 est uniquement exprimée au cours de remodelages tissulaires physiologiques au niveau de tissus féminins (placenta, utérus, glande mammaire) et au niveau de la peau lors du processus de cicatrisation. En effet, elle participe à l'involution de l'utérus après l'accouchement, à la rupture des menstruations de l'endomètre, au développement post-natal de la glande mammaire et à l'involution de la glande mammaire après le sevrage. Des données suggèrent que la MMP11 stromale est impliquée dans la morphogenèse et la croissance de l'épithélium mammaire de manière paracrine. Des souris déficientes pour la MMP11 présentent une altération de la morphogenèse du canal mammaire, une altération de la morphogenèse et de la différenciation alvéolaire mammaire lors de la grossesse et de la lactation ([Figure I13](#)) (Lefebvre et al., 1992, 1995; Rio, 2005; Tan et al., 2014).

3. Adipogenèse

L'adipogenèse est un processus complexe régulé par de multiples facteurs comme les hormones et les facteurs sécrétés par la niche de différenciation adipocytaire (Cristancho and Lazar, 2011). La différenciation adipocytaire s'accompagne de l'activation d'une cascade de facteurs de transcription dont les plus importants sont CEBP β et PPAR γ (Farmer, 2006). Après une phase de croissance exponentielle, l'adipoblaste (morphotype fibroblastique) atteint un stade de confluence marqué par un arrêt de la multiplication cellulaire nécessaire pour l'engagement vers la différenciation adipocytaire des cellules qui deviennent des préadipocytes. La différenciation des préadipocytes est caractérisée par un changement de morphologie d'une forme allongée (fibroblast-like) à une forme ronde caractéristique des adipocytes matures qui sont également remplis de lipides. Les adipocytes matures, qui ont accumulé un excès de triglycérides, sont en général considérés comme incapables de se diviser (Farmer, 2006). Dans des conditions de stress, les adipocytes matures peuvent éliminer des gouttelettes lipidiques et se différencier en cellules semblables à des fibroblastes, ce qui serait une façon de limiter les dommages (Shoshani and Zipori, 2011).

La MMP11 a une fonction négative sur l'adipogenèse. En effet, elle entraîne la diminution de la taille des adipocytes et de l'accumulation de lipides. *In vivo*, les souris KO pour la MMP11 ont un poids significativement plus élevé et des adipocytes beaucoup plus

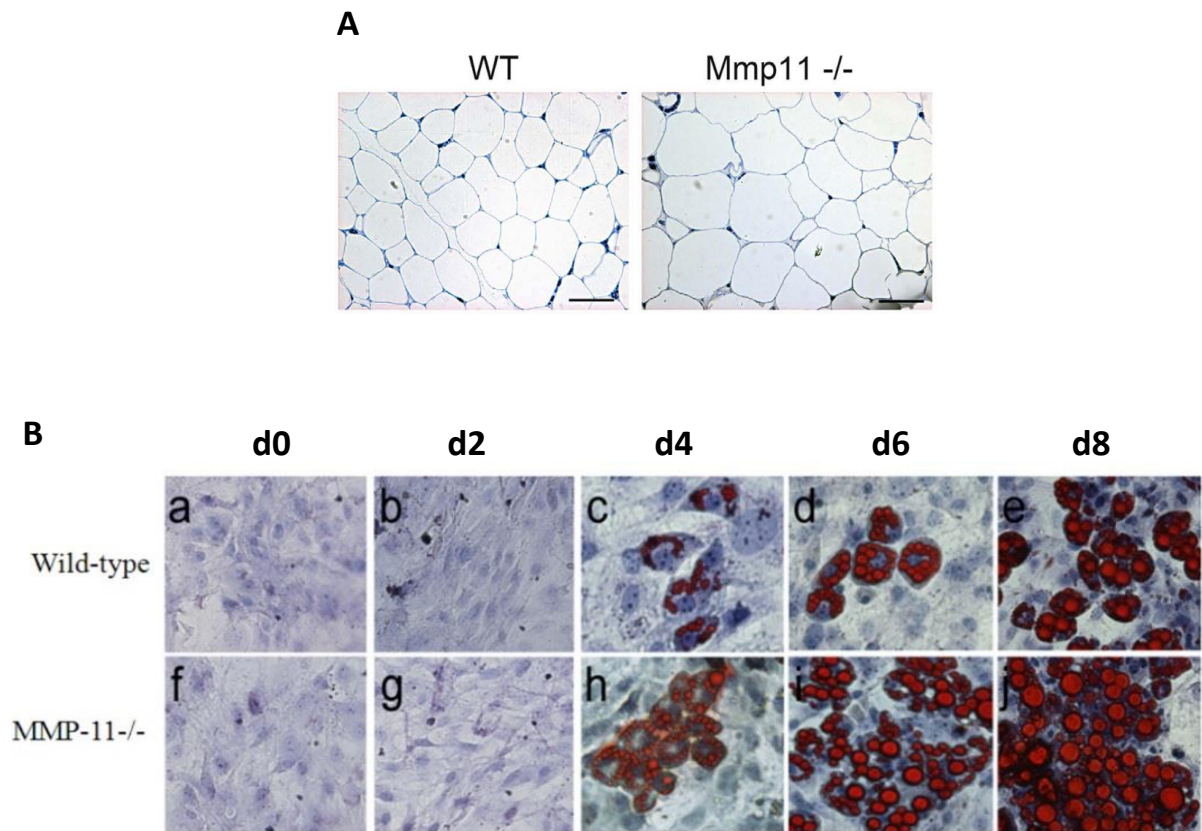


Figure I14 : Fonction négative de la MMP11 sur l'adipogenèse

A. Coloration au bleu de toluidine de coupes semi-fines (barre d'échelle = 50µm) de tissus adipeux blancs de souris sauvages (WT) et knock-out pour la MMP11 (MMP11 -/-). Les adipocytes blancs sont hypertrophiés chez les souris MMP11-/- par rapport aux souris sauvages (Adapté de Dali-Youcef et al., 2016).

B. Coloration Oil red O des lipides des fibroblastes embryonnaires (MEF) sauvages (Wild-type) et knock-out pour la MMP11 (MMP-11-/-) à 0, 2, 4, 6 et 8 jours de différenciation adipocytaire. Une augmentation du nombre et de la taille des gouttelettes lipidiques a été observée dans les MEFs MMP11-/- par rapport au MEFs sauvages à 2 (b,g), 4 (c,h), 6 (d,i) et 8 (e, j) jours de différenciation adipocytaire (Adapté de Andarawewa et al., 2005).

larges que les souris contrôles quel que soit le régime alimentaire auquel elles sont soumises (Figure I14A). Les souris surexprimant la MMP11 ont des adipocytes plus petits et également une masse grasseuse inférieure aux souris sauvages (Andarawewa et al., 2005; Dali-Youcef et al., 2016; Lijnen et al., 2002). *In vitro*, après la différenciation de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), il y a une accumulation lipidique plus importante dans les MEF déficientes pour la MMP11 que dans les MEF sauvages (Figure I14B) (Andarawewa et al., 2005; Motrescu et al., 2008).

Dépendamment de son rôle négative sur l'adipogenèse, la MMP11 protège du diabète de type II et favorise le changement de métabolisme (Dali-Youcef et al., 2016).

4. Métabolisme

L'impact de la MMP11, et des autres MMP, sur le métabolisme est discuté dans une revue qui va être soumise au journal Cells. Cette revue, intitulée « Metabolic Functions Of Matrix Metalloproteinases And Their Inhibitors In Health And Disease », est incluse à la fin de cette partie « Rappels bibliographiques ».

II. MMP11 et cancer

A. MMP11 et cancer du sein

1. Implications biologiques de MMP11 dans le cancer du sein invasif

D'après les bases de données obtenues chez des patientes, la MMP11 est surexprimée dans les tumeurs mammaires invasives. Elle est exprimée précocement lors de la transition du cancer *in situ* vers le cancer infiltrant (Basset et al., 1990). On la retrouve plus fréquemment dans les tumeurs primaires (50-100 %) que dans les tumeurs secondaires (30-70 %) (Rio et al., 1996; Rouyer et al., 1994).

La MMP11 n'est pas sécrétée par les cellules cancéreuses mais par les cellules mésenchymateuses (CAF et CAA). L'expression de la MMP11 par les fibroblastes en regard des cellules cancéreuses a été notée dès la découverte du gène (Basset et al., 1990) et cela a été confirmé par d'autres études et dans d'autres cancers (Rio, 2005). La MMP11 peut être utilisée comme marqueur typique des fibroblastes présents au sein des tumeurs (CAF). Les cellules cancéreuses invasives induisent également l'expression de la MMP11 par les adipocytes au niveau du front d'invasion (Andarawewa et al., 2005). La MMP11 est un facteur paracrine clé qui régule négativement l'adipogenèse en limitant la différenciation des pré-adipocytes et/ou

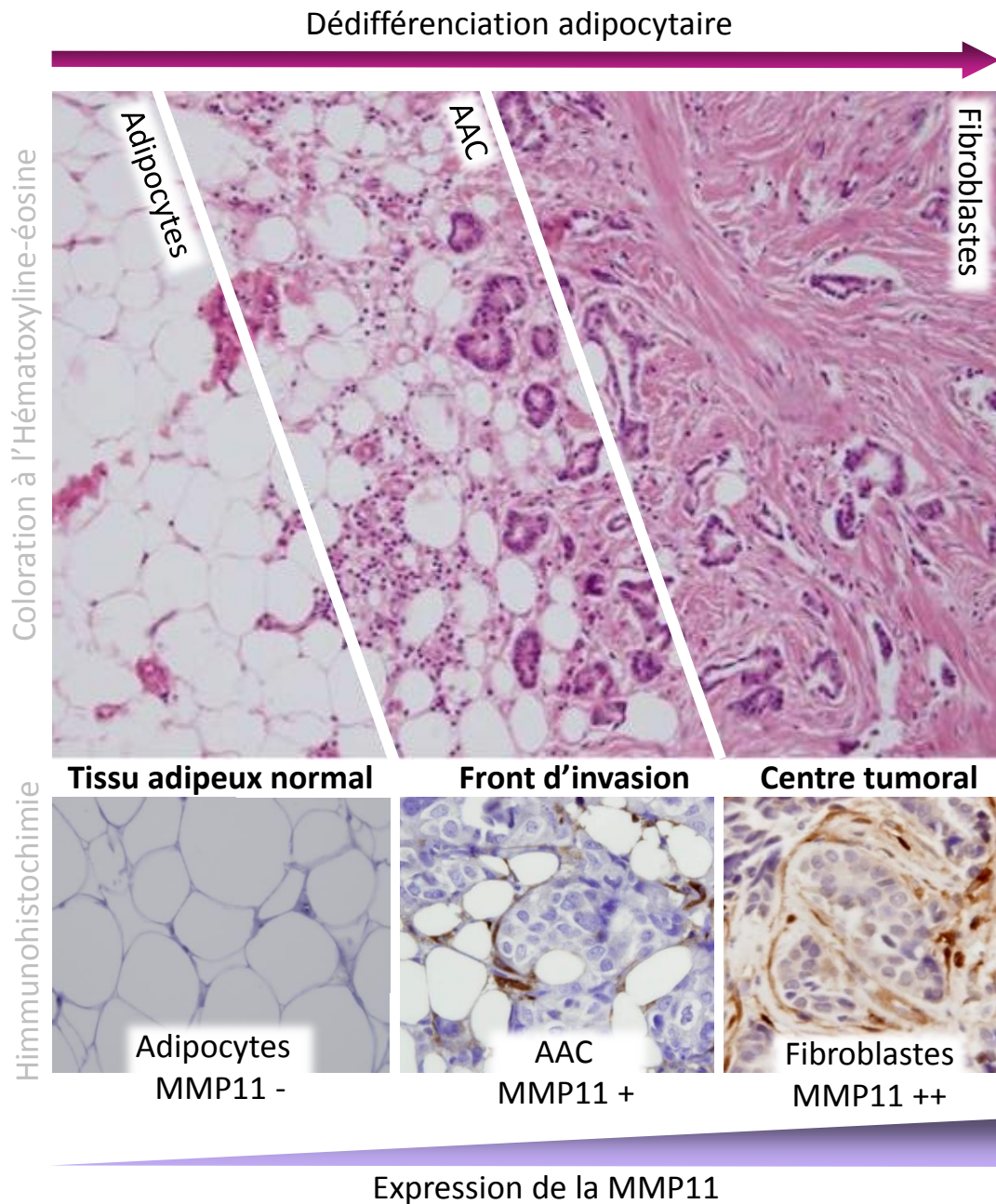


Figure I15 : Relation entre la dédifférenciation adipocytaire et l'expression de la MMP11 dans un cancer du sein invasif

Coloration à l'hématoxyline-éosine et immunohistochimie sur coupe de tumeurs invasives du sein humain. Sur la ligne supérieure, les coupes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine ce qui permet de visualiser les différents composants cellulaires. La ligne inférieure représente 3 coupes histologiques sur lesquelles la présence de la MMP11 a été recherchée avec un anticorps anti-MMP11 et est visualisée en brun.

A gauche de la figure, les adipocytes, avec une morphologie ronde spécifique, n'expriment pas la MMP11. Au centre de la figure, au contact des cellules cancéreuses invasives, les adipocytes présents dans le tissu adipeux normal, se dédifférencient en adipocytes associés au cancer (CAA), qui expriment la MMP11. Les adipocytes en cours de dédifférenciation subissent un remodelage de leur membrane et sécrètent des lipides qui vont servir d'énergie aux cellules cancéreuses. A droite de la figure, les adipocytes ne sont plus là et les cellules présentes expriment fortement la MMP11 et ont une morphologie allongée spécifique des fibroblastes associés aux cancers (CAF). En revanche, les cellules cancéreuses n'expriment pas la MMP11 (Adapté d'Andarawewa et al., 2005/Rio, 2011).

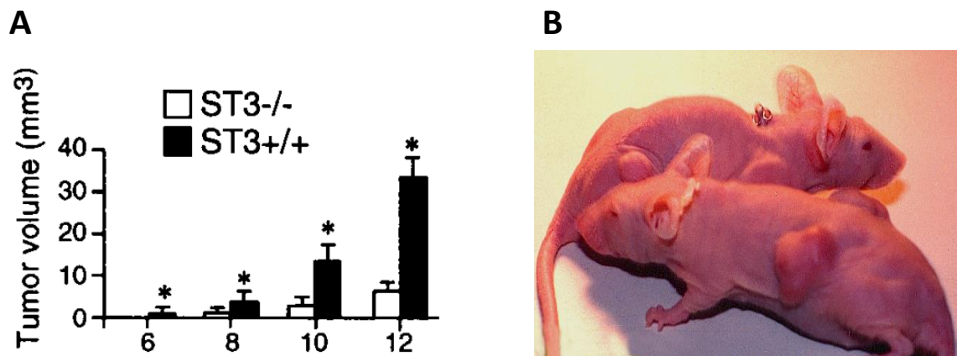


Figure I16 : La MMP11 (ST3) favorise la croissance tumorale

A. Volumes tumoraux de microcarcinomes 6, 8, 10 et 12 jours après l'injection sous-cutanée de cellules cancéreuses syngéniques (C26) réalisées dans des souris immunocompétentes sauvages (ST3+/+) et des souris knock-out pour la MMP11 (ST3-/-). A 6 jours, les tumeurs sont déjà plus petites chez les souris ST3-/- que chez les souris ST3+/+ (0.06 mm³ contre 0.45 mm³). Des différences de taille significatives et similaires ont été observées plus tard aux jours 8, 10 et 12. * : p<0.01 (Adapté de Boulay et al., 2001).

B. Photographies de souris immunodéficientes 5 semaines après l'injection sous-cutanée de cellules MCF7 n'exprimant pas la MMP11 endogène (souris du haut) et de cellules MCF7 transfectées de manière stable afin d'exprimer la MMP11 humaine (souris du bas). L'expression de la MMP11 dans les cellules cancéreuses MCF7 a conduit à l'obtention de tumeurs plus importantes, en raison d'une période sans tumeur plus courte en présence de l'expression de la MMP11 (Adapté de Noël et al., 2000).

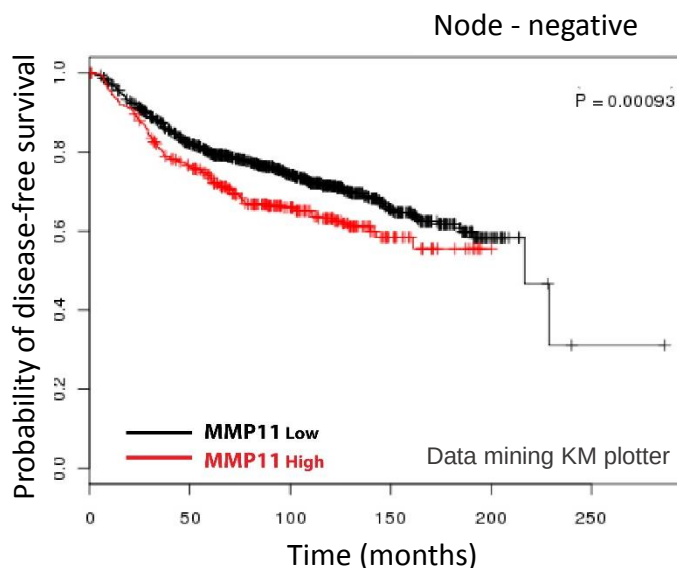


Figure I17 : La MMP11 est un marqueur de mauvais pronostic

Corrélation entre la MMP11 et la survie sans récurrence chez les patientes atteintes d'un cancer du sein clinique à partir de la base de données KM plotter (kmplot.com).

en inversant la différenciation des adipocytes matures, en accumulant et/ou en maintenant des cellules de type fibroblastique au centre de la tumeur et dans l'espace péri-tumoral. Ainsi, au centre de la tumeur, les CAA sont dédifférenciés en CAF. Les CAA deviennent plus petits que ceux observés à distance de la tumeur et tendent vers un phénotype de type fibroblastique probablement à cause de la fonction de dédifférenciation de la MMP11 (Figure I15) (Motrescu and Rio, 2008b; Rio, 2011). Les CAF favorisent l'invasion des cellules tumorales du sein et l'angiogenèse (Eiro et al., 2018). La MMP11 et les CAA participent donc à un cercle vicieux très complexe orchestré par les cellules cancéreuses invasives pour favoriser la progression de la tumeur (Motrescu and Rio, 2008b) ce qui en fait une cible thérapeutique très intéressante pour bloquer la croissance tumorale. Cependant, le mécanisme moléculaire d'action de la MMP11 dans la progression tumorale n'est pas complètement connu. On sait seulement qu'elle est capable de cliver directement ou indirectement la chaîne alpha 3 du collagène de type VI (un collagène de la membrane basale des adipocytes) ce qui permettrait d'expliquer son action sur la dédifférenciation des CAA en CAF (Motrescu and Rio, 2008b).

Par conséquent, la MMP11 contribue à la progression tumorale (Figure I16) (Andarawewa et al., 2003; Boulay et al., 2001; Masson et al., 1998; Rio et al., 1996) par son activité protéolytique bien qu'aucun composant de la membrane basale de l'épithélium mammaire n'a été identifié comme étant dégradé par la MMP11 (Noël et al., 2000; Rio, 2005; Visse and Nagase, 2003).

2. La MMP11 est un marqueur de mauvais pronostic

L'expression élevée de la MMP11 est un facteur paracrine de mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein invasif. La survie globale des patientes est réduite et le risque de récurrence est plus élevé (Figure I17) (Chenard et al., 1996; Min et al., 2013a; Motrescu and Rio, 2008b). La MMP11 est associée à l'invasion tumorale : il s'agit d'une signature d'expression génique qui distingue les carcinomes canauxiaux invasifs (IDC) des carcinomes canauxiaux *in situ* (DCIS) (Hannemann et al., 2006). *In vivo* et *in vitro*, la surexpression de la MMP11 dans les cellules cancéreuses du sein entraîne une augmentation de la capacité de prolifération des cellules et du volume des tumeurs. D'un point de vue moléculaire, cela est associé à la présence d'IGF1 et à la stimulation de la voie IGF1R (Kasper et al., 2007).

3. La MMP11 est un marqueur prédictif du risque de récurrence

La MMP11 est utilisée dans les tests Oncotype DX[®] et PAM50-Prosigna[®] pour prédire la récurrence du cancer du sein. Oncotype Dx[®] est un test de diagnostic, basé sur le niveau d'expression de 21 gènes (dont 16 liés au cancer), qui permet d'estimer le bénéfice de la chimiothérapie et de prédire le risque de récurrence à 10 ans. La MMP11 est la seule MMP qui figure dans cette signature de 21 gènes associés au cancer du sein (Kittaneh et al., 2013).

B. MMP11 et autres cancers

La MMP11 est un facteur paracrine de mauvais pronostic dans tous les carcinomes humains invasifs (Gómez-Macías et al., 2018; Motrescu and Rio, 2008b; Zhang et al., 2016).

Dans plus de 80 % des échantillons de cancers du pancréas, la MMP11 est fortement détectée dans les cellules épithéliales cancéreuses et dans les cellules stromales périphériques, mais pas dans les tissus pancréatiques normaux (Bournet et al., 2012; von Marschall et al., 1998; Rossi et al., 2014).

La MMP11 est détectée dans les échantillons de cancers gastriques, au niveau transcriptionnel et protéique, et sa présence est également plus élevée dans le sérum des patients avec un adénocarcinome gastrique avancé (Deng et al., 2005; Kou et al., 2013; Yan et al., 2011; Zhao et al., 2010).

Le niveau de MMP11 est élevé dans le sérum des patients atteints d'un cancer colorectal, en corrélation avec le mauvais pronostic de ce cancer. La MMP11 est détectée dans les cellules stromales et dans trois lignées cellulaires différentes d'adénocarcinomes du côlon, d'origine épithéliale. En parallèle, le niveau d'expression de l'ARN de MMP11 est inférieur dans les lésions métastatiques du foie et plus élevé dans les sites métastatiques des ganglions lymphatiques (Asano et al., 2008; Barrasa et al., 2012; Pang et al., 2016; Skoglund et al., 2004).

La surexpression de la MMP11 a aussi été identifiée dans différents types de cancers humains tels que le cancer de la prostate (Eiro et al., 2017), le cancer de la vessie (Yonemori et al., 2016), le carcinome rénal (Wu et al., 2014), les carcinomes urothéliaux (Li et al., 2016), et le cancer du col de l'utérus (Valdivia et al., 2011).

C. MMP11 et autres maladies

Dans les plaques d'athérosclérose humaines, l'ARN et la protéine MMP11 ont été observés dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages (Lijnen et al., 1999; Schönbeck et al., 1999).

La MMP11 pourrait également être un facteur génétique associé à la dégénérescence des disques intervertébraux, mais ce n'est pas le seul facteur (Aras et al., 2016).

Dans la population coréenne, un SNP de la MMP11 pourrait être associé à la maladie de Kawasaki qui mène à des problèmes cardiaques chez les enfants (Sundel, 2015).

METABOLIC FUNCTIONS OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR INHIBITORS IN HEALTH AND DISEASE

Amélie Jaulin^{1,2,3,4,7}, Sébastien Molière^{1,2,3,4,5,7}, Catherine Tomasetto^{1,2,3,4} & Nassim Dali-Youcef^{1,2,3,4,6,*}

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire Illkirch

²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, Illkirch, France

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1258, Illkirch, France

⁴Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁵Department of Radiology, Hôpital de Hautepierre, Avenue Molière, Strasbourg, France

⁶Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Pôle de Biologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, Strasbourg, France

⁷These authors contributed equally to this work

* Correspondence : Dr. N. Dali-Youcef (dali@igbmc.fr) phone : +33 (0)3 88 65 34 23, fax: +33 (0)3 88 65 32 01

Keywords : Metabolism- MMP- TIMP- Adipose tissue- Obesity- Insulin Resistance- Type 2 diabetes- NAFLD

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) comprise six major classes of zinc-activated peptidases namely gelatinases, collagenases, stromelysins, matrilysins, membrane type metalloproteinases and other unclassified MMPs. Their effects are counterbalanced by natural inhibitors called tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). MMPs are involved in a plethora of biological processes both in physiology and pathology. Some of these functions occur during the development and others in the postnatal life. The role of several MMPs has been extensively studied in cancer and inflammation but their function in metabolism and metabolic diseases has been poorly studied and has begun to be uncovered in the last 2 decades. This review covers the current state of knowledge regarding the metabolic role of metalloproteinases in physiology and highlights the consequences of either impaired or exacerbated MMP actions in the occurrence of metabolic disorders such as obesity, fatty liver disease and type 2 diabetes.

Abbreviations

MMP matrix metalloprotease

TIMP tissue inhibitor of matrix metalloprotease

ECM extracellular matrix

HFD high fat diet

AT adipose tissue

ScWAT subcutaneous adipose tissue

GWAT gonadal adipose tissue

APC adipocyte progenitor cells

VEGF vascular endothelial growth factor

TLR2 Toll-like receptor-2

IL-1 β Interleukine 1 β

NT neurotensin

MeS metabolic syndrome

HOMA-IR Homeostatic Model Assessment test for Insulin Resistance

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are notoriously known ion-dependent endopeptidase enzymes that degrade extracellular matrix (ECM), allowing tissue remodeling during development as well as in the postnatal life (reviewed in [1,2]).

The large family of MMP enzymes is composed of 26 members encoded by 24 different genes grouped in collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane-type MMPs and others, based on their substrate specificity or cellular localisation. The classification of MMPs, their structure (Figure 1), substrate specificity and the chromosome location of the genes encoding different MMPs are well represented in recent reviews [1–3].

The function of MMPs is balanced by their natural endogenous inhibitors or tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) [4,5]. The physiological roles of MMPs and TIMPs are numerous (for review see Ref. [6]). Subsequently, MMP deregulation can be seen in several pathological conditions ranging from cardiovascular diseases to fibrotic disorders, infections, neurological diseases, lung diseases, arthritis, inflammation, cancer etc...

Research on MMPs has expanded since the discovery of their involvement in cancer biology as modulators of the tumor microenvironment during tumorigenesis (reviewed in [7]). Focusing on the role of MMPs in metabolism has begun to spring only recently and although many advances has been made in understanding the contribution of MMPs and their inhibitors to adipose tissue, lipid and glucose metabolism, some dark zones persist.

In this review we will highlight the numerous roles of MMPs and TIMPs in metabolic functions and diseases, with emphasis on locally-active MMPs and TIMPs in adipose tissue (AT), muscle, pancreas and liver, as well as distant actions of these proteins.

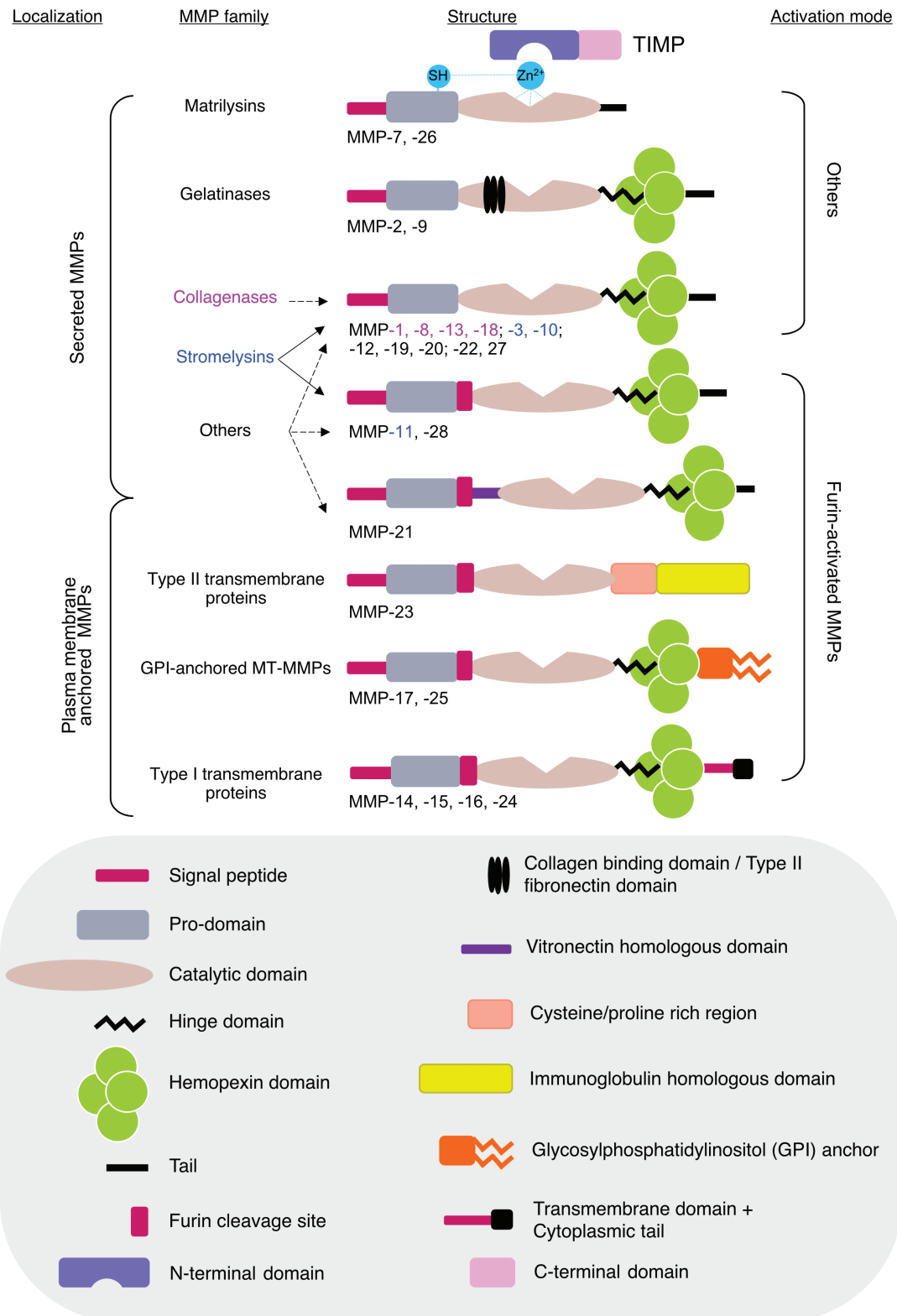


Figure 1. Schematic representation of MMPs and TIMPs structural domains. MMPs are classified based on their sequence homology but also on their cellular localization. For instance, matrilysins, gelatinases, stomelysins, collagenases are secreted MMPs whereas membrane type MMPs (MT-MMPs) and GPI-anchored proteainases are bound to the cell membrane. MMPs can be classified based on their ability to be activated by furin. The different domains of MMPs and TIMPs are indicated in the gray box.

Roles of MMPs on metabolic functions and diseases

In mammals, adipose tissue is central to the regulation of lipid and glucose metabolism. White adipocytes turnover and their metabolic profile are key determinants of whole-body fat storage and mobilization, and systemic insulin sensitivity. Alteration of adipocytes homeostasis may be seen in a variety of metabolic diseases, such as obesity, diabetes, cardiovascular diseases, as well as cancer-associated metabolic alterations.

Adipocytes differentiation and function are strongly regulated by their microenvironment and cross-talks with surrounding cells (other adipocytes, macrophage, endothelial cells, ...). Extracellular matrix of adipose tissue is composed of an isotropic matrix of a mix of collagen and elastic fibers: i. cross-linked, thick bundles of type I collagen triple helix, highly resistant to general proteolysis, binding with fibronectin, ii. type IV collagen forming the basement membrane, iii. microfibers of type V and VI collagen linking type I fibers together and with basement membrane, thus regulating adipose tissue elastic resilience and expandability [8].

Adipose tissue enlargement following a high nutrient load requires a certain plasticity to cope with the increased amount of fat to be stored. Two complementary processes can take place [9,10]. On the one hand, resident mature adipocytes increase their size through the uptake of fatty acids in a situation of energy excess, a process named adipocyte hypertrophy, which requires ECM remodeling. On the other hand, adipose tissue can respond by increasing adipocyte number (hyperplasia) through enhanced recruitment and/or expansion of adipocyte precursors. Expression of basement membrane collagen type IV is increased by mesenchymal stem cells during adipogenesis, and is remodeled by secreted MMPs during differentiation [11].

Interestingly, in the context of obesity, adipose tissue plasticity differs between distinct kind of fat depots. Hence, hyperplasia was shown to be more pronounced in the subcutaneous fat of the lower body than in the upper body, whereas hypertrophy affects the subcutaneous fat of the upper body and the abdominal region more specifically, in response to overfeeding [10]. Accumulating evidence demonstrated that in conditions of excessive calorie consumption, the development of metabolic syndrome may be due to absence, deficiency of dysfunctional subcutaneous fat with states of insulin resistance, and the energy surplus will accumulate in visceral adipose tissue and organs that are not meant to store fat like liver, skeletal muscle and the heart with deleterious consequences on health [12]. On the contrary, in individuals with insulin sensitive subcutaneous adipose tissue, fat will accumulate in the latter preserving the other organs from undesirable fat deposition and these subjects,

despite expansion of their subcutaneous fat, will be protected from metabolic syndrome development and its cardio-metabolic complications without ectopic fat distribution. Factors associated with preferential expansion of visceral fat and related insulin resistance include among other causes genetic susceptibility to visceral adiposity, smoking and maladaptive neuroendocrine response to stress [12].

MMPs are secreted in the ECM, or expressed at the surface of adipocytes, macrophages, endothelial cells, and other cell types. They play a major role in ECM homeostasis, adipocytes differentiation and growth, adipose tissue inflammation, insulin sensitivity and more generally metabolic pathways [13]. One obvious effect of MMPs, which is ECM remodeling, directly influences cellular growth and differentiation by modifying their microenvironment. Additionally, with the degradation of ECM components, some biologically active molecules like fibroblast growth factor (FGF) or vascular endothelial growth factor (VEGF) can be released. Also, many MMPs can cleave cell surface proteins and non-matrix substrates cytokines or hormones, thus increasing considerably their range of action.

This section will review the known roles of MMP in metabolic functions and diseases, especially obesity, diabetes, and liver metabolic diseases.

The gelatinases A and B (MMP2 and MMP9)

Gelatinases is a family represented by two main members, MMP2 and MMP9, even though other MMPs have been shown to cleave gelatin as well (MMP17, MMP25, MMP14, etc...for details see [3]).

They can digest gelatin and denatured collagen but also collagens type IV, V, VII and X, to which they bind via collagens fibronectin type II domain : collagens (IV, V, VII and X), gelatin, elastin and fibronectin [14]. While many studies determined the role of MMPs in inflammatory diseases and neoplastic disorders, the role of MMP2 and MMP9 in metabolic pathophysiology was poorly defined. In many cases, these MMPs have similar functions in metabolism yet they maintain specific roles.

MMP2

MMP2 is associated with obesity in humans and is produce by adipose tissue

Increased circulating MMP2 and MMP9 levels have been observed in non-diabetic obese subjects as compared to controls [15]. Similarly, increased expression levels of MMP2, as well as MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the plasma of T2D patients, compared to healthy individuals [16].

Interestingly, polymorphisms were found in the MMP2 gene in association with obesity in the Korean population [17]. Of the five MMP2 variants analyzed, two synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs), namely rs17242319 (Gly226Gly) (now called rs1132896 in the SNP database BUILD 129) and rs10775332 (Phe602Phe) were significantly associated with overweight/obesity. In an independent study searching for gender-specific genetic associations of polymorphism with obesity and overweight, the frequency of the C/G genotype of the MMP2 variant rs1132896 was higher in weight gainer women than in stable weight women compared to the common G/G genotype. Indeed, the C-allele was associated with a 2.5x higher risk of weight gain over a 10-year period in women as compared with carriers of the common G/G genotype [18]. No differences were observed in men regarding the MMP2 variant, while polymorphisms in the ACE and FTO genes were associated with weight gain [18]. The role of estrogen has been suggested to explain this sex-selective association [19,20].

Lafontan and coll. were first to demonstrate that human adipose tissue can produce and secrete active MMP2 and MMP9, as evidenced by gelatin zymography experiment and qRT-PCR on mRNA extracted from human mature adipocytes. In this study, it was demonstrated that MMP2 and MMP9 expression increases during adipocyte differentiation, while their inhibition markedly reduced this differentiation, which suggests a potential important local role of MMP2 and MMP9 in adipose tissue homeostasis [21], representing a path toward the understanding of their role in obesity.

Type IV collagen, the main constituent of basement membrane, is increasingly produced by human mesenchymal stem cell during adipogenic differentiation, together with an induction of MMP9 and TIMP2 expression, allowing remodeling required by intracellular accumulation of fat [11].

Pro-adipogenic role of MMP 2 and its dysregulation in vitro and in models of nutritional obesity

Several experimental studies have tried to elucidate the mechanisms behind the role of MMP2 in adipocyte differentiation. Important data have been brought by phenotyping genetically-engineered animals deficient in MMP 2, challenged with either normal or high fat diet.

When challenged with high fat diet (HFD) for 15 weeks, mice with genetic deficiency in MMP2 had significantly lower body weights and accumulate less fat compared with littermates [22]. Importantly, MMP2 deficient mice were significantly leaner than control animals before the onset of HFD and this was apparent as early as 5 weeks of

age. In fact, MMP2 $-/-$ have already been shown to have a lower body weight at birth due to a slower growth rate [23]. Similarly, wild type mice treated with a gelatinase inhibitor (tolylsam) displayed a significant decrease in weight gain under a 15 week HFD regimen [22]. The reduced weight gain under HFD in mice with either genetic inactivation or pharmacologic inhibition of MMP2 was mainly due to reduced fat pads and decreased adiposity (smaller adipocytes but greater adipocyte density), since neither feeding efficiency nor energy expenditure were significantly altered. Interestingly, MMP2 $-/-$ mice on a HFD had lower levels of cholesterol as compared to wild type mice, a feature that was not observed with tolylsam treatment [22]. In addition, MMP2 $-/-$ mice had significantly decreased leptin levels, consistent with the reduced fat mass. Of note, despite reduced glucose and insulin serum levels in MMP2 $-/-$, glucose tolerance and insulin sensitivity were not significantly altered.

Altogether, MMP2 seems to have an important role in adipose tissue development under a nutritional challenge. Whether this effect of MMP2 is direct or indirect (via an activation of another MMP) and the molecular mechanisms underlying this phenotype need to be clarified. Recent in vitro studies have brought some clues as to how the local proadipogenic effect of MMP2 is triggered.

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) obtained from MMP2 $-/-$ mice showed impaired differentiation into mature adipocytes when subjected to an adipogenic differentiation medium, with a robust drop in intracellular lipid content and a significant reduction in proadipogenic markers such as *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (*Ppar γ*) and its target *adipocyte fatty acid binding protein* (*aP2*) [24]. Likewise, genetic manipulation of MMP2 in 3T3-F442A preadipocytes confirmed these results. Indeed, specific MMP2 silencing using short hairpin-RNA knockdown in 3T3-F442A cells yielded similar results with reduced adipocyte differentiation, whereas specific MMP2 overexpression in the same cells resulted increased adipocyte differentiation as compared to control cells with a significant increase in the expression of *PPAR γ* and *aP2* at days 6 and 8 of differentiation [24].

Another experimental approach, to confirm in vitro results, was the use of adipocytes xenograft : nude mice injected subcutaneously with 3T3-F442A cells in which MMP2 expression was knocked down displayed unchanged fat pad formation, in term of adipose tissue weight, adipocytes density and size, despite decreased adipogenic markers (*aP2*, *PPAR γ* and adiponectin) [24]. Such mixed results may be explained by the activity of the host own AT MMPs and highlight the need for tissue-specific gene inactivation.

Other experiments allowed further insights on the time-dependent effect of MP2 during adipogenesis. Treatment of 3T3-L1 preadipocyte with the broad MMP

inhibitor ilomastat or a specific MMP2 inhibitor hindered their differentiation into mature adipocytes dose-dependently, with an effect mainly in the early stages of differentiation, and little effect was observed in later stages. Mechanistically, the MMP inhibitor did not affect the expression pattern of the early inducer of adipogenesis, the CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) transcription factor or its translocation to the nucleus, it dramatically reduced its DNA-binding capacity [25]. Chavey et al. also reported decreased differentiation of both 3T3L1-preadipocytes and primary rat preadipocytes into mature adipocytes in the presence of MMP inhibitor BB-94 (Batimastat) and showed that although the inhibitor did not affect mitotic clonal expansion, it did reduce expression of C/EBP β [26].

Interestingly, the expression of the gatekeeper of adipogenesis *preadipocyte factor 1* (*Pref1*) was significantly increased during the early stage of differentiation and decreased in the later stages in 3T3-F442A cells overexpressing MMP2. This observation suggests an enhanced commitment of preadipocytes cells into the white adipocyte lineage in the early phase of differentiation, while the decreased *Pref1* expression in the late phase is synonymous of enhanced differentiation and adipogenesis. Indeed, *Pref1* is a marker of precursor cells and a factor whose expression is transiently increased in the early phase of differentiation and prevents adipogenesis but its expression is known to drop drastically in the late phase to allow terminal differentiation [27]. *Pref-1* is a known suppressor of adipogenesis through repression of the early adipogenic factors C/EBP β and C/EBP δ through activation of an MEK/ERK/Sox9 pathway, preventing the activation of two important factors of terminal adipocyte differentiation C/EBP α and *Ppar γ* . It remains to be determined how MMP2 directly or indirectly regulate *Pref1* during the differentiation process.

MMP2 has similar roles in genetic obesity mouse models

Consistently, MMP2 has been shown to intervene in genetic model of obesity, using 2 well-studied models of genetic obesity, *ob/ob* and *db/db* mice, which are deficient in the gene encoding the satiety hormone leptin and its receptor, respectively.

MMP2 expression levels have been reported to be robustly increased in epididymal fat pads of *ob/ob* and *db/db* mice [26]. It is well established that expression levels of leptin correlate with the mass of adipose tissue and that obese individuals express high circulating leptin levels (reviewed in [28,29]).

Another report showed that treatment of *ob/ob* mice kept on HFD for 15 weeks with a gelatinase inhibitor, Tolylsam, yielded lower body weight, weight gain, fat pad weight and fat blood vessel density but mild adipocyte hypertrophy, with unaffected

food intake, body temperature and physical activity compared with untreated mice [30]. Reduced MMP2 activity in adipose tissue was confirmed by zymography. [30].

Additional ECM-independent role of MMP2

Mazor et al. have reported increased expression and activity of MMP2 in the hypothalamus of diet-induced obese mice [31]. Interestingly, leptin receptor is a substrate for MMP2, and MMP2 overexpression by HFD was responsible for cleavage of the extracellular domain of the leptin receptor and subsequent impaired leptin signalling, a condition referred as leptin resistance. Hypothalamic MMP2 inactivation restored leptin receptor expression and signalling, and significantly decreased weight gain in mice. Importantly, mice with a mutated leptin receptor undergoing HFD that cannot be cleaved by MMP2 gained less weight than control mice. This effect of MMP2 on weight gain was shown to be mediated by NFκB activation [31]. This discovery has shed a new light after years of a search for the molecular mechanism behind leptin resistance since the identification of leptin by Friedman and coll. in 1994 and highlight the complex, multi-tissular roles of MMPs.

MMP2 role in type 2 diabetes

Interestingly, a recent study highlighted the impairment of early steps of adipogenesis in type 2 diabetes, independently of obesity by demonstrating an inverse correlation between the expression of MMP2 and *aP2* in the stromal vascular fraction isolated from the abdominal subcutaneous adipose tissue of type 2 diabetic obese patients vs non-diabetic obese individuals [32]. In line with these results, it was shown MMP2 (and MMP7) activities found in the sera change depending on the diabetes stage. Hence, it was observed that during decompensated T2D, serum activity of MMP and serum concentration of C-peptide – a marker of insulin secretion - decrease, while increase in pro-insulin concentration robustly increase. On the other hand, the ratio of [proinsulin]/MMP activity was ~1:50 during the compensation phase, whereas in decompensated T2D this ratio was 1:12, suggesting that this ratio may become a diagnostic biomarker to assess diabetic decompensation [33].

MMP2 and myogenesis

MMP2 expression was shown to be significantly enhanced in the muscle 7 days following cardiotoxin-mediated injury [34]. Hence, MMP2 may play an important role in muscle repair. Whether this effect is direct or through MMP14-mediated activation of pro-MMP2 needs further clarification [35]. In addition, it remains to determine which cell type upregulate MMP2 in the muscle during the regeneration process.

MMP9***MMP9 is associated with obesity-associated unhealthy metabolic state and insulin resistance***

Unlike MMP2, MMP9-deficient mice did not differ from wild type littermates in term of weight gain, adipocyte density and size when submitted to a high fat diet [36].

While MMP9 is not directly responsible for adipocyte hypertrophy in diet-induced obesity, several human studies have linked MMP9 serum level with obesity-associated unhealthy metabolic state and insulin resistance.

MMP9 (together with VEGF-A) is upregulated in both subcutaneous and omental adipose tissues from morbidly obese patients compared to lean individuals., MMP9 expression level in fat tissue positively correlated with the homeostatic model assessment for insulin resistance index [37]. Moreover, MMP9 expression in subcutaneous adipose tissue biopsies was shown to be positively correlated with body mass index and insulin resistance in impaired glucose tolerant subjects [38]. Treatment of patients with pioglitazone, a thiazolidinedione PPAR γ agonist and insulin sensitizer, for 10 weeks dramatically reduced MMP9 expression. Pioglitazone also decreased MMP-9 in 3T3-F442A adipocytes and THP1 macrophages. In addition, co-culture of adipocytes with macrophages enhanced MMP9 expression in adipocytes and pioglitazone decreased MMP9 expression in both cell types [38].

In line with this link, results obtained in a cohort of individuals screened for metabolic syndrome (MeS, n=74) compared to healthy controls (n=75) were of interest. These 149 adults were evaluated according to specific guidelines, and among the different clinical features and biological blood parameters, serum concentration of MMP9 was found to be positively correlated to age, systolic blood pressure, waist circumference and fasting blood glucose levels but negatively to HDL cholesterol [39]. In another study, MMP2, MMP9 and their inhibitors TIMP1 and TIMP2 concentrations correlated with BMI, waist circumference and metabolic parameters in patients with MeS as compared to healthy controls [40]. Of note, higher concentrations of MMP9, but also MMP2, TIMP1, and TIMP2 were observed in metabolic syndrome (MeS) patients with diabetes mellitus in comparison with MeS subjects without diabetes [40].

To give strength to these data, a clinical study on patients with MeS showed that when submitted to a regime with a high fiber/low-fat content and daily aerobic exercise for 3 weeks, their total level of serum MMP9 was significantly reduced along other markers of inflammation and oxidative stress as well as a significant decrease in circulating lipids, fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR index [41].

Interestingly, Lee et al. found that the serum level of MMP2 decreased significantly in patients 9 months after a bariatric surgery procedure aimed at reducing body weight, whereas the serum level of MMP9 did not change significantly, yet it inversely correlated with adiponectin, a well-established insulin-sensitizing adipokine in support of the notion that MMP9 may be associated more with obesity-induced insulin resistance than to obesity itself [42].

MMP9 is induced in metabolic inflammation

Treatment of human monocytic THP1 cells with the bacterial lipopeptide Pam3CSK4 induced the production of MMP9 and this effect was mediated by the TLR2/Myd88/JNK/p38MAPK/NFκB signaling pathway [43]. This pathway is notoriously known to mediate lipid and inflammasome-induced metabolic inflammation and insulin resistance (reviewed in [44,45]). Hence, MMP9 could play a significant role in the maintenance of the state of chronic low grade inflammation observed in obesity and commonly referred as metabolic inflammation or “metaflammation”.

Recently, a study investigated expression profile of markers of adipogenesis, inflammation and ECM remodeling in subcutaneous adipose tissue (SCAT) biopsies and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from overweight and obese subjects as compared to normal weight subjects [46]. Lower expression of adipogenesis markers, insulin signaling pathway and angiogenesis genes, and increased expression of ECM remodeling markers in SCAT as well as enhanced expression of macrophage markers but not of other immune cells were observed in the overweight subjects. However, no difference in expression of proinflammatory markers in PBMCs was noted. In multiple regression analysis, the authors found that expression of MMP9 along CEBPA, ADIPOQ, IRS1, IRS2 and SLC2A4 was associated with insulin sensitivity independently of body mass index (BMI) [46].

Another study demonstrated that resident AT macrophages proliferation is early induced by nutritional overload, followed by recruitment of M1-like macrophages [47].

Together, these results point to the fact that macrophages are the first immune cells to infiltrate AT inducing ECM remodeling, which may be instrumental in insulin resistance development through the TLR2/Myd88/NFκB pathway [43].

Of note, in a mouse model of sucrose diet-induced insulin resistance, there was a reduced AT expression and activity of MMP2 and MMP9, with no change in MMP circulating levels nor in PPARγ expression [48]. This type of insulin resistance is different from high-fat diet-induced obesity and insulin resistance has been ascribed

to impairment of the hepatic parasympathetic nerves [49]. The role of MMP2 and MMP9 in sucrose diet-induced IR needs to be studied in more details.

Stromelysins 1-3 (MMP3, 10, 11)

Among stromelysins, MMP3 and MMP10 are both secreted as pro-enzymes and they share similar ECM components substrates (fibronectin, proteoglycans, type IV collagens, laminin). Unlike collagenases, they cannot degrade fibrillar collagens.

MMP3 also activate other proMMPs (for instance, MMP-3 activates proMMP-1) and various non-structural components of ECM, among which plasminogen activator inhibitor-1, fibrinogen, plasminogen,....MMP3 is secreted by a variety of cell types (fibroblasts, macrophages, endothelial cells, epithelial cells, as well as cancer cells) and is a potent promoter of epithelial-to-mesenchymal transition [50].

MMP10 is expressed in epithelial cells, it allows for example keratinocytes to migrate during wound healing [50].

The third stromelysin, MMP11, is distantly related with other stromelysins. It is secreted as an active protease by fibroblasts, it can cleave collagen VI and non-structural substrates such as α -1 antitrypsin, α -1 proteinase inhibitor and IGFBP-1, but is not able to degrade major ECM components [50].

MMP3

MMP3 is differentially expressed in AT based on sex and depot type in murine models of nutritionally induced obesity

MMP3 is expressed in both the subcutaneous (ScWAT) and gonadal white adipose tissue (GWAT) in male mice under standard fat diet with increased expression levels in ScWAT as compared to GWAT. However, when submitted to HFD, GWAT express higher levels of MMP3 as compared to ScWAT suggesting a depot-specific regulatory role of MMP3 in obesity [51].

MMP3 loss-of-function study points to an important regulatory role of MMP3 in adipose tissue growth. Lijnen and Coll. showed that male MMP3 deficient mice gain more weight and are hyperphagic when submitted to HFD for a 15-week duration. Interestingly, at the end of the diet, analysis of fat pads showed that the weight of both ScWAT and GWAT fat depots were significantly higher in MMP3 $-/-$ mice. However, significant adipose tissue hypertrophy and increased adipose tissue angiogenesis was observed only in GWAT of MMP3 $-/-$ mice but not in ScWAT,

suggesting a preventive role of MMP3 from excessive visceral adipose tissue expansion in nutritionally induced obesity in male animals and that ScWAT probably expand through hyperplasia in the absence of MMP3 [52]. This study also points to the notion that MMP3 regulate food intake to limit excessive weight gain in mice.

In another study, overexpression of MMP3 in 3T3L1 preadipocytes or treatment of human preadipocytes with recombinant human MMP3 (rhMMP3) inhibited adipocyte differentiation, whereas concomitant treatment with recombinant TIMP4 prevented this effect and resulted in enhanced adipocyte differentiation [53]. Alternatively, major gender- and depot-dependent differences in MMP3 (and TIMP4) expression were observed during adipose tissue remodeling when mice were challenged with a HFD. First, female mice have smaller adipocytes than males in GWAT (but enhanced size compared to the standard diet condition), while the adipocyte size was comparable between sexes in inguinal ScWAT under regular and HFD in both sexes [53]. Second, HFD resulted in increased fat cell number in GWAT in female mice and decreased in males (a similar trend was observed in inguinal WAT in males), suggesting that in GWAT females respond to HFD with hypertrophy and hyperplasia, whereas in males fat expansion occurs mainly through hypertrophy [53]. Third, *Mmp3* is mainly expressed by adipocyte progenitor cells (APCs) [53], whereas its inhibitor *Timp4* is expressed mainly by mature adipocytes [51] (*Timp1*, *Timp2* and *Timp3* are mainly expressed in the SVF). In males and females, *Mmp3* expression was higher in ScWAT compared to GWAT both under regular diet and HFD, but this differential expression was more pronounced in female mice than in males suggesting that MMP3 exerts a higher adipogenic inhibitory effect in ScWAT than in GWAT. Moreover, the expression of *Mmp3* was higher in GWAT in females compared to males under regular diet, suggesting that MMP3 may regulate the fat depot distribution differently in male and females. HFD induces a significant increase in *Mmp3* expression in all fat depots (GWAT, mesenteric WAT and ScWAT) in males whereas a modest and significant increase was observed only in GWAT and not in ScWAT in females [53]. In addition, under regular diet the abundance in APC in GWAT and ScWAT was higher in females compared to males (consistent with the higher *Mmp3* expression in female GWAT and ScWAT compared to males). However, under HFD, the abundance of APCs and the expression APC *Mmp3* is increased in GWAT in males but not in females. These differences in the abundance of APCs and APCs' *Mmp3* expression may explain at least partly, the sex-, fat depot- and diet-dependent differences to regulate hyperplastic versus hypertrophic adipose tissue expansion [53]. Obviously other factors contribute to these differences. For instance,

HFD induced a dramatic increase in the expression of the proinflammatory macrophage marker *Cd11c* in adipose tissue of males in comparison to female fat depots where the increase was only modest [53], suggesting a dimorphism in inflammatory markers in males compared to females under nutritional challenge. There are also significant sex- and fat-dependent differences in *Cd11c* expression under regular diet although much less pronounced. Hence, *Cd11c* expression is more expressed in GWAT than in ScWAT in males, whereas in females *CD11c* is expressed more in ScWAT than in GWAT (this profile is inversed under HFD), with a higher expression in males than in females [53]. Other factors are involved in this process such as the MMP3 modulator TIMP4, mentioned earlier and that will be discussed in more detail below in the TIMP4 section.

Altogether, these observations show that significant sex- and depot-dependent differences in MMP3 and *Cd11c* expression exist during adipose tissue remodeling and that modulation of the MMP3/TIMP4 ratio regulates this process. Of note, *CD11c* Interestingly, in a recent nutritionally-induced obesity murine model, it has been shown that phenol-rich water extract from purple maize pericarp (PPE), known to modulate inflammatory and obesity markers, significantly reduced body weight gain and markedly upregulated the expression of MMP3 in adipose tissue of HFD-fed mice [54].

Consistent with these experimental findings, a polymorphism in the MMP3 gene was associated with a higher risk of severe obesity compared with AA genotype carriers in a Tunisian population [55].

MMP3 role in adipocyte differentiation and mammary gland involution

A mentioned above, overexpression of MMP3 in 3T3-L1 preadipocytes or treatment of human primary preadipocytes with recombinant MMP3 inhibited adipocyte differentiation [53].

Of particular note, MMP3 is strongly expressed during mammary gland involution stimulated by weaning and MMP3^{-/-} mice display precocious differentiation and hypertrophy of adipocytes in the mammary gland environment whereas epithelial cell death was unaltered [56]. Interestingly, *in vitro* MMP3 along other MMPs (MMP14, MMP13 and MMP2) and TIMPs (TIMP1-3) are induced in committed preadipocytes, but only differentiated adipocytes express an activated and secreted MMP2 observed by increased gelatinase activity as analyzed by gelatin zymography. Hence, MMP3 secreted by adipocytes may be regarded as a feedback negative regulator and a guardian of the adipocyte differentiation rate, limiting thereby excessive differentiation during mammary gland involution [56].

Pro-inflammatory effect of MMP3

A deleterious pro-inflammatory effect of MMP3 was previously reported, as MMP3 was shown to be secreted by adipose tissue-infiltrated macrophages. Hence, MMP3 seems to play a role in fatty-acid induced insulin resistance and angiogenesis through regulation of *tumor necrosis factor α* (TNF α) and the proangiogenic factor *vascular endothelial growth factor* (VEGF), respectively.

First, it was demonstrated implantation of 3T3-L1 preadipocytes in visceral fat robustly up-regulates MMP3, and leads to increase in TNF α secretion [57]. More interestingly, it was shown that HFD promotes certain adipocytes to co-express toll-like receptor 2 (TLR2) and its downstream molecule, TNF α to induce insulin resistance in mice in the presence of free fatty acids (FFA) [58].

Using macrophages-conditioned medium [59] and macrophage-3T3-L1 co-cultures [60], it was showed that MMP3 secreted from macrophages stimulates FFA-induced expression of VEGF by the adipocytes, via toll-like receptor 2 (TLR2) expression and activation.

The paracrine crosstalk between macrophages and adipocytes is notoriously known to promote metabolic inflammation-mediated insulin resistance [45,61] and MMP3 appears to contribute to the multiple molecular aspects of insulin resistance pathogenesis in obesity through inflammation, since treatment with a MMP3 inhibitor abolished the MMP3-mediated secretion of TNF α .

Altogether, MMP3 seems to play a dual role in adipose tissue biology; it negatively controls adipose tissue expansion on a sex- and depot-dependent manner, while MMP3 overexpression in visceral fat favors inflammation, insulin resistance and angiogenesis. Thus, fine-tuning MMP3 expression in adipose tissue appears to be important to ensure proper adipogenesis and prevent insulin resistance.

MMP10

MMP10 and adipogenesis

MMP10/stromelysin-2 does not appear to contribute significantly and directly to adipose tissue development and angiogenesis in a model of dietary-induced obesity as the number and size of both ScWAT and GWAT adipocytes were not altered when MMP10 is deleted in mice, nor the density and size of the blood vessels [62]. However, microarray data identified MMP10 among the genes that were highly upregulated in human adipocytes in response to macrophage-conditioned medium for 4h and 24h. Along MMP10, MMP1, MMP3, MMP9, MMP12 and MMP19 were also robustly induced with MMP1 and MMP3 being the most secreted proteins by adipocytes [63].

MMP10 and myogenesis

MMP10 was also demonstrated to be necessary for efficient muscle regeneration in both models of muscle injury and in muscle of Mdx dystrophic mice. Hence, MMP10 expression is induced in response to damage in the skeletal muscle following injury or disease in the dystrophic muscle. Indeed, MMP10 inactivation in the Mdx muscle led to a deteriorated phenotype compared to the Mdx muscle with Wt MMP10 expression. Also, silencing of MMP10 in injured muscles from WT and Mdx mice significantly altered regeneration, whereas treatment with recombinant MMP10 accelerated the repair process [64].

MMP11

The third member of the stromelysin subfamily, MMP11, is a furin-activated metalloproteinase that is secreted in its active form. Increased MMP11 expression in the tumor microenvironment (cancer-associated adipocytes and cancer-associated macrophages) was documented in several invasive cancers, including breast cancer [65–67]. MMP11 was initially identified in our laboratory back in 1990 as a factor secreted by stromal cells of breast carcinomas [68]. Since then, several discoveries have shed light on the metabolic functions of MMP11.

MMP11 protects against obesity-associated metabolic dysfunction

A first report showed the association between MMP11 and adipogenesis, since HFD-fed MMP11 deficient mice had adipocyte hypertrophy [69] (Lijnen et al., 2002). Later, MMP11 deficiency was associated with increased adipose tissue expression of adipocyte differentiation master genes PPAR γ and FABP4 (aP2) [70]. Moreover, in this study, a direct role of MMP11 in adipogenesis was uncovered, since MMP11^{-/-} MEFs were prone to be differentiated in adipocytes and addition of recombinant MMP11 delayed adipocytes differentiation [70].

Our group next generated a complementary model of MMP11 gain of function (MMP11-Tg, GOF) in which MMP11 is expressed in the whole animal through an epithelial specific promoter [71]. By comparing these GOF with MMP11 ^{-/-} (LOF) mice, we brought evidence that MMP11 is an important regulator of whole-body energy homeostasis. Hence, MMP11 overexpressing mice were lean, had improved metabolic parameters and were protected from diet-induced obesity; whereas MMP11^{-/-} displayed a phenotype reminiscent of the metabolic syndrome [71]. Interestingly, despite the beneficial effect of MMP11 on weight loss, MMP11-Tg exhibited mitochondrial dysfunction in the brown adipose tissue due to increased

oxidative stress and a switch in metabolism from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis. This phenotype was probably mediated by an increase in the IGF1/AKT/FoxO1 signalling pathway, since MMP11-Tg mice had increased serum IGF1 concentration and activation of IGF1-IGF1R-AKT cascade [71]. Of note, IGFBP1, the protein that controls the levels of circulating IGF1, was previously identified as a substrate for MMP11 [72] and our group has recently confirmed that recombinant MMP11 cleaves IGFBP1 *in vitro*, (Tomasetto and Coll., 2021, unpublished data).

MMP11 overexpression in cancer microenvironment induces metabolic reprogramming and promotes cancer growth

In a follow-up study, an effort was put to unravel the role of such MMP11-driven metabolic alterations in the specific context of breast cancer and tumor progression. For this purpose, we crossed MMP11GOF and LOF mouse models with a mouse model of breast cancer, the mouse mammary tumor virus polyomavirus middle T-antigen [73]. This study showed that MMP11 favors early mouse mammary gland tumor development through increased proliferation and reduced apoptosis. Mechanistically, in tumors from PyMT^{Tg}:MMP11^{Tg} mice, MMP11 activates the IGF1/AKT/FoxO1 signalling pathway, promotes endoplasmic reticulum stress response (UPR^{ER}) and alters mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}) as compared to PyMT^{Tg}:MMP11^{WT} control mice. MMP11 also changes the metabolic profile of PyMT^{Tg}:MMP11^{Tg} tumors as it promotes lipid intake and utilization while favoring a metabolic reprogramming from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis [73].

Altogether, MMP11-mediated alterations provide tumors with a significant advantage for growth and survival. Pharmacological inhibition of MMP11 should be a serious objective to achieve to slow tumor growth in the early phase of its development as it targets multiple processes involved in tumorigenesis. Reciprocally, IGF-1 promotes MMP11 expression in gastric cancer cells, in a dose-dependent manner, through a JAK1/STAT3 signalling cascade to increase their proliferation and invasion [74].

Role of MMP11 in TNF α -induced insulin resistance

Paradoxically, from a purely metabolic point of view, a recent study revealed that MMP11 was overexpressed in TNF α -induced insulin resistance in differentiated cultured 3T3-L1 adipocytes and in the WAT of obese C57BL/6J mice compared to lean mice. The authors suggest that dysregulated MMP11 occurs early in the adipose tissue dysfunction leading to obesity and subsequent insulin resistance [75]. The question

that arises from these observations is the following: does MMP11 protect from insulin resistance or is it a deleterious factor? Our data support the idea that “too much of a good thing harms”, as in MMP11 expression is necessary for glucose homeostasis, since its absence promotes insulin resistance in mice, whereas its overexpression in epithelial cells (K14 promoter used in MMP11-Tg mice) improves glucose tolerance and insulin sensitivity although it alters mitochondria function in adipose tissue to a certain extent through increased oxidative stress. It is also plausible that in response to a metabolic insult such as nutrient stress-induced insulin resistance, the organism responds by increasing MMP11 expression perhaps in an attempt to restore metabolic homeostasis. Adipose tissue-specific overexpression of MMP11 will certainly bring more insight onto the complex role of this protease in glucose metabolism.

Expression of MMP11 during adipocytic differentiation

Regarding adipocyte differentiation, our group has shown that like MMP2, MMP11 expression seems to be regulated differently during the early and late phase of differentiation but in an opposite manner. In days 1-2 of MEF differentiation, MMP11 expression is robustly decreased, then it is upregulated starting day 4 concomitantly with the increased expression of the adipogenic marker FABP4/aP2, to culminate at day 6 of adipocyte differentiation [70]. Hence, MMP11 seems to play a dual role during adipocyte differentiation.

Consistently, in another study MMP11 expression was shown to be significantly increased at d4 of differentiation and decreased at late stage (d12) of differentiation, while MMP11 overexpression decreased fat accumulation [76]. Interestingly, this report identified the non-coding RNA miR125b-5p as a direct negative regulator of MMP11 during adipogenesis with a robust increased expression of miR125b-5p in late adipogenic differentiation [76]. By contrast, artificial overexpression of miR125b-5p blocks adipogenic differentiation consistent with a decrease in expression of C/EBP β and C/EBP δ , through a mechanism yet to be identified [76]. It remains to determine the exact role of MMP11 on the expression of preadipocyte markers such as Pref-1 and the commitment of preadipocytes into the adipocyte lineage and to explore the relevance of the miR125b-5p/MMP11 interaction in the context of breast cancer biology.

Collagenases (MMP1, MMP8, MMP13)

MMP1

First vertebrate collagenase to have been purified and cloned, MMP1, also known as collagenase-1 or fibroblast collagenase, is the prototype for other collagenases. Collagenases are capable of cleaving fibrillar collagen in the triple-helical domain, leaving the molecule unstable, in a gelatin conformation that can then be further degraded by others MMPs [77].

MMP1 can also degrades other ECM components (perlecan , aggrecan, ...) and non-matrix proteins (insulin-growth factor binding protein (IGFBP) type 3 and 5, tumor necrosis factor- α , antichymotrypsin, antitrypsin, ...) making MMP1 a multifunctional protein [78].

MMP1 secretion by preadipocytes during their differentiation is induced by macrophages, via IL- β pathway

Macrophage-mediated robust overexpression and release of MMP1 and MMP3 by preadipocytes is mediated by IL-1 β through MAPK signaling pathway [79]. MMP1 and MMP3 are expressed by preadipocytes then robustly downregulated after differentiation [80,81]. The interaction between infiltrating macrophages and preadipocytes to promote MMP secretion and ECM remodeling is probably a key factor during AT expansion.

Obese adipose tissue shows accumulation of collagen I associated with TIMP1 increase and MMP1 decrease, mediated by TLR2 elevation

During prolonged HFD, C56BL/6J mice have increased adipose tissue levels of collagen I, TIMP1 and TGF β 1 and lower levels of MMP1 [82], consistent with the role of MMP1 in regulating collagen 1 deposition, a marker of fibrosis associated with insulin resistance, during dietary and genetic obesity [83,84].

Interestingly, a robust elevation in Toll-like receptor-2 (TLR2) expression, a sensor of saturated fatty acids that elicit inflammatory responses promoting insulin resistance (see review [45]), was also observed under HFD, while TLR-2 $-/-$ mice fed with HFD had decreased levels of collagen I, TIMP1 and increased MMP1 [82].

Downstream effectors of TLR2, namely myd88 and the stress-activated p38 MAPK, were significantly increased in obese mice, as well as pro-inflammatory and pro-fibrotic cytokines (TNF α , IL6 and TGF- β 1) and were robustly reduced in TLR2 $-/-$ mice [82]. Altogether, this study demonstrates that TLR2 mediates collagen accumulation and pro-inflammatory cytokines activation in WAT during diet induced obesity, involving MMP1 and TIMP1 imbalanced expression.

Involvement of MMP1 in obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases

Two variants of MMP1 gene rs1799750 and rs495366 on chromosome 11q21-22 region were associated with higher MMP1 plasma levels and this association was found only in non-obese subjects in Taiwanese population, suggesting an interaction with obesity traits [85].

MMP1 serum levels have been shown to be significantly increased in patients with type 2 diabetes as compared to subjects with maintained glucose homeostasis. Interestingly, MMP1 levels were associated to increased risk of cardiovascular heart disease (CHD) occurrence in these patients and a higher frequency in a genetic polymorphism of the promoter region of MMP1 (2G/2G) exists in T2DM patients with CHD [86]. These findings were recently confirmed in T2D with existing CHD in a Han Chinese population. The frequency of the 2G allele of MMP1 (variant rs1799750) was enhanced in these patients as compared to control individuals, and increased BMI was also correlated with the 2G/2G genotype, suggesting that this polymorphism may favor the development of CHD in overweighted T2DM patients [87].

Moreover, MMP1 was recently identified using bioinformatics analysis as a hub gene in T2D when searching for differentially expressed genes and molecular pathways in pancreatic islets from T2D patients as compared to normal islets obtained from 3 different gene expression public datasets [88].

Recently, it was shown that decreased expression of MMP1 was implicated in *glucagon-like peptide -1* (GLP-1)-mediated reversal of vascular remodeling in the spontaneous hypertension rat (SHR) model through inhibition of the ERK1/2-NFκB pathway [89]. Thus, this study improves our understanding of the molecular mechanisms behind the beneficial effects of incretins in the prevention of T2DM-associated vascular alterations.

MMP8

MMP8, the second member of the collagenase family, also known as collagenase-2 or neutrophil collagenase is secreted by neutrophil cells during inflammation[90,91]. MMP8 cleaves collagenous substrates (Type I, III, II, VII, X) but also a diverse array of other non-collagenous ECM substrates and non-structural substrates including

cytokines, serine protease inhibitors, signalling molecules, growth factors (e.g. *hepatocyte growth factor* or HGF) and apolipoprotein (for details see review in [90]).

MMP8 promotes atherosclerosis by degrading apolipoprotein 1-I and modifying cholesterol efflux capacities

The role of MMP8 in the progression of atherosclerotic disease has been well studied. MMP8 is overexpressed by macrophages, endothelial cells and smooth muscle cells in progressing atherosclerotic lesions [92–94]. Plasmatic MMP8 concentrations were linked to the presence and severity of coronary artery disease [95] and serum MMP8 levels were associated with cardiovascular outcome in patients [96]. The recent discovery of small molecule inhibitors of MMP8 such as sulfated mimetics of glycosaminoglycans (sulfated quinazolinones) looks promising to prevent atherosclerosis-mediated cardiovascular events [97].

MMP8 role in lipid metabolism, leading to increased accumulation of cholesterol in the vessel walls, has been showed to be related with MMP8 proteolysis of apolipoprotein A-I, the major protein in HDL particles [98], thus reducing cholesterol efflux from cholesterol-loaded THP1 macrophages. This effect was blocked by the antibiotic doxycycline, a broad-spectrum MMP inhibitor [99]. In vivo, MMP8 deficient mice displayed lower TG levels and larger HDL particles but no difference in serum Apo A-I nor in cholesterol efflux capacities was noted compared to WT mice. This observation was explained by the fact that Apo A-I is less susceptible to degradation when associated with lipids as it is the case in lipid-enriched HDLs, while MMP8-mediated proteolysis is facilitated in a lipid-free environment or within Apo-AI-lipid discs with smaller amounts of phospholipids and cholesterol [98].

Serum MMP8 level and MMP8/TIMP1 ratio is positively linked with diabetes

Significant elevated circulating MMP8 levels and MMP8/TIMP1 ratio were documented in obese young individuals compared with normal weight subjects in a finnish population and smoking increased further MMP8 levels and MMP8/TIMP1 ratio in both groups [100].

Increased plasma concentrations of MMP8 and TIMP1 (along other pro-inflammatory cytokines) have been previously reported in patients with features of the metabolic syndrome (MetS) as compared with healthy controls [101].

Another study reported increased circulating MMP8 (along MMP9 and TNF α) levels in diabetic patients with MetS compared with non-diabetic patients with MetS in a Tunisian cohort of patients [102]. These observations should be confirmed in preclinical models of diabetes using MMP8 specific inhibitors to see whether these molecules can mitigate/reverse insulin resistance.

Early decrease of circulating MMP8 levels was recently demonstrated to correlate with leptin reduction and predict diabetes remission in patients that underwent bariatric surgery at a 3-year follow up timepoint [103]. This study gives an additional argument in favor of MMP8 inhibition to potentially decrease/reverse insulin resistance and diabetes in obese patients.

In vitro study showing human insulin receptor cleavage by MMP-8 could explain, at least partly, the role of MMP8 in impaired insulin signaling and insulin resistance in obese individuals [100].

Interestingly, salivary MMP8 (and MMP9) levels were shown to correlate with HbA1c in non-obese type 1 diabetic patients [104], suggesting that these non-invasive salivary markers may predict glycemic control in these patients.

Also, increased MMP8 serum levels have been associated with gestational diabetes mellitus [105]. MMP8 concentration at baseline was recently shown to correlate weakly with pre-pregnancy BMI and was significantly associated with late, but not total gestational weight gain [106]. In this study, Huhtala *et al.* reported also an inverse correlation of MMP8 concentration with birth weight and this association was not affected by pre-pregnancy BMI [106]. It was suggested that MMP8-mediated inflammation of the chorion may be responsible for the lower birth weight as MMP8 was previously associated with chorioamnionitis [107] and premature term delivery [108]. The causal role of MMP8, if any, in this context needs to be further explored.

MMP13

MMP13 and adipogenesis

MMP13 is the third member to possess collagenase activity. MMP13 is expressed at a relatively low level in preadipocytes and is highly expressed in fully differentiated adipocytes underscoring an important role in adipocyte differentiation [109].

Interestingly, MMP13 expression is relatively higher in ScWAT than GWAT under standard diet, while this profile is inverted under HFD with an approximately 4-fold more expression in GWAT compared to ScWAT [109], suggesting a contribution of MMP13 in the pathogenesis of obesity.

Of note, MMP13 is more expressed in the stromal vascular fraction (SVF) than in adipocytes and this expression is exacerbated in the SVF in both GWAT and ScWAT under HFD [109], implying a role of MMP13 in adipose tissue and ECM remodeling during obesity. Moreover, MMP13 mRNA expression levels were correlated with the degree of obesity in GWAT but not in ScWAT [109], underscoring a prominent role of MMP13 in the development of visceral obesity.

Consistently, selective inhibition of MMP13 with the CP-544439 compound suppressed adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells and reduced fat mass, adipocyte size and increased insulin sensitivity in mice fed a HFD [110].

MMP13 and myogenesis

Although, shown to be progressively induced during *in vitro* C2C12 myoblast cell differentiation and to be expressed by proliferating myoblasts with a more pronounced expression during fusion of myoblasts and myotube formation [34]. Moreover, MMP13-stably transfected C2C12 cells displayed increased migration compared with control cells [34]. *In vivo*, MMP13 $-/-$ display lower body weight at 4 weeks of age, presumably due to skeletal developmental abnormalities at the growth plate and subsequent altered endochondral bone development that were previously reported [111], yet under basal conditions, MMP13 $-/-$ mice do not display skeletal muscle overt histological nor functional abnormalities. Hence, MMP13 is dispensable for muscle homeostasis [112]. However, under muscle injury following cardiotoxin injection, MMP13 expression is transiently decreased (day 1 and d3 post injection), then induced at d7 and further increased at d11 post-injection [34], suggesting a functional role in muscle repair. Indeed, Smith *et al.* showed that at d11 following CTX injection MMP13 $-/-$ exhibited decreased tibialis anterior (TA) muscle fiber size area and showed impaired muscle regeneration as demonstrated by the presence of necrotic fibers compared to WT animals [112]. In the chronic model of muscle dystrophy Mdx, mice showed increased expression of MMP13 compared to C57/Bl6 mice [34], yet crossing MMP13 $-/-$ mice with Mdx did not result in an aggravation of the phenotype, yet a higher proportion of necrotic muscle fibers was reported in the crossed mice compared to Mdx mice. Moreover, MMP13 $-/-$ showed a significant decrease in muscle hypertrophic response to adenovirus-mediated IGF1 administration and occurred through a satellite cell-independent mechanism [112]. Also, myoblasts from MMP13 $-/-$ displayed decreased migration capacity compared to WT mice. In addition, satellite cell-targeted inactivation of MMP13 resulted in postnatal growth impairment compared to WT mice and showed altered regeneration

after injury recapitulating the phenotype of MMP13 $-/-$ mice. These data show that MMP13 originating from progenitor cells is essential for normal repair following muscle injury [112].

MMP19

MMP19 is a unique and widely expressed MMP in adult tissues, which is located in chromosome 12q14 region, can potentially degrade basement membrane and cleave the cartilage components aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein. It has been involved with pathophysiological conditions such as ovulation, rheumatic arthritis, angiogenic processes and cancer. Its proteolytic activity is abolished by TIMP2 [113–116].

MMP19 deficient mice are viable, have a normal development and are fertile, yet aged mice exhibit a higher body weight compared to controls on a standard diet [114]. When on HFD-diet, MMP19 $-/-$ gain significantly more weight in comparison to WT and have markedly increased weight of both ScWAT and GWAT. Moreover, these mice were less susceptible to skin cancer development [114]. Paradoxically, MMP19 was shown, like other MMPs mentioned above, to be markedly induced during adipocyte differentiation and in adipose tissue of mouse models of obesity [26]. One explanation could lie in the fact that MMP19 may negatively control adipogenesis and the increased expression in obesity may be a way of limiting further weight gain. These studies highlight a role of MMP19 in adipogenesis control and tumor development probably through angiogenesis. However, the molecular mechanisms underlying these phenotypes remain poorly defined and other studies are clearly needed to unravel the exact role of MMP19 in human obesity and cancer.

Elastases (MMP12)

MMP12 is an elastase secreted by stimulated macrophages to induce elastin degradation [117] and in placenta tissue in both macrophages and stromal cells but not expressed in normal adult tissues [118].

Phenotype studies of MMP12 $-/-$ mice have been conflicting.

Lijnen et al showed that MMP12 deficiency had no direct impact on adipose tissue mass (both ScWAT and GWAT), cell density and overall total body weight in mice compared to wild type mice both on chow diet and HFD, yet a significantly lower amount of crown-like structures (CLS) (activated macrophages, mostly derived from

monocytes, surrounding dead or dying adipocytes and are hallmarks of a proinflammatory process in adipose tissue) was observed [119].

Conversely, Heinecke et al showed that MMP12 $-/-$ mice fed with HFD displayed higher body weight, increased fat mass and adipocyte size but lower lean mass, accumulated more M2 macrophages in their adipose tissue and were more insulin sensitive. Moreover, expression of nitric oxide synthase 2 (*Nos2*), a marker of M1-proinflammatory macrophages and insulin resistance, was markedly decreased in adipose tissue of MMP12 $-/-$ mice (but also in stimulated dendritic cells and macrophages), while significantly increased in WAT of MMP12 $+/+$ mice under HFD. These results suggest that MMP12, secreted by macrophages and dendritic cells, promotes insulin resistance in low grade metabolic inflammation-mediated insulin resistance while restraining adipose tissue expansion [120].

In mice, *Mmp12* transcripts are dramatically induced in obese adipose tissues compared to lean tissues [26,51].

While *MMP12* expression do not correlates with body mass index in human subjects, it correlates positively with the number of M2 macrophages, HOMA-IR and inflammatory mediators such as adipose tissue *Tnfa* and *Ccl2* expression levels and inversely with *ADIPOQ* transcripts [120].

Matrilysins (MMP7, MMP26)

MMP7

Expression levels of MMP7 in obesity is controversial and contradictory results were reported in a number of studies.

First, a positive correlation was reported between serum MMP7 concentrations (but also of MMP1, -3, -8, -9 and -12) and BMI in 54 healthy reproductive-aged women and significantly higher MMP concentrations were found in women with higher BMI as compared to women with normal BMI [121]. Second, MMP7 expression levels (and of collagen VI α 1) were found to be increased in ScWAT of obese insulin resistant subjects as compared with obese-insulin sensitive subjects, suggesting a role of MMP7 and ECM remodeling that may not result solely from obesity, but may contribute to insulin resistance development as well [122].

However, in two animal models of genetic obesity (*ob/ob* and *db/db*) and in a HFD model, while mRNA levels for MMP2, MMP3, MMP12, MMP14, MMP19, and TIMP1 were robustly induced, MMP7 and MMP3 transcripts were markedly reduced in obese adipose tissues compared to lean tissues [26]. This observation was

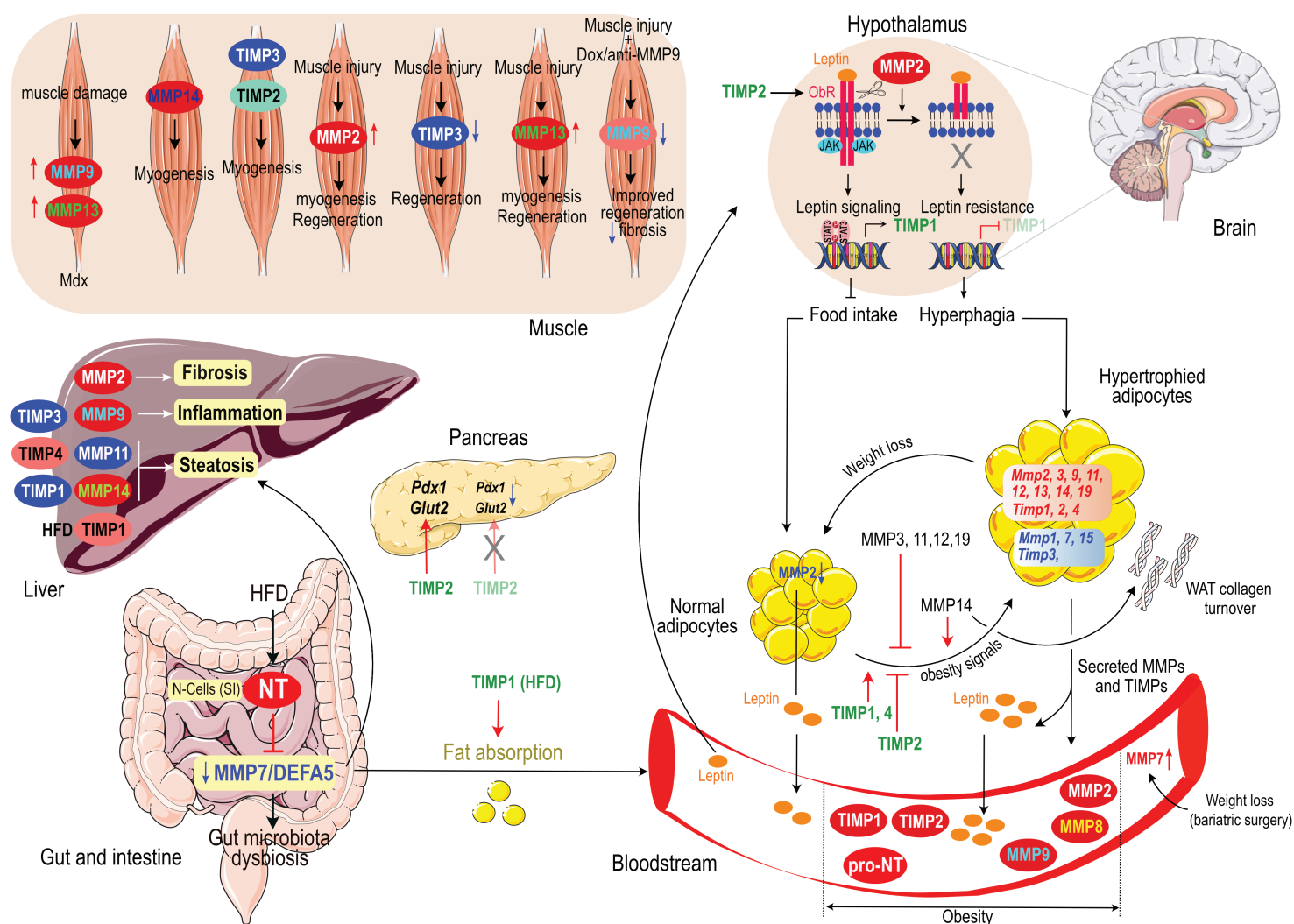


Figure 2. Metabolic actions of MMPs and their inhibitors. The expression of several MMPs and their inhibitors is changed in the adipose tissue in response to obesity signals contributing to tissue remodeling. Upregulated genes are mentioned in red in the hypertrophied adipocytes and downregulated genes are in blue. MMP3, -11, -12 and -19 as well as TIMP2 protect from diet induced obesity, whereas TIMP1 and TIMP4 are positive regulators of adipogenesis. TIMP2 regulates positively key genes in the pancreas (Pdx1 and Glut2) and its absence in the pancreas results in β -cell dysfunction and insulin resistance. However, TIMP1 and TIMP2 are negative regulators of food intake and seem to mediate leptin action in the hypothalamus. Also, TIMP1 and TIMP2 concentrations are increased in the circulation in obese patients. Obesity results in increased circulating levels of MMP2, MMP8 and MMP9, whereas bariatric surgery-induced weight loss in obese patients is accompanied by decreased circulating MMP7 levels. Increased MMP2 in obesity inhibits leptin signaling in the hypothalamus through cleavage of its receptor ObRb resulting in a state of leptin resistance and promotes hyperphagia. In the liver, increased MMP2 expression promotes fibrosis and enhanced liver MMP9 is proinflammatory. Increased MMP14 and TIMP4 but MMP11 and TIMP3 inactivation in the liver promote liver steatosis. Moreover, High fat diet (HFD) induces an increase in TIMP1 expression in the liver. In the gut, HFD induces increased neurotensin (NT) expression which inhibits the MMP7/-defensin axis which results in gut microbiota dysbiosis and increased intestinal fat absorption. The latter is also enhanced by HFD-mediated increase in TIMP1 in the gut. In the muscle, MMPs play a role in myogenesis and muscle regeneration following injury or damage. MMP14 and TIMP2 are positive regulators of myogenesis and decreased TIMP3 expression is necessary for proper myogenesis, MMP2 and MMP13 expression are positive regulators of myogenesis and muscle regeneration after muscle injury, whereas decreased TIMP3 is necessary for muscle regeneration following injury. In Mdx mice, muscle damage is accompanied with increased expression of MMP9 and MMP13, whereas MMP9 neutralisation following injury improve muscle regeneration and decrease fibrosis.

corroborated by the study of Maquoi et al., where significant decrease in MMP7 mRNA levels were demonstrated in adipose tissue from obese mice (DIO) compared to adipose tissue from mice under a standard diet [51]. Interestingly in gonadal fat, MMP7 expression is expressed mainly in SVF with marginal expression in adipocytes whereas in ScWAT, MMP7 is expressed at higher levels in adipocytes [51]. Moreover, a negative correlation was found between MMP7 expression and gonadal adipose tissue weight, whereas this correlation was not found in ScWAT, suggesting a different role of MMP7 in GWAT and ScWAT [51].

Furthermore, in a human study it was shown that weight loss by bariatric surgery was accompanied by a significant increase in circulating levels of MMP7, though without reaching those of lean subjects [123].

Recently, it was demonstrated that neurotensin (NT), an endocrine hormone secreted by enteroendocrine N-cells of the small intestine in response to fat ingestion [124–126], is a significant contributor to gut microbiota dysbiosis and inflammation after high fat feeding through disruption of the MMP7/ α -defensin (DEFA) axis (Figure 2). Indeed, NT deficiency prevents decreased MMP7/DEFA5 expression and abnormal bacteria composition in the intestine upon HFD [127]. A previous seminal work from the same group demonstrated a direct link between neurotensin and obesity that is conserved across species [128]. Indeed, this study remarkably shows that NT deficient mice exhibit significant reduction in intestinal fat absorption, are protected from obesity, hepatic steatosis and insulin resistance. NT expression in drosophila promotes fat accumulation in midgut, fat body and oenocytes (hepatocyte-like cells) and inhibited AMPK activation. Moreover, obese and insulin resistant individuals have elevated circulating levels of pro-NT, confirming a dysregulation of NT expression during nutrient-induced obesity [128]. These observations confirm that decreased MMP7 expression is deleterious and results in aberrant gut microbiota composition, enhanced intestinal fat absorption and ultimately leads to obesity and associated metabolic abnormalities. Additional work is necessary to unravel the exact role of MMP7 in adipose tissue homeostasis taking into account that MMP7 is highly expressed in the SVF of gonadal WAT and in adipocytes in ScWAT, while MMP7 expression is significantly decreased in both GWAT and ScWAT upon high fat feeding [51]. Is the NT/MMP7/DEFA5 axis deregulated in adipose tissue during obesity? This possibility is worth exploring, given that NT receptor 3 (NTS3)/sortilin is expressed in adipocytes and located in the same intracellular vesicles expressing the glucose transporter 4 (GLUT4). Importantly, NTS3 is translocated at the cell surface in response to insulin signaling [129,130]. It remains to be determined the impact of obesity on NT/NTS3 signaling pathway.

MMP26

MMP26 also known as matrilysin-2/endothelase is among the most recently identified MMPs and is related to matrilysin-1/MMP7.

MMP26 cleaves components of the ECM such as collagen IV, fibronectin, vitronectin, denatured collagen types I to IV, gelatin, but also other proteins such as β -casein, fibrinogen, α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -PI), pro-MMP9, IGFBP-1 and cleaves itself [131–136]. Of particular note, the N-terminal domain of the estrogen receptor beta (ER β) was demonstrated to be targeted intracellularly by MMP26 for proteolysis and this effect has a favorable survival outcome in breast cancer patients [137], yet MMP26 was recently identified as a marker of circulating hepatocarcinoma cells and might play a role in epithelial-mesenchymal transition and metastases formation [138].

Regarding metabolic diseases, a variant for MMP26 (rs2499953) was associated with higher fasting glucose levels ($p=0.04$) and identified as a deleterious risk allele for diabetes in a general French population (D.E.S.I.R. study), although only a modest association was found with a higher incidence of T2D (hazard ratio of 2.02, $p=0.05$) [139]. In a previous French case-control study, the rs2499953 allele was also identified with a higher frequency in non-obese (BMI <30 kg/m²) diagnosed type 2 diabetic patients who had at least one 1st degree relative with T2DM compared with control non diabetic individuals using Human1 Bead-Chip-Arrays [140].

The contribution of the MMP26 variant to T2DM incidence should be confirmed in a larger cohort of patients and perhaps in another non-French population of patients; and if so, investigate the potential role of MMP26 in T2DM pathogenesis.

Membrane-type MMPs or MT-MMPs (MMP14, MMP15, MMP16, MMP24)

MT-MMPs are membrane-anchored proteases by a transmembrane domain (MT1-MT2-, MT3- and MT5-MMP) or a Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor (MT4- and MT6-MMP) and exert various functions related to ECM degradation, protein cleavage and release of signaling molecules, interaction through their C-terminal tail with scaffold proteins or cytoskeleton. The former group are known to activate pro-MMP2 whereas the GPI-anchored group of MT-MMP does not. Hence, they play crucial regulatory roles both in cell-cell communication and intracellular signaling [141]. Pathologically they are important contributors in cancer progression (see review in Ref. [142]). In this section, we will focus on the metabolic functions of MT-MMPs.

MMP14

The best-studied member is the pericellular collagenase MT1-MMP (MMP14) which plays an important role, recently uncovered, in adipose tissue remodeling in obesity. As collagenases, MMP14 is able to digest fibrillar collagens, but it is also able to regulate the activity and bio-availability of others MMP, in particular it activates proMMP2 [143,144] and inactivates MMP11 [145].

MMP14 is essential to AT expansion

Interestingly, MMP14 deficient mice exhibit dramatic reduction in body size, waisting and premature death[146]. Glycogen and lipid levels were significantly lower in MMP14 -/- mice due to increased levels of rate-limiting enzymes involved in catabolic pathways compared to wild-type (WT) animals. MMP14 -/- neonate animals had significantly reduced circulating triglyceride and glucose levels compared with controls. Moreover, silenced MMP14 in mammary gland epithelial cells displayed enhanced autophagy. These observations explain the failure to thrive of MMP14 -/- neonates and the premature death due to a profound metabolic disorder [146]. Another study reported the importance of MMP14 in collagen I turnover. Hence, when placed under a HFD, MMP14 haplo-insufficient mice were unable to gain weight because of their failure to remodel fat pad collagen architecture [147]. These two studies underline the primordial role of MMP14 in adipose tissue remodeling and metabolism homeostasis.

MMP14 is upregulated in mice fed with HFD via hypoxia

Li *et al.* reported a robust increase in MMP14 and collagen VI expression (both mRNA and protein levels) in obese adipose tissue of mice as early as 5 weeks of HFD and was further elevated after 18 weeks of high fat feeding compared to lean adipose tissue [148]. Interestingly, MMP14 was induced by hypoxia and treatment with a *Hypoxia Induced Factor 1 α* (HIF1 α) inhibitor prevented MMP14 induction *in vitro*, while ChIP experiments demonstrated that HIF1 α binds with a high affinity to 3 consensus motifs in the MMP14 promoter [148]. Moreover, adipose tissue-specific induced overexpression of MMP14 in established obese adipose tissue results in more increased body weight, adipocyte hypertrophy, fatty liver, insulin resistance and impaired energy expenditure, demonstrating a prominent role of MMP14 in obesity and associated abnormalities [148]. Furthermore, MMP14 overexpression promoted

adipose tissue fibrosis and inflammation with a switch in M2 to M1 macrophage polarity. Mechanistically, MMP14 is able to digest collagen type VI alpha 3 chain, to produce endotrophin, a potent inducer of fibrosis and inflammation [148].

Consistently, MMP14 has been shown to be induced in adipose tissue of genetic mouse models of obesity (*Ob/Ob* and *db/db* mice) and its expression corresponds with the presence of active MMP2 [149]. Indeed, MMP14 was previously shown to activate proteolytically proMMP2 [143,144]. Moreover, our laboratory has demonstrated that MMP14 cleaves the catalytic domain of MMP11 [145], an important regulator of energy metabolism protecting from diet-induced obesity, fatty liver and insulin resistance [71].

In human, genetic variants located near the catalytic domain of MMP14 were associated with obesity trait due to enhanced collagen turnover [147].

Altogether, these studies highlight the dual action of MMP14 during nutritional stress: at first, MMP14 is induced via hypoxic pathway to digest collagens and limit fibrosis, allowing expansion of fat tissue. At the late stage of obesity, high quantity of endotrophin is produced by digestion of COL6 α 3, which has pro-inflammatory and pro-fibrotic actions, contributing to insulin resistance.

MMP14 is important for myogenesis

MMP14 (MT1-MMP) was identified as an essential contributor to myogenesis. During myoblast differentiation, MMP14 is transiently and critically increased during the elongation process (48-72 h post differentiation induction) to gradually decline during the fusion phase. Alternatively, shMMP14 formed fewer myotubes compared with control shRNA through defective fibronectin degradation [150]. Most importantly, MMP14 deficient animals display altered heterogenous smaller myofibers with muscle tissue abnormalities at 4 weeks after birth including accumulated abnormally processed laminin compared to control mice. Mutant mice displayed also some hypertrophied myofibers with centrally-placed nuclei reminiscent of muscle dystrophy. These data indicate that MMP14 could be regarded as a novel checkpoint myogenesis factor regulating the elongation phase for subsequent myotube formation probably to degrade ECM matrix that may prevent cell fusion allowing proper muscle differentiation and maintenance [150].

MMP15

Using *in-situ* hybridization, the gene encoding the MT2-MMP (MMP15) has been mapped to chromosome 16 region 16q12.1 directly adjacent to the heterochromatin [151] and was identified to play an active role in carcinogenesis and harbor anti-apoptotic properties [152,153].

But MMP15 deregulation was also reported to contribute to human obesity and insulin resistance.

MMP15 is significantly downregulated in both omental (OM) (~ 50% decrease) and ScWAT in obese patients with high- and low-insulin resistance status (~ 40% and ~33% decrease, respectively) compared to lean individuals, whereas a clear negative correlation was observed between MMP15 expression and HOMA-IR index in both tissues [37]. Consistently, MMP15 was shown to be dramatically downregulated in TNF α -treated human SGBS adipocytes compared to untreated adipocytes [154]. Given the contributing role of TNF α in insulin resistance development during obesity (see book chapter in ref. [45]), downregulation of MMP15 may act downstream of TNF α in obesity-associated low grade inflammation to promote insulin resistance. More work is required to fully unravel the exact role of MMP15 depletion in obesity and insulin resistance states.

Finally, MMP15 mRNA levels (with calpain-4 and calpastatin) were shown to be significantly increased in subcutaneous adipose-derived stromal/stem cells (ASCs) from obese individuals and demonstrated increased invasion through Matrigel and chick chorioallantoic membrane, a type I collagen-rich extracellular matrix barrier compared to non-obese subjects. Knockdown of MMP15 resulted in decreased invasion, demonstrating the implication of MMP15 and obesity status in the invasive capacity of ASCs [155], which have been associated to increased breast cancer tumorigenesis and metastasis [156,157]. Therefore, MMP15 may represent a potential therapeutic target in the fight against obesity-associated cancers.

MMP16

The role of MT3-MMP (MMP16) in adipocyte differentiation, obesity development and diabetes is not known, whereas MT5-MMP (MMP24) has been shown to be overexpressed in the kidney of diabetic patients [158] (see below in the section regarding *MMPs and diabetic complications*).

MMP17

MT4-MMP (MMP17) is a GPI-anchored MT-MMP [159] and show little sequence homology with previous MT-MMPs suggesting a distinct function. MMP17 display poor ECM component proteolysis with the exception of fibrinogen and fibrin and exhibit pro-TNF α convertase activity suggesting a role in inflammatory processes [160]. Two studies showed that MMP17 is not able to activate pro-MMP2 [160,161], whereas another report claimed the opposite as the catalytic domain of MMP17 activates the 72-kDa procollagenase A (pro-MMP2) into MMP2 active form [162]. The functional role of this potential activation of pro-MMP2 needs further clarification. Of particular note, the *adamalysin with the thrombospondin domain* ADAMTS4 (aggrecanase-1) is also a substrate of MMP17 for its activation at the cell surface [163]. IL1-mediated aggrecan degradation from cartilage during arthritis is inhibited in MMP17 $-/-$ mice, suggesting a role of MMP17 in arthritis development [164]. Apart from its expression in the kidney of T1D diabetic rats (see section below), the role of MMP17 in obesity or adipocyte differentiation is not known.

MMP25

MMP25 (MT6-MMP) is the second GPI-anchored MMP [165], predominantly localized in cell-to-cell junctions and has been biochemically characterized as an MT-MMP with a significant level of gelatinolysis, low ability to intrinsic MMP2 activation; and which proteolytic activity is controlled by TIMP1 and TIMP2 [166]. MMP25 was also located in lipid rafts in human polymorphonuclear (PMN) cells and relocate into the cell surface during apoptosis of PMNs [167]. Although, mice deficient in MMP25 were viable, fertile and did not show any apparent phenotype, MMP25 $-/-$ exhibit defective innate immune response with a low sensitivity to bacterial LPS, hypergammaglobulinemia and diminished secretion of pro-inflammatory molecules [168]. Metabolically, an association between adiposity and epigenetic modulation of MMP25 has been found. Indeed, using genome-wide DNA methylation measurement in cord blood of 478 children, a higher methylation status of a proximal CpG site in the MMP25 promoter was found to be correlated with dual energy X-ray absorptiometry (DEXA)-scan-measured subscapular adiposity in mid-childhood [169]. More work is needed to investigate whether MMP25 is also implicated in metabolic low-grade inflammation and address the methylation status of MMP25 in mouse models of obesity.

TIMPs and metabolic functions

TIMPs are natural inhibitors and regulators of the activity of MMPs in different biological processes. Hence, any deregulation of their expression and/or their activity should have pathological consequences. Herein, we will limit our description to metabolic functions of TIMPs and the consequence of their deregulation. Deregulation of expression of TIMPs and their level of expression in metabolic abnormalities such as obesity and NAFLD have already been mentioned above and discussed in parallel of changes in MMP levels. In this section, we will mainly focus on genetic engineered mouse models targeting TIMP genes.

TIMP1

Serum level and adipose tissue level of TIMP1 is associated with metabolic syndrome and metabolic liver disease

First, it was already mentioned earlier that circulating concentrations of both TIMP1 and TIMP2 are significantly increased in patients with metabolic syndrome (MeS), and these levels were even higher in the presence of diabetes [40]. Moreover, TIMP1 and TIMP2 were correlated with BMI, waist circumference and metabolic parameters in all MeS patients [40]. The elevation in TIMP1 and TIMP2 concentrations followed the elevation in MMP2 and MMP9, perhaps as way to limit the activity of these MMP that could be deleterious to the organism of patients.

Moreover, increased expression of TIMP1 was observed in serum of NAFLD patients with fibrosis compared to NAFLD patients without fibrosis [170] and TIMP1 levels were further increased in patients with severe fibrosis compared with patient with mild or no fibrosis [171]. However, although upregulated during fibrogenesis, TIMP1 does not seem to promote fibrosis, as TIMP1 deficiency does not prevent fibrosis following induction of fibrosis [172] and in another study TIMP1 inactivation exacerbates tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice and TIMP1 [173].

TIMP1 plays a complex role in adipocyte differentiation

Wolfrum and coworkers reported an increase in both TIMP1 serum concentrations and adipose tissue protein levels in mouse models of obesity compared with lean

control animals [174], confirming earlier results showing increased TIMP1 expression in adipose tissue of Ob/Ob and db/db obese mice but also in mice under HFD [26]. Meissburger *et al.* demonstrated also that mice HFD-fed mice treated with murine recombinant TIMP1 (mrTIMP1) displayed enlarged adipocytes and disturbed metabolic profile including enhanced circulating FFA and adipose tissue insulin resistance, yet body weight were not different between mrTIMP1-injected mice and controls [174].

Consistent with the role of TIMP1 as a positive regulator of adipogenesis, Lijnen *et al.* reported significantly lower gain weight, decreased ScWAT and GWAT fat pad weights and reduced adipocyte size in *Timp1*^{-/-} mice, but also improved circulating metabolic parameters, when submitted to HFD compared to controls, whereas subtle and non-significant differences were observed on a standard diet [175]. No change in food intake nor in energy expenditure was reported under HFD and standard diet and the changes observed on HFD are ascribed to a decreased feeding efficiency (weight gain for food consumed) in *Timp1*^{-/-} compared to *Timp1*^{+/+} mice [175]. In agreement with these results, a recent report showed that *Timp1*^{-/-} (named TKO in the study) mice gained less weight compared to control mice when fed a high fat diet, but not intermediate fat-sucrose diet (IFSD), and were protected from HFD- and IFSD-induced glucose intolerance, hepatic steatosis and altered gene expression involved in lipid metabolism and inflammation. However, *Timp1* deficiency did not alter insulin sensitivity nor insulin secretion under these conditions. Overall, the authors suggested *Timp1* as a contributing factor in diet-induced obesity, hepatic steatosis and impaired glucose tolerance [176].

Interestingly, the reduced weight gain was not due to enhanced energy expenditure [174,176], but rather to decreased fat absorption as evidenced by enhanced energy content in the feces of *Timp1*^{-/-} mice under HFD [176]. Indeed, neither oxygen consumption nor heat production (indirect calorimetry) were modified *Timp1*^{-/-} mice compared to WT under HFD and expression levels of *Ucp1* and *Pgc1 α* were not altered [176]. Consistently, TIMP1 injection neither altered oxygen consumption, physical activity and feeding [174]. Hence, TIMP1 may promote dietary fat absorption in conditions of nutrient excess without affecting energy expenditure. Most importantly, there were no changes in body weight and fat pads in *Timp1*^{-/-} mice under chow diet [175,176], strongly in favor of a role of TIMP1 in promoting fat uptake in conditions of nutrient excess. It remains to be determined, whether this effect is mediated by MMP-dependent or MMP-independent mechanisms.

Alexander et al. reported *in vivo* that TIMP1 overexpressing (TO) mice showed accelerated adipocyte differentiation and uncommon colonization of adipocytes in post-lactation involuting mammary gland. Hence, a 30-40% increase in adipocyte number and size was observed in involuting mammary gland of TO mice during active recolonization [56]. Treatment of committed 3T3-L1 preadipocytes with human recombinant TIMP1, with purified human TIMP1 or with a synthetic MMP inhibitor (GM6001) yielded an accelerated rate of differentiation compared with cells treated with dexamethasone alone [56].

In apparent contradiction, Meissburger *et al.*, showed that mouse recombinant TIMP1 dose-dependently inhibits cell differentiation in 3T3-L1 and subcutaneous (but not visceral) primary preadipocytes, while neutralizing TIMP1 with an antibody resulted in enhanced adipocyte differentiation [174]. This is consistent with the high level of expression of TIMP1 (and TIMP3) in committed preadipocytes and the low expression level observed in differentiated adipocytes [56], suggesting that TIMP1 may be important for preadipocyte proliferation and commitment but its expression must be shut down to allow proper adipocyte differentiation.

TIMP1 intervenes in the regulation of food behaviour by hypothalamic action

The role of TIMP1 was further complexified by the apparently contradictory results of the KO study by Gerin *et al.* who reported that, on chow diet, deletion of *Timp1* resulted in increased body weight at 3 months (Mo) of age in female mice compared to WT animals and this increase was maintained until 12 Mo due to enhanced body fat mass [177]. *Timp1*^{-/-} mice displayed increased WAT and BAT weights, with an increase in the size and number of adipocytes but also 11% increase in the bone mineral density compared to WT animals. Moreover, *Timp1*^{-/-} mice exhibited hyperphagia despite hyperleptinemia suggesting these mice were leptin resistant and might harbor impaired hypothalamic leptin signaling [177].

Hence, this phenotype and the increased fat mass may be ascribed to the disturbed food intake behavior mediated by the abnormal leptin signaling when *Timp1* is inactivated. In fact, leptin regulates positively *Timp1* expression in the hypothalamus via signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) signaling [177]. Hence, mice lacking leptin inhibitory signals (l/l mice, mutated leptin receptor Y985L) [178] have significant increase in hypothalamic TIMP1 expression levels [177]. Therefore, TIMP1 appears to mediate the effect of leptin on food intake inhibition. Hyperphagia observed in *Timp1*^{-/-} may be secondary to the described decrease in hypothalamic mRNA levels of *hypocretin* (*Hcrt*) [177], a neuropeptide expressed in lateral

hypothalamic area (LHA) that promotes hyperphagia acutely but its decreased expression has been associated to weight gain in rodent models of obesity, consistent with a long term catabolic action of HCRT [179–181]. If these results are confirmed, TIMP1 may play an important role in the rapid rewiring of neural circuits (orexigenic and anorexigenic neurons) in the hypothalamus induced by leptin treatment in ob/ob mice [182]. Of particular note, besides the role of TIMP1 in the regulation of food behaviour in the hypothalamus, *Timp1*^{-/-} have impaired learning and memory, underscoring the important role of TIMP1 in the regulation of neuronal function and plasticity [183,184], but also other important functions such as in reproduction and heart function (for review see [185]).

It is worth mentioning that TIMP1 inactivation-induced hyperphagia and its subsequent effect on weight gain may mask the real impact of TIMP1 inhibition on adipose tissue differentiation/adipocyte size under conditions of nutritional excess. Gerin *et al.* suggested also that the effect of TIMP1 on the regulation of food intake may be gender dependent (no difference in body weight was reported in males), an assumption that was not verified by other studies. Differences in mice genetic background may account for the discrepancy between the studies of Gerin *et al.* (129S4/ SvJae) and those of Fjære *et al.* (BALB/c) and Lijnen *et al.* (C57Bl/6 x 129 SvJae founders). Furthermore, Gerin *et al.* did not investigate the impact of HFD in *Timp1*^{-/-} mice compared to WT animals. Two questions arise: i) what is the impact of HFD on *Timp1*^{-/-} mice in this genetic background (129S4/ SvJae)? and ii) would hyperphagia be exacerbated in *Timp1*^{-/-} mice upon HFD? Much work is needed to understand the role of TIMP1 in the regulation of feeding and energy homeostasis in different organs. Hence, adipose tissue-, hypothalamic-, liver- and muscle-specific inactivation/overexpression of TIMP1 in animals may bring new insight regarding the precise metabolic role of TIMP1 in each of the cited tissues.

TIMP2

TIMP2 is associated with obesity and metabolic syndrome

As mentioned earlier, TIMP2 levels were also shown to be increased in the serum of patients with MeS and were correlated with BMI [40].

In addition to TIMP2 deficiency-induced neuromotor deficit [186] and defective myogenesis [187,188], *Timp2*^{-/-}, both male and female, mice exhibit obesity with a relatively preserved glucose tolerance and insulin sensitivity. However, upon HFD, although obesity was exacerbated and glucose tolerance decreased in *Timp2*^{-/-} mice from both sexes (male were more intolerant to glucose than female mice), only male

Timp2^{-/-} mice were insulin resistant with increased pancreatic β -cell mass and hyperplasia compared to controls [189]. Interestingly, expression levels of the glucose transporter *Glut2* and the pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*) transcription factor were decreased in Timp2^{-/-} mice both under chow and HFD compared with control mice [189]. Despite enhanced β -cell mass, male Timp2^{-/-} mice under HFD develop T2D, probably because of exhaustion of β -cell, as demonstrated by the decrease in insulin immunostaining in pancreatic islets in comparison to WT mice. Of note, *Timp2* expression was decreased in both ScWAT and visceral fat upon HFD in males only (*Timp2* expression was higher in ScWAT compared to visceral fat in males whereas comparable expression was observed in female mice). The reason behind the enhanced HFD-induced insulin resistance development in Timp2^{-/-} male mice may lie in the increased adipose tissue inflammation and macrophage infiltration compared to controls [189]. Moreover, collagenolytic activity was increased in ScWAT of Timp2^{-/-} male mice as shown by increased active MMP14 (MT1-MMP) expression, in favour of an inhibitory effect of TIMP2 on MMP14. The phenotype observed in Timp2^{-/-} mice may be MMP14-dependent as it has already been shown that upon HFD, weight gain was blunted in mice with MMP14 haploinsufficiency compared to mice with normal MMP14 expression due to defect in fat pad collagen turnover as mentioned earlier [147].

TIMP2 intervenes in the regulation of food behaviour by hypothalamic action

In addition, a study from the same group demonstrated that Timp2^{-/-} were hyperphagic before the onset of obesity and were leptin resistant as evidenced by the significant reduction in the ratio of phosphoSTAT3/STAT3 in the arcuate nucleus of 2 month-old Timp2^{-/-} mice fed chow diet compared to control mice as well as an attenuated response to leptin administration on food consumption [190]. Moreover, increased net proteolysis was noted in the hypothalamus, but not globally in the entire brain, of Timp2^{-/-} mice compared to WT animals. Notably, a significant reduction in the expression of the leptin receptor ObRb in the arcuate nucleus of Timp2^{-/-} mice was observed at the start of the study before the installation of obesity, which strengthens the notion that reduced leptin signaling may reflect hyperphagia of Timp2 deficient mice, since expression of anorexigenic peptides was not modified, while expression of the orexigenic neuropeptides NPY and AgRP was even decreased [190]. Hence, just like TIMP1, TIMP2 is involved in leptin signaling in the hypothalamus.

TIMP2 is a positive regulator of myogenesis

TIMP2 expression is increased progressively during myoblast differentiation and TIMP2 $-/-$ mice exhibit altered myotube formation and decreased contractility and display sign of muscle weakness. TIMP2 is a regulator of myogenesis and neuromuscular junction development [187,188].

TIMP 3

The third member of TIMPs, TIMP3, is an inhibitor of MMPs, $\text{TNF}\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17), and VEGFR2 among other substrates [185,191].

Differential display experiments on mRNA extracted from muscle of diabetic insulin receptor haplo-insufficient mice ($\text{Insr}^{+/-}$) and not diabetic $\text{Insr}^{+/-}$ mice identified a marked decrease in TIMP3 expression in the muscle of $\text{Insr}^{+/-}$ diabetic mice. The decreased TIMP3 was responsible for the increase in TACE activity and subsequent elevation in soluble $\text{TNF}\alpha$ in serum and muscle inducing vascular inflammation and diabetes as compared with $\text{Insr}^{+/-}$ mice that were normoglycemic and had unchanged TIMP3 [192]. Consistently, double heterozygote $\text{Insr}^{+/-}/\text{Timp3}^{+/-}$ mice were overtly hyperinsulinemic and hyperglycemic and had robust increased serum and muscle $\text{TNF}\alpha$ levels at 6 months of age. This phenotype is also partly due to the enhanced adipose tissue hypertrophy and inflammation in $\text{Insr}^{+/-}/\text{Timp3}^{+/-}$ mice compared to WT and single heterozygote mice $\text{Insr}^{+/-}$ or $\text{Timp3}^{+/-}$ [193].

The liver was also affected in these mice and will be discussed hereunder in the NAFLD section of this review.

Interestingly, anti- $\text{TNF}\alpha$ therapy drastically improved glucose homeostasis in these mice through decreased $\text{TNF}\alpha$ and MMP levels [192]. Hence inhibition of TACE/MMP activities may represent a viable therapeutic approach to counter insulin resistance and diabetes.

Conversely, macrophage-specific Timp3-overexpressing mice were protected from HFD-induced metabolic inflammation, insulin resistance, glucose intolerance and NASH through decreased oxidative stress-related pathways, yet their body weight did not differ much from control mice upon HFD consumption [194]. These mice displayed reduced size of atherosclerotic lesions with enhanced stability, lower inflammation and improved metabolic parameters when crossed with low-density lipoprotein receptor (LDLR)-deficient mice [195]. Increased delivery of TIMP3 may be tested in preclinical models of diabetes and atherosclerosis, especially that no effect on body weight was observed.

TIMP4

Finally, the role of the fourth and last member of TIMPS, TIMP4, is complex and not fully understood as it is tightly linked to MMP3 as mentioned earlier. TIMP4 was shown to be highly expressed in the adipose tissue and its expression level is almost undetectable in 3T3-L1 preadipocytes, weak in committed preadipocytes and rises further upon induction of differentiation in parallel with expression of the master differentiation factor *Ppar γ* [56], an observation confirmed by Melendez-Zajgla and Coll. [196]. Moreover, treatment of primary preadipocytes with recombinant TIMP4 improved adipogenesis and decreased the inhibitory effect of MMP3 [53]. It was shown that HFD increases the ratio of Timp4/MMP3 in fat pads of female mice and decreases it in males [53].

There were also gender-dependent differences in TIMP4 expression in fat depots. For instance, Timp4 tissue level tended to be higher in inguinal ScWAT than in gonadal WAT in female, whereas the opposite occurs in males [53].

Also, Maquoi *et al.* reported that TIMP4 was expressed mainly in adipocytes and a negative correlation between the degree of adiposity and *Timp4* expression in gonadal fat of male mice [51], in agreement with the report by Wu *et al.* [53]. This is consistent with results from Alexander *et al.* showing that MMP3/stromelysin-1 deficiency yielded an accelerated mammary gland adipogenesis during involution whereas TIMP4 overexpressing mice displayed enhanced number and size of adipocytes as early as 2 days after weaning [56].

These observations suggest that the TIMP4/MMP3 ratio governs depot- and sex-dependent expansion of adipose tissue during nutrient excess in obesity. This gender dimorphism needs confirmation in humans.

It appears that the function of Timp4 in adipogenesis is more complex than just that of inhibiting MMP3. In opposition to the general observation by Wu *et al.* [53] *in vivo*, the study by Melendez-Zajgla and coll. used the 3T3-L1 preadipocyte cell line to investigate the role of TIMP4 in adipogenesis *in vitro* and showed that TIMP4 silencing using short hairpin RNA (shRNA) accelerated late phase adipocyte differentiation through decreased NF κ B activity contributing to the terminal differentiation burst [196]. Moreover, microarray analyses of shRNA-TIMP4 3T3-L1 adipocytes showed that the NF κ B pathway was among the top regulated pathways [196]. Moreover, this study revealed that upon TIMP4 inactivation, the expression levels of PPAR γ and C/EBP α were significantly enhanced [196]. Activation of the NF κ B pathway was already demonstrated to inhibit adipogenesis through decreased expression of PPAR γ [197].

This discrepancy may be cell-model dependent and may depend on the level of commitment of adipocyte progenitor cells (APC). The role of TIMP4 in adipogenesis

needs to be comprehended *in vivo*, where different cell types interact to achieve adipose tissue homeostasis in the whole body. For instance, the fact that MMP3 is mainly expressed by mouse APCs and human preadipocytes and that TIMP4 is mainly expressed by adipocytes, may represent a key element in the differences observed between males and females, since recruitment of APCs is important in adipose tissue expansion through hyperplasia and male gonadal fat has a limited capacity for hyperplasia and expand mainly by hypertrophy [198–201]. In conclusion, It appears that downregulation of MMP3 is critical to allow APCs to fully differentiate and accumulate lipids in the presence of the proper adipogenic signal. Upon HFD, downregulation of APC MMP3 is important to trigger adipogenesis and adipocyte TIMP4 may be important for the regulation of hyperplastic vs hypertrophic tissue expansion and sex-dependent fat distribution. Hence, the balance between adipocyte TIMP4 expression and APC production of MMP3 determine the sex- and depot-dependent growth of adipose tissue (hyperplasia vs hypertrophy) in response to developmental and environmental cues.

However, a recent report using *Timp4*-loss-of-function mouse model ascribed an obesogenic role for TIMP4 and a regulator of substrate utilization and energy homeostasis upon nutrient insult.

HFD induced TIMP4 protein levels in epididymal fat compared with chow diet, whereas mRNA levels tended to decrease [202]. TIMP4 deficiency did not affect body weight under chow diet compared to WT animals, whereas under HFD *Timp4*^{-/-} mice had significantly lower body weight, weight gain and fat mass (mainly epididymal) than their control counterparts despite increased food intake both under chow and HFD [202]. Interestingly, percentage of body lean mass was increased in chow diet and HFD *Timp4*^{-/-} mice compared to WT counterparts. Moreover, under chow diet despite a decrease in body fat percentage, the size of white adipocytes in epididymal fat was increased in *Timp4*^{-/-} compared to WT, that could reflect an impaired preadipocyte recruitment/proliferation and accumulation of lipids in existing mature adipocytes. However, under HFD *Timp4*^{-/-} mice display smaller adipocytes, reduced WAT inflammation and collagen deposition [202]. Notably, *Timp4*^{-/-} were protected from diet-induced increase in circulating FFA and LDL-cholesterol and displayed decreased liver and muscle triglyceride accumulation. Under HFD, Brown adipose tissue (BAT) was unaltered and basal metabolic rate as well as energy expenditure were reduced in *Timp4*^{-/-} mice compared to WT animals. The reduced body weight in HFD-*Timp4*^{-/-} mice was due to defective lipid absorption and increased FFA excretion because of decreased intestinal fatty acid transporter CD36 protein levels despite similar mRNA levels compared to HFD-WT mice [202]. It is worth mentioning that

HFD-Timp4^{-/-} mice were not protected from diet induced glucose intolerance despite reduced insulinemia and decreased fat accumulation and inflammation. This may be due to an increase utilization of lipid and decrease utilization of glucose under HFD whereas under chow diet, a significant increase in respiratory exchange ratio (RER >0.9) was observed in Timp4^{-/-} mice suggestive of increased carbohydrate utilization and decreased lipid oxidation [203], consistent with a significant improvement in glucose tolerance and adipocyte hypertrophy compared with WT mice [202]. Hence, in addition to its role in lipid absorption and effect on food intake, TIMP4 may be essential in the regulation of substrate utilization in response to HFD that could partly explain the weight loss and the failure to improve glucose tolerance despite decreased insulin resistance.

These observations suggest that TIMP4 is an important factor for adipose tissue differentiation and lipid absorption in response to nutrient excess and may govern, with MMP3, depot- and sex-dependent adipose tissue expansion during obesity.

MMPs in diabetes complications

Besides their contribution in the pathophysiology of insulin resistance and diabetes, MMPs are also implicated in complications arising from these diseases. Atherosclerosis, diabetic nephropathy (DN), and retinopathy are the most serious complications of both type 1 and type 2 diabetes.

There is a limited association between hyperglycemia and cardiovascular complications of diabetes, and increased risk of cardiovascular diseases in diabetic patients are not only explained by dyslipidemia and hypertension. Rather, insulin resistance and subsequent modification of extracellular matrix in atherosclerotic plaques, kidney capillaries and myocardium seem to be major determinants of these complications [204].

Peripheral artery disease

In peripheral artery disease (PAD), a vascular complication of diabetes mellitus [205], MMP2 and MMP9 concentrations and activities (zymography) were measured in the serum of T2D patients with or without PAD [206]. Plasma concentration of both MMP2 and MMP9, together with MMP9 activity were increased in diabetic patients with or without PAD compared to control. Of note, MMP2 activity was higher in diabetic patients with PAD compared to diabetic patients without PAD. These results

indicate that deregulation of these MMPs and subsequent increase in proteolysis may contribute to diabetes pathogenesis and its vascular complications [207,208].

Diabetic nephropathy

Diabetic nephropathy (DN) is another major complication often associated with diabetes.

Extracellular matrix accumulation and modification is a key morphologic feature of DN and several studies have shown a correlation between activity and expression of MMP and progression of diabetic nephropathy [209].

Rysz et al. measured the circulating levels of MMP2, MMP9 and their inhibitors (TIMP1 and TIMP2) in T2D patients with or without DN, in patients with non-diabetic chronic renal failure and in healthy controls [210]. Diabetic nephropathy (DN) patients had significant reduction in serum levels of MMP2, TIMP1 and TIMP2 compared to controls. TIMP1 and TIMP2 were decreased in DN patients compared to either patients with T2D alone or CRF alone [210]. In addition, ~ 2-fold increase in MMP9/TIMP1 and MMP2/TIMP2 ratio were observed in DN patients when compared to T2D patients with normal function. Moreover, TIMP2 was decreased in T2D patients compared with CRF patients alone and MMP2 was decreased in both T2D and CRF patients compared to controls. In summary, this study demonstrates that changes in circulating MMP/TIMP ratio in the course of diabetes is linked to ECM remodeling in the kidney and diabetic nephropathy development [210].

In an animal study, it was demonstrated that methylglyoxal-derived advanced glycated end-products (AGE-4), proteins that accumulate in the ECM during the progression of diabetes, induced a substantial increase in the expression of MMP2 and MMP9 in rat ordinary kidney cells through the AGE-4/RAGE axis activating ERK/JNK/NFκB signalling pathway, which ultimately promote kidney dysfunction [211]. These results strongly suggest that MMP2/9-induced ECM remodeling contribute to AGE-mediated kidney function impairment during diabetic nephropathy.

In a model of streptozocin-induced T1D, DN was also associated with alterations in the expression of MMP9 (increased) and MMP2 (reduced) and other key ECM mediators in the kidney [212].

In another study, the methylation status of a panel of genes that are closely related (MMP2, MMP9, TIMP2, AKR1B1, MYL9, SCL2A4, SCL2A1 and SCL4A3), which were known to be involved in kidney development or diabetic kidney disease or those

associated with dialysis-induced changes in gene expression in peripheral blood cells [213], has been studied in T2D patients with or without DN. Apart from MYL9 which was hypermethylated, the other were hypomethylated. A significant negative correlation between TIMP2 and AKR1B1 gene methylation and albuminuria levels suggesting that hypomethylation of these genes may represent early markers of DN [214].

Furthermore, it has been shown in rodent models that urinary enzymatic activity of excreted MMP2 and MMP9 increases in T1D mice compared to non-diabetic mice. This effect was shown to occur before hyperalbuminuria and could serve as an early biomarker of renal dysfunction in diabetes [215]. This observation was also translated in adolescent with early stage of T1D compared with non-diabetic controls [215]. These data suggest that MMP activities can be potentially translated to the clinic and may represent useful biomarkers to predict the occurrence of kidney injury and vascular complications before the onset of albuminuria in diabetic patients.

Interestingly, MMP9-single nucleotide polymorphism was recently shown to be independently associated with increased susceptibility to develop DN in T2D patients (odds ratio 6.07 [1.60–22.99], $p = 0.008$) [216]. Recently, single nucleotide polymorphisms affecting MMPs that belong to 3 different families of proteases have been associated with susceptibility to type 2 diabetes nephropathy in a population of 310 patients with type 2 diabetic nephropathy and 310 healthy controls. Functional variants in MMP1 (-1607 1G/2G), MMP2 (-1306 C/T) and MMP3 (-1171 5A/6A) were demonstrated to affect the transcriptional activity of these MMPs and were associated with increased susceptibility to DN occurrence and progression of renal disease [217].

Expression of MMP24 (MT5-MMP) expression was increased in the kidneys of diabetic patients and was shown to actively process pro-MMP2 [141,218,219]. MMP24 expression was localized to epithelial cells from distal and proximal tubules, collecting duct and Henle's loop; and tubular epithelial cells expressing MMP24 were associated with tubular atrophy, a marked contributing factor for DN development and kidney failure [158]. MMP24-induced MMP2 activation may play an important role in kidney remodeling in diabetic patients. Additional work is needed to dissect the molecular events involved both upstream and downstream of MMP24 to induce diabetic nephropathy.

Finally, the GPI-anchored MT4-MMP (MMP17) was shown to be expressed in the glomeruli of streptozotocin-mediated diabetic nephropathy in rats compared to control rats [220].

Diabetic retinopathy

Retinopathy is a common complication of diabetes. Of note, upregulation of thrombin/MMP1/protease-activated receptor-1 (PAR1) pathway in retinas of diabetic rats and in vitreous samples from patients with proliferative diabetic retinopathy compared to non-diabetic patients has been reported to promote angiogenesis and progression of proliferative diabetic retinopathy [221]. This pathway was also investigated in human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) exposed to high glucose concentrations. This pathway MMP2 and MMP9 have also been linked to diabetic retinopathy (DR) development. Increased MMP2 and MMP9 expression are found in the retina and vitreous in DR patients and animal models of DR. During the early phases of diabetic retinopathy, activation of both gelatinases occurs in the retina, which will damage the mitochondria and causes apoptosis of the retina capillary cells, whereas in the later stages they favour neovascularization promoting thereby proliferative retinopathy [222,223].

Diabetic cardiomyopathy

Diabetic cardiomyopathy, which is defined by the alteration of ventricular function of diabetic patients in the absence of coronary atherosclerosis or hypertension, is associated with left ventricular hypertrophy, fibrosis, and change in stiffness.

In streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats, cardiac fibrosis was associated with reduced MMP2 activity, increased Smad 7 and TIMP1 and decreased MT1-MMP expression [224].

A more recently identified MMP, MMP28 has an ubiquitous expression in adult tissues suggesting a role in tissue homeostasis [225]. Only two MMP28 substrates have been identified so far, namely casein and the *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) [225]. A recent work has demonstrated that deregulation of MMP28 expression occurs in a rodent model of diabetes. Indeed, MMP28 is markedly downregulated in the left ventricle of aged obese diabetic Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats compared to control lean rats, suggesting a role of MMP28 in heart function and a potential involvement of impaired MMP28 action in diabetic cardiomyopathy [226].

Whether the decrease in MMP expression is a cause or a consequence of altered left ventricular function remains to be determined.

MMP/TIMP role in metabolic fatty liver disease

NAFLD pathogenesis

Nonalcoholic metabolic disease or fatty liver disease (NAFLD) develops when excessive fat accumulates in the liver (>5% of liver hepatocytes are affected) due to either defective fatty acid oxidation, increased synthesis or both. Liver steatosis can be accompanied with inflammation and fibrosis, a condition named steatohepatitis or NASH. NAFLD has become endemic in the last years due to the increased incidence of obesity worldwide [227]. NAFLD can be caused by genetic factors, inappropriate dietary lifestyle (western nutritional habits) and epigenetic modifications. Preclinical mouse models and clinical studies have significantly improved our understanding of the molecular events occurring during the development and progression of NAFLD [228]. In the last decade, multiomic approaches helped identify new molecular targets in a search for a remedy against this disease that can ultimately lead to complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma [229,230]. In this section, we discuss the role of MMPs and their inhibitors in the pathogenesis of NAFLD.

The role of MMP2 and MMP9 and their inhibitors in fatty liver disease

Besides the adipose tissue and obesity, serum concentration and expression levels of MMP2 and MMP9 have been also studied in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). It was documented that serum concentrations of MMP2, MMP9, TIMP1 and TIMP2 but also MMP7, TGF- β 1 and - β 2 are significantly higher in NAFLD patients compared to controls, yet these markers were unable to distinguish between steatosis and steatohepatitis. Most interestingly, TIMP1 concentrations were higher in patients with significant fibrosis than those without. In fact, TIMP1 was found to be an independent predictor of fibrosis in NAFLD patients [170].

Another group showed that TIMP1 and TIMP2 liver concentrations were significantly increased in patients with severe fibrosis as compared to those with mild or no fibrosis, while proMMP2 activity was significantly higher in liver of patients with severe and mild fibrosis compared to patients with no fibrosis [171]. Moreover, proMMP9 was the only ECM component to be associated to the severity of inflammation in NASH patients and was not correlated to fibrosis [231]. This study highlighted the association of α -smooth muscle actin (α -SMA), a marker of activation of hepatic stellate cells, proMMP2, TIMP1 and TIMP2 with severity of fibrosis in NAFLD patients, whereas proMMP9 was rather associated with the severity of

inflammation [231]. Recently, our group reported a significant increase in *MMP9* transcripts, but not *MMP2*, in liver biopsies from obese NAFLD patients that underwent bariatric surgery as compared with samples from lean cholecystectomized patients and *MMP9* was significantly increased in both patients with steatosis and NASH [229]. Moreover, we observed a positive correlation between *MMP9* expression and *interleukin-32*, a proinflammatory cytokine, in liver biopsies from our cohort of patients [229]. Another study showed also increased expression of *MMP9*, and *MMP10* but not *MMP2*, in liver biopsies from patients with NASH, whereas the opposite was observed in patients with chronic viral-induced hepatitis (i.e. increased *MMP2* but not *MMP9*) [232]. However, another report showed higher *MMP2* liver expression and serum concentration of *MMP2* and hyaluronic acid in patients with NASH compared to those with simple steatosis even when excluding patients with severe fibrosis [233]. In this study, it was highlighted that *MMP2* may be a predictive factor of NASH even in patients with mild fibrosis since *MMP2* liver expression and serum levels were still elevated in NASH patients without advanced fibrosis whereas serum hyaluronic acid concentration was not different in these patients as compared with patients with simple steatosis [233]. All these studies converge to the notion that *MMP9* is rather associated with the severity of inflammation and *MMP2* with fibrosis. Interestingly, a new mediator of hepatic fibrosis has been recently identified, insulin-like growth factor binding protein related protein 1 (IGFBPrP1) that regulates *MMP/TIMP* ratio. Knockdown of IGFBPrP1 expression in mice mitigates thioacetamide-induced hepatic fibrosis through *Sonic Hedgehog* (Shh)-mediated regulation of *MMP2/TIMP2* and *MMP9/TIMP1* balance, inhibition of hepatic stellate cell activation, decreased *transforming growth factor beta* (TGF1 β) expression and degradation of the ECM [234].

The role of TIMP3 in fatty liver disease

It was mentioned earlier that *timp3* decrease was responsible for enhanced muscle, vascular and adipose tissue inflammation in diabetic *Insr^{+/-}* mice compared to non-diabetic *Insr^{+/-}* mice and double heterozygote *Insr^{+/-}/Timp3^{+/-}* mice were insulin resistant and exhibit overt hyperglycemia [190]. In *Insr^{+/-}/Timp3^{+/-}* mice, the liver, a major organ involved in the pathogenesis of T2D through enhanced hepatic glucose output, displayed significant inflammation compared with wild-type, *Insr^{+/-}*, *Timp3^{-/-}*, and *Insr^{+/-}/Tace^{+/-}* mice. Specifically, *Insr^{+/-}/Timp3^{+/-}* mice displayed macrovesicular steatosis with severe NASH including ballooned hepatocytes, lobular and periportal inflammation and perisinusoidal fibrosis [193]. To give weight to these results, *TIMP3*

expression levels were shown to be decreased in the liver of NASH patients compared to their levels in healthy controls, in agreement with decreased expression of *Timp3* in the liver of mice submitted to a choline-deficient L-amino acid defined (mouse model of NASH) or western diet with increased oxidative stress and induction of TACE activity and of fibrosis factors [235]. Consistent with a protective role of TIMP3 in NASH, adenovirus-mediated injection of *Timp3* resulted in decreased activity of TACE and of profibrotic factors [235]. Interestingly, exposure of stellate cells to advanced glycated end products (AGEs) decreased expression of *Timp3* and *sirtuin 1* (*Sirt1*) and increased that of TACE through a pathway involving nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 2 (NOX2) [235]. Altogether, these results are clearly in favor of protective role of *Timp3* from NASH development.

The role of TIMP4 in fatty liver disease

In contrast to TIMP3, TIMP4 deficiency is protective against HFD-induced hepatic steatosis as demonstrated by the robust decrease in liver expression of the rate-limiting enzyme stearyl CoA desaturase 1 (*Scd1*), involved in the conversion of saturated fatty acids (SFA) to monounsaturated fatty acid (MUFA) synthesis and one of the key enzymes in lipogenesis/steatosis and hepatic insulin resistance development during HFD [236,237], in *Timp4*^{-/-} mice compared with WT under HFD [202].

Concluding remarks and perspectives

The study of the role of MMPs and TIMPs involve human observations, animal model and in vitro experiments. The results of these different experiments do not always coincide, leading to apparently contradictory data. Several explanations can be proposed to explain contradictory results. First, despite remarkable homology between the murine and human MMP and TIMP genes, there are some interspecies differences in metabolic functions. There are also important pitfalls when using KO mouse studies, as described by Lijnen (Lijnen 10.1111/jth.13779): i) Different genetic background, or the fact that KO and their WT control may not be true littermate, may explain part of the differences in study results; ii) Data from KO mouse models should be confirmed by rescue experiments; iii) There is fundamental physiological difference between whole body KO and tissue-specific gene inactivation, multi tissular action may act as a confounding factor; iv) Gene KO may allow expression of a physiologically active truncated form of the protein of interest

MMP inhibition experiments also face confounding factors, such as cross-inhibition of several MMP, MMP auto-regulation, enzymatic redundancy or compensation.

Finally, in vitro studies findings may not be scalable to the tissue-level, because of the complex 3D microenvironment and crosstalk between numerous cells in vivo. The use of more physiological three-dimensional matrix or organoids models may be promising in unraveling the complex roles of MMP/TIMP in metabolism.

Highlights

- ***Role of MMPs/TIMPs in adipogenesis via ECM remodelling.*** It is well established that MMPs and TIMPs are key factors, both positive and negative, of adipogenesis, through their ability to remodel ECM, which allows adipocytes differentiation and hypertrophy.
- ***ECM-independent roles of MMPs.*** Beyond their direct action on the ECM, some MMPs can influence endocrine pathway, for instance MMP2 inducing leptin resistance by cleaving leptin receptor.
- ***Use of MMPs/TIMPs as biomarkers of metabolic diseases.*** Several clinical studies suggest that MMP/TIMP may serve as biomarkers of metabolic diseases and their complications, such as diabetic decompensation, diabetic nephropathy or fatty liver disease.
- ***Targeting MMP/TIMP for obesity/diabetes.*** The development of inhibitors targeting a number of MMPs or their inhibitors when their overexpression is causally implicated in obesity or its complications may prove efficient in the fight against these diseases. Alternatively, targeting some MMPs or their inhibitors to increase their action when there are deficient may also prove efficient when necessary.
- ***Targeting MMP/TIMP for myopathies.*** Some MMPs and their inhibitors are involved in myogenesis and/or repair following injury or disease. Therefore, a better comprehension of the molecular mechanisms and signaling pathways implicated in these processes may help advance our quest for a therapy against myopathies.

References

1. Vu, T.H.; Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Effectors of Development and Normal Physiology. *Genes Dev* **2000**, *14*, 2123–2133.
2. Page-McCaw, A.; Ewald, A.J.; Werb, Z. Matrix Metalloproteinases and the Regulation of Tissue Remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2007**, *8*, 221–233, doi:10.1038/nrm2125.
3. Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 786–801, doi:10.1038/nrm3904.
4. Cabral-Pacheco, G.A.; Garza-Veloz, I.; Castruita-De la Rosa, C.; Ramirez-Acuña, J.M.; Perez-Romero, B.A.; Guerrero-Rodriguez, J.F.; Martinez-Avila, N.; Martinez-Fierro, M.L. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 9739, doi:10.3390/ijms21249739.
5. Arpino, V.; Brock, M.; Gill, S.E. The Role of TIMPs in Regulation of Extracellular Matrix Proteolysis. *Matrix Biol* **2015**, *44–46*, 247–254, doi:10.1016/j.matbio.2015.03.005.
6. Cui, N.; Hu, M.; Khalil, R.A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2017**, *147*, 1–73, doi:10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
7. Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* **2010**, *141*, 52–67, doi:10.1016/j.cell.2010.03.015.
8. Chun, T.-H. Peri-Adipocyte ECM Remodeling in Obesity and Adipose Tissue Fibrosis. *Adipocyte* **2012**, *1*, 89–95, doi:10.4161/adip.19752.
9. Pellegrinelli, V.; Carobbio, S.; Vidal-Puig, A. Adipose Tissue Plasticity: How Fat Depots Respond Differently to Pathophysiological Cues. *Diabetologia* **2016**, *59*, 1075–1088, doi:10.1007/s00125-016-3933-4.
10. Tchoukalova, Y.D.; Votruba, S.B.; Tchkonja, T.; Giorgadze, N.; Kirkland, J.L.; Jensen, M.D. Regional Differences in Cellular Mechanisms of Adipose Tissue Gain with Overfeeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 18226–18231, doi:10.1073/pnas.1005259107.
11. Sillat, T.; Saat, R.; Pöllänen, R.; Hukkanen, M.; Takagi, M.; Konttinen, Y.T. Basement Membrane Collagen Type IV Expression by Human Mesenchymal Stem Cells during Adipogenic Differentiation. *J Cell Mol Med* **2012**, *16*, 1485–1495, doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01442.x.
12. Després, J.-P.; Lemieux, I. Abdominal Obesity and Metabolic Syndrome. *Nature* **2006**, *444*, 881–887, doi:10.1038/nature05488.
13. Pope, B.D.; Warren, C.R.; Parker, K.K.; Cowan, C.A. Microenvironmental Control of Adipocyte Fate and Function. *Trends Cell Biol* **2016**, *26*, 745–755, doi:10.1016/j.tcb.2016.05.005.
14. Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2014**, *15*, 786–801, doi:10.1038/nrm3904.
15. Derosa, G.; Ferrari, I.; D'Angelo, A.; Tinelli, C.; Salvadeo, S. a. T.; Ciccarelli, L.; Piccinni, M.N.; Gravina, A.; Ramondetti, F.; Maffioli, P.; et al. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Levels in Obese Patients. *Endothelium* **2008**, *15*, 219–224, doi:10.1080/10623320802228815.
16. Derosa, G.; D'Angelo, A.; Tinelli, C.; Devangelio, E.; Consoli, A.; Miccoli, R.; Penno, G.; Del Prato, S.; Paniga, S.; Cicero, A.F. Evaluation of Matrix Metalloproteinase 2 and 9 Levels and Their Inhibitors in Diabetic and Healthy Subjects. *Diabetes & metabolism* **2007**, *33*, 129–134, doi:10.1016/j.diabet.2006.11.008.
17. Han, D.H.; Kim, S.K.; Kang, S.; Choe, B.-K.; Kim, K.S.; Chung, J.-H. Matrix Metalloproteinase 2 Gene Polymorphism Is Associated with Obesity in Korean Population. *Korean J Physiol Pharmacol* **2008**, *12*, 125–129, doi:10.4196/kjpp.2008.12.3.125.
18. Bouwman, F.G.; Boer, J.M.A.; Imholz, S.; Wang, P.; Verschuren, W.M.M.; Dollé, M.E.T.; Mariman, E.C.M. Gender-Specific Genetic Associations of Polymorphisms in ACE, AKR1C2, FTO and MMP2 with Weight Gain over a 10-Year Period. *Genes & Nutrition* **2014**, *9*, 434, doi:10.1007/s12263-014-0434-2.
19. Wingrove, C.S.; Garr, E.; Godsland, I.F.; Stevenson, J.C. 17beta-Oestradiol Enhances Release of Matrix Metalloproteinase-2 from Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochim Biophys Acta* **1998**, *1406*, 169–174, doi:10.1016/s0925-4439(97)00097-5.
20. Marin-Castaño, M.E.; Elliot, S.J.; Potier, M.; Karl, M.; Striker, L.J.; Striker, G.E.; Csaky, K.G.; Cousins, S.W. Regulation of Estrogen Receptors and MMP-2 Expression by Estrogens in Human Retinal Pigment Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2003**, *44*, 50–59, doi:10.1167/iovs.01-1276.
21. Bouloumié, A.; Sengenès, C.; Portolan, G.; Galitzky, J.; Lafontan, M. Adipocyte Produces Matrix Metalloproteinases 2 and 9: Involvement in Adipose Differentiation. *Diabetes* **2001**, *50*, 2080–2086, doi:10.2337/diabetes.50.9.2080.
22. Van Hul, M.; Lijnen, H.R. A Functional Role of Gelatinase A in the Development of Nutritionally Induced Obesity in Mice. *Nature* **2006**, *444*, 881–887, doi:10.1038/nature05488.

- 1827 *J Thromb Haemost* **2008**, *6*, 1198–1206,
1828 doi:10.1111/j.1538-7836.2008.02988.x.
- 1829 23. Itoh, T.; Ikeda, T.; Gomi, H.; Nakao, S.;
1830 Suzuki, T.; Itohara, S. Unaltered
1831 Secretion of Beta-Amyloid Precursor
1832 Protein in Gelatinase A (Matrix
1833 Metalloproteinase 2)-Deficient Mice. *J*
1834 *Biol Chem* **1997**, *272*, 22389–22392,
1835 doi:10.1074/jbc.272.36.22389.
- 1836 24. Bauters, D.; Scroyen, I.; Van Hul, M.;
1837 Lijnen, H.R. Gelatinase A (MMP-2)
1838 Promotes Murine Adipogenesis.
1839 *Biochimica et biophysica acta* **2015**,
1840 *1850*, 1449–1456,
1841 doi:10.1016/j.bbagen.2015.04.003.
- 1842 25. Croissandeau, G.; Chrétien, M.; Mbikay,
1843 M. Involvement of Matrix
1844 Metalloproteinases in the Adipose
1845 Conversion of 3T3-L1 Preadipocytes.
1846 *Biochem J* **2002**, *364*, 739–746,
1847 doi:10.1042/BJ20011158.
- 1848 26. Chavey, C.; Mari, B.; Monthouel, M.-N.;
1849 Bonnafous, S.; Anglard, P.; Obberghen,
1850 E.V.; Tartare-Deckert, S. Matrix
1851 Metalloproteinases Are Differentially
1852 Expressed in Adipose Tissue during
1853 Obesity and Modulate Adipocyte
1854 Differentiation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*,
1855 11888–11896,
1856 doi:10.1074/jbc.M209196200.
- 1857 27. Smas, C.M.; Sul, H.S. Pref-1, a Protein
1858 Containing EGF-like Repeats, Inhibits
1859 Adipocyte Differentiation. *Cell* **1993**, *73*,
1860 725–734, doi:10.1016/0092-
1861 8674(93)90252-I.
- 1862 28. Friedman, J. The Long Road to Leptin. *J*
1863 *Clin Invest* **2016**, *126*, 4727–4734,
1864 doi:10.1172/JCI91578.
- 1865 29. Izquierdo, A.G.; Crujeiras, A.B.;
1866 Casanueva, F.F.; Carreira, M.C. Leptin,
1867 Obesity, and Leptin Resistance: Where
1868 Are We 25 Years Later? *Nutrients* **2019**,
1869 *11*, doi:10.3390/nu11112704.
- 1870 30. Van Hul, M.; Lijnen, H.R. Matrix
1871 Metalloproteinase Inhibition Impairs
1872 Murine Adipose Tissue Development
1873 Independently of Leptin. *Endocr J* **2011**,
1874 *58*, 101–107, doi:10.1507/endocrj.k10e-
1875 267.
- 1876 31. Mazar, R.; Friedmann-Morvinski, D.;
1877 Alsaigh, T.; Kleinfeld, O.; Kistler, E.B.;
1878 Rousso-Noori, L.; Huang, C.; Li, J.B.;
1879 Verma, I.M.; Schmid-Schönbein, G.W.
1880 Cleavage of the Leptin Receptor by
1881 Matrix Metalloproteinase-2 Promotes
1882 Leptin Resistance and Obesity in Mice.
1883 *Science Translational Medicine* **2018**, *10*,
1884 doi:10.1126/scitranslmed.aah6324.
- 1885 32. Dubois, S.G.; Tchoukalova, Y.D.;
1886 Heilbronn, L.K.; Albu, J.B.; Kelley, D.E.;
1887 Smith, S.R.; Fang, X.; Ravussin, E.
1888 Potential Role of Increased Matrix
1889 Metalloproteinase-2 (MMP2)
1890 Transcription in Impaired Adipogenesis
1891 in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biochemical*
1892 *and Biophysical Research*
1893 *Communications* **2008**, *367*, 725–728,
1894 doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.180.
- 1895 33. Poteryaeva, O.N.; Russkikh, G.S.;
1896 Zubova, A.V.; Gevorgyan, M.M.; Usynin,
1897 I.F. Changes in Activity of Matrix
1898 Metalloproteinases and Serum
1899 Concentrations of Proinsulin and C-
1900 Peptide Depending on the
1901 Compensation Stage of Type 2 Diabetes
1902 Mellitus. *Bull Exp Biol Med* **2018**, *164*,
1903 730–733, doi:10.1007/s10517-018-
1904 4068-z.
- 1905 34. Lei, H.; Leong, D.; Smith, L.R.; Barton,
1906 E.R. Matrix Metalloproteinase 13 Is a
1907 New Contributor to Skeletal Muscle
1908 Regeneration and Critical for Myoblast
1909 Migration. *Am J Physiol Cell Physiol*
1910 **2013**, *305*, C529–538,
1911 doi:10.1152/ajpcell.00051.2013.
- 1912 35. Snyman, C.; Niesler, C.U. MMP-14 in
1913 Skeletal Muscle Repair. *J Muscle Res Cell*
1914 *Motil* **2015**, *36*, 215–225,
1915 doi:10.1007/s10974-015-9414-4.
- 1916 36. Van Hul, M.; Piccard, H.; Lijnen, H.R.
1917 Gelatinase B (MMP-9) Deficiency Does
1918 Not Affect Murine Adipose Tissue
1919 Development. *Thromb Haemost* **2010**,
1920 *104*, 165–171, doi:10.1160/TH09-10-
1921 0739.
- 1922 37. Tinahones, F.J.; Coín-Aragüez, L.; Mayas,
1923 M.D.; Garcia-Fuentes, E.; Hurtado-del-
1924 Pozo, C.; Vendrell, J.; Cardona, F.; Calvo,
1925 R.-M.; Obregon, M.-J.; El Bekay, R.
1926 Obesity-Associated Insulin Resistance Is
1927 Correlated to Adipose Tissue Vascular
1928 Endothelial Growth Factors and
1929 Metalloproteinase Levels. *BMC Physiol*
1930 **2012**, *12*, 4, doi:10.1186/1472-6793-12-
1931 4.
- 1932 38. Unal, R.; Yao-Borengasser, A.; Varma, V.;
1933 Rasouli, N.; Labbate, C.; Kern, P.A.;
1934 Ranganathan, G. Matrix
1935 Metalloproteinase-9 Is Increased in
1936 Obese Subjects and Decreases in
1937 Response to Pioglitazone. *J Clin*
1938 *Endocrinol Metab* **2010**, *95*, 2993–3001,
1939 doi:10.1210/jc.2009-2623.
- 1940 39. Yu, A.P.; Tam, B.T.; Yau, W.Y.; Chan, K.S.;
1941 Yu, S.S.; Chung, T.L.; Siu, P.M.
1942 Association of Endothelin-1 and Matrix
1943 Metalloproteinase-9 with Metabolic
1944 Syndrome in Middle-Aged and Older
1945 Adults. *Diabetol Metab Syndr* **2015**, *7*,
1946 111, doi:10.1186/s13098-015-0108-2.
- 1947 40. Hopps, E.; Lo Presti, R.; Montana, M.;
1948 Noto, D.; Aversa, M.R.; Caimi, G.
1949 Gelatinases and Their Tissue Inhibitors
1950 in a Group of Subjects with Metabolic
1951 Syndrome. *J Investig Med* **2013**, *61*,
1952 978–983,
1953 doi:10.2310/JIM.0b013e318294e9da.
- 1954 41. Roberts, C.K.; Won, D.; Pruthi, S.;
1955 Kurtovic, S.; Sindhu, R.K.; Vaziri, N.D.;
1956 Barnard, R.J. Effect of a Short-Term Diet
1957 and Exercise Intervention on Oxidative
1958 Stress, Inflammation, MMP-9, and
1959 Monocyte Chemotactic Activity in Men
1960 with Metabolic Syndrome Factors. *J*
1961 *Appl Physiol (1985)* **2006**, *100*, 1657–
1962 1665,
1963 doi:10.1152/jappphysiol.01292.2005.

- 1964 42. Lee, Y.J.; Heo, Y.-S.; Park, H.S.; Lee, S.H.;
1965 Lee, S.K.; Jang, Y.J. Serum SPARC and
1966 Matrix Metalloproteinase-2 and
1967 Metalloproteinase-9 Concentrations
1968 after Bariatric Surgery in Obese Adults.
1969 *OBES SURG* **2014**, *24*, 604–610,
1970 doi:10.1007/s11695-013-1111-z.
- 1971 43. Al-Rashed, F.; Kochumon, S.; Usmani, S.;
1972 Sindhu, S.; Ahmad, R. Pam3CSK4
1973 Induces MMP-9 Expression in Human
1974 Monocytic THP-1 Cells. *CPB* **2017**, *41*,
1975 1993–2003, doi:10.1159/000475298.
- 1976 44. Dali-Youcef, N.; Mecili, M.; Ricci, R.;
1977 Andres, E. Metabolic Inflammation:
1978 Connecting Obesity and Insulin
1979 Resistance. *Annals of medicine* **2013**, *45*,
1980 242–253,
1981 doi:10.3109/07853890.2012.705015.
- 1982 45. Dali-Youcef, N.; Ricci, R. Signalling
1983 Networks Governing Metabolic
1984 Inflammation. *Handb Exp Pharmacol*
1985 **2016**, *233*, 195–220,
1986 doi:10.1007/164_2015_4.
- 1987 46. Matulewicz, N.; Stefanowicz, M.;
1988 Nikolajuk, A.; Karczewska-Kupczewska,
1989 M. Markers of Adipogenesis, but Not
1990 Inflammation, in Adipose Tissue Are
1991 Independently Related to Insulin
1992 Sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*
1993 **2017**, *102*, 3040–3049,
1994 doi:10.1210/jc.2017-00597.
- 1995 47. Muir, L.A.; Kiridena, S.; Griffin, C.;
1996 DelProposto, J.B.; Geletka, L.; Martinez-
1997 Santibañez, G.; Zamarron, B.F.; Lucas,
1998 H.; Singer, K.; O' Rourke, R.W.; et al.
1999 Frontline Science: Rapid Adipose Tissue
2000 Expansion Triggers Unique Proliferation
2001 and Lipid Accumulation Profiles in
2002 Adipose Tissue Macrophages. *Journal of*
2003 *Leukocyte Biology* **2018**, *103*, 615–628,
2004 doi:10.1002/JLB.3HI1017-422R.
- 2005 48. Miksztowicz, V.; Morales, C.; Zago, V.;
2006 Friedman, S.; Schreier, L.; Berg, G. Effect
2007 of Insulin-Resistance on Circulating and
2008 Adipose Tissue MMP-2 and MMP-9
2009 Activity in Rats Fed a Sucrose-Rich Diet.
2010 *Nutrition, metabolism, and*
2011 *cardiovascular diseases : NMCD* **2014**,
2012 *24*, 294–300,
2013 doi:10.1016/j.numecd.2013.08.007.
- 2014 49. Ribeiro, R.T.; Lutt, W.W.; Legare, D.J.;
2015 Macedo, M.P. Insulin Resistance
2016 Induced by Sucrose Feeding in Rats Is
2017 Due to an Impairment of the Hepatic
2018 Parasympathetic Nerves. *Diabetologia*
2019 **2005**, *48*, 976–983, doi:10.1007/s00125-
2020 005-1714-6.
- 2021 50. Piskór, B.M.; Przyłipiak, A.; Dąbrowska,
2022 E.; Niczyporuk, M.; Ławicki, S.
2023 Matrilysins and Stromelysins in
2024 Pathogenesis and Diagnostics of
2025 Cancers. *Cancer Manag Res* **2020**, *12*,
2026 10949–10964,
2027 doi:10.2147/CMAR.S235776.
- 2028 51. Maquoi, E.; Munaut, C.; Colige, A.;
2029 Collen, D.; Lijnen, H.R. Modulation of
2030 Adipose Tissue Expression of Murine
2031 Matrix Metalloproteinases and Their
2032 Tissue Inhibitors with Obesity. *Diabetes*
2033 **2002**, *51*, 1093–1101,
2034 doi:10.2337/diabetes.51.4.1093.
- 2035 52. Maquoi, E.; Demeulemeester, D.; Vörös,
2036 G.; Collen, D.; Lijnen, H.R. Enhanced
2037 Nutritionally Induced Adipose Tissue
2038 Development in Mice with Stromelysin-
2039 1 Gene Inactivation. *Thromb Haemost*
2040 **2003**, *89*, 696–704.
- 2041 53. Wu, Y.; Lee, M.-J.; Ido, Y.; Fried, S.K.
2042 High-Fat Diet-Induced Obesity Regulates
2043 MMP3 to Modulate Depot- and Sex-
2044 Dependent Adipose Expansion in
2045 C57BL/6J Mice. *Am J Physiol Endocrinol*
2046 *Metab* **2017**, *312*, E58–E71,
2047 doi:10.1152/ajpendo.00128.2016.
- 2048 54. Luna-Vital, D.; Luzardo-Ocampo, I.;
2049 Cuellar-Núñez, M.L.; Loarca-Piña, G.;
2050 Gonzalez de Mejia, E. Maize Extract Rich
2051 in Ferulic Acid and Anthocyanins
2052 Prevents High-Fat-Induced Obesity in
2053 Mice by Modulating SIRT1, AMPK and
2054 IL-6 Associated Metabolic and
2055 Inflammatory Pathways. *The Journal of*
2056 *Nutritional Biochemistry* **2020**, *79*,
2057 108343,
2058 doi:10.1016/j.jnutbio.2020.108343.
- 2059 55. Boumiza, S.; Bchir, S.; Ben Nasr, H.;
2060 Abbassi, A.; Jacob, M.-P.; Norel, X.;
2061 Tabka, Z.; Chahed, K. Role of MMP-1 (-
2062 519A/G, -1607 1G/2G), MMP-3
2063 (Lys45Glu), MMP-7 (-181A/G), and
2064 MMP-12 (-82A/G) Variants and Plasma
2065 MMP Levels on Obesity-Related
2066 Phenotypes and Microvascular
2067 Reactivity in a Tunisian Population. *Dis*
2068 *Markers* **2017**, *2017*, 6198526,
2069 doi:10.1155/2017/6198526.
- 2070 56. Alexander, C.M.; Selvarajan, S.;
2071 Mudgett, J.; Werb, Z. Stromelysin-1
2072 Regulates Adipogenesis during
2073 Mammary Gland Involution. *The Journal*
2074 *of cell biology* **2001**, *152*, 693–703.
- 2075 57. Unoki, H.; Bujo, H.; Shibasaki, M.; Saito,
2076 Y. Increased Matrix Metalloproteinase-3
2077 mRNA Expression in Visceral Fat in Mice
2078 Implanted with Cultured Preadipocytes.
2079 *Biochem Biophys Res Commun* **2006**,
2080 *350*, 392–398,
2081 doi:10.1016/j.bbrc.2006.09.054.
- 2082 58. Murakami, K.; Bujo, H.; Unoki, H.; Saito,
2083 Y. High Fat Intake Induces a Population
2084 of Adipocytes to Co-Express TLR2 and
2085 TNFalpha in Mice with Insulin
2086 Resistance. *Biochem Biophys Res*
2087 *Commun* **2007**, *354*, 727–734,
2088 doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.039.
- 2089 59. Kawamura, T.; Murakami, K.; Bujo, H.;
2090 Unoki, H.; Jiang, M.; Nakayama, T.;
2091 Saito, Y. Matrix Metalloproteinase-3
2092 Enhances the Free Fatty Acids-Induced
2093 VEGF Expression in Adipocytes through
2094 Toll-like Receptor 2. *Exp Biol Med*
2095 *(Maywood)* **2008**, *233*, 1213–1221,
2096 doi:10.3181/0801-RM-20.
- 2097 60. Unoki, H.; Bujo, H.; Jiang, M.;
2098 Kawamura, T.; Murakami, K.; Saito, Y.
2099 Macrophages Regulate Tumor Necrosis
2100 Factor-α Expression in Adipocytes
2101 through the Secretion of Matrix

- 2102 Metalloproteinase-3. *International*
2103 *Journal of Obesity* **2008**, *32*,
2104 doi:10.1038/ijo.2008.7.
- 2105 61. Hotamisligil, G.S. Inflammation,
2106 Metaflammation and Immunometabolic
2107 Disorders. *Nature* **2017**, *542*, 177–185,
2108 doi:10.1038/nature21363.
- 2109 62. Lijnen, H.R.; Van Hoef, B.; Rodriguez,
2110 J.A.; Paramo, J.A. Stromelysin-2 (MMP-
2111 10) Deficiency Does Not Affect Adipose
2112 Tissue Formation in a Mouse Model of
2113 Nutritionally Induced Obesity. *Biochem*
2114 *Biophys Res Commun* **2009**, *389*, 378–
2115 381, doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.170.
- 2116 63. A, O.; Fl, L.; Dj, M.; P, T. Microarray
2117 Analysis Identifies Matrix
2118 Metalloproteinases (MMPs) as Key
2119 Genes Whose Expression Is up-
2120 Regulated in Human Adipocytes by
2121 Macrophage-Conditioned Medium.
2122 *Pflugers Archiv : European journal of*
2123 *physiology* **2009**, *458*,
2124 doi:10.1007/s00424-009-0693-8.
- 2125 64. Bobadilla, M.; Sáinz, N.; Rodriguez, J.A.;
2126 Abizanda, G.; Orbe, J.; de Martino, A.;
2127 García Verdugo, J.M.; Páramo, J.A.;
2128 Prósper, F.; Pérez-Ruiz, A. MMP-10 Is
2129 Required for Efficient Muscle
2130 Regeneration in Mouse Models of Injury
2131 and Muscular Dystrophy. *Stem Cells*
2132 **2014**, *32*, 447–461,
2133 doi:10.1002/stem.1553.
- 2134 65. Rouyer, N.; Wolf, C.; Chenard, M.P.; Rio,
2135 M.C.; Chambon, P.; Bellocq, J.P.; Basset,
2136 P. Stromelysin-3 Gene Expression in
2137 Human Cancer: An Overview. *Invasion*
2138 *Metastasis* **1994**, *14*, 269–275.
- 2139 66. Basset, P.; Wolf, C.; Chambon, P.
2140 Expression of the Stromelysin-3 Gene in
2141 Fibroblastic Cells of Invasive Carcinomas
2142 of the Breast and Other Human Tissues:
2143 A Review. *Breast Cancer Res Treat* **1993**,
2144 *24*, 185–193.
- 2145 67. Zhang, X.; Huang, S.; Guo, J.; Zhou, L.;
2146 You, L.; Zhang, T.; Zhao, Y. Insights into
2147 the Distinct Roles of MMP-11 in Tumor
2148 Biology and Future Therapeutics
2149 (Review). *International Journal of*
2150 *Oncology* **2016**, *48*, 1783–1793,
2151 doi:10.3892/ijo.2016.3400.
- 2152 68. Basset, P.; Bellocq, J.P.; Wolf, C.; Stoll, I.;
2153 Hutin, P.; Limacher, J.M.; Podhajcer,
2154 O.L.; Chenard, M.P.; Rio, M.C.;
2155 Chambon, P. A Novel Metalloproteinase
2156 Gene Specifically Expressed in Stromal
2157 Cells of Breast Carcinomas. *Nature*
2158 **1990**, *348*, 699–704,
2159 doi:10.1038/348699a0.
- 2160 69. Lijnen, H.R.; Van, H.B.; Frederix, L.; Rio,
2161 M.C.; Collen, D. Adipocyte Hypertrophy
2162 in Stromelysin-3 Deficient Mice with
2163 Nutritionally Induced Obesity. *Thromb.*
2164 *Haemost.* **2002**, *87*, 530–535.
- 2165 70. Andarawewa, K.L.; Motrescu, E.R.;
2166 Chenard, M.P.; Gansmuller, A.; Stoll, I.;
2167 Tomasetto, C.; Rio, M.C. Stromelysin-3 Is
2168 a Potent Negative Regulator of
2169 Adipogenesis Participating to Cancer
2170 Cell-Adipocyte Interaction/Crosstalk at
2171 the Tumor Invasive Front. *Cancer Res*
2172 **2005**, *65*, 10862–10871,
2173 doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1231.
- 2174 71. Dali-Youcef, N.; Hnia, K.; Blaise, S.;
2175 Messaddeq, N.; Blanc, S.; Postic, C.;
2176 Valet, P.; Tomasetto, C.; Rio, M.-C.
2177 Matrix Metalloproteinase 11 Protects
2178 from Diabetes and Promotes Metabolic
2179 Switch. *Sci Rep* **2016**, *6*, 25140,
2180 doi:10.1038/srep25140.
- 2181 72. Manes, S.; Mira, E.; Barbacid, M.M.;
2182 Cipres, A.; Fernandez-Resa, P.; Buesa,
2183 J.M.; Merida, I.; Aracil, M.; Marquez, G.;
2184 Martinez, A.C. Identification of Insulin-
2185 like Growth Factor-Binding Protein-1 as
2186 a Potential Physiological Substrate for
2187 Human Stromelysin-3. *J Biol Chem* **1997**,
2188 *272*, 25706–25712.
- 2189 73. Tan, B.; Jaulin, A.; Bund, C.; Outilaft, H.;
2190 Wendling, C.; Chenard, M.-P.; Alpy, F.;
2191 Cicek, A.E.; Namer, I.J.; Tomasetto, C.; et
2192 al. Matrix Metalloproteinase-11
2193 Promotes Early Mouse Mammary Gland
2194 Tumor Growth through Metabolic
2195 Reprogramming and Increased
2196 IGF1/AKT/FoxO1 Signaling Pathway,
2197 Enhanced ER Stress and Alteration in
2198 Mitochondrial UPR. *Cancers (Basel)*
2199 **2020**, *12*,
2200 doi:10.3390/cancers12092357.
- 2201 74. Su, C.; Wang, W.; Wang, C. IGF-1-
2202 Induced MMP-11 Expression Promotes
2203 the Proliferation and Invasion of Gastric
2204 Cancer Cells through the JAK1/STAT3
2205 Signaling Pathway. *Oncol Lett* **2018**, *15*,
2206 7000–7006, doi:10.3892/ol.2018.8234.
- 2207 75. Arcidiacono, B.; Chiefari, E.; Laria, A.E.;
2208 Messineo, S.; Bilotta, F.L.; Britti, D.; Foti,
2209 D.P.; Foryst-Ludwig, A.; Kintscher, U.;
2210 Brunetti, A. Expression of Matrix
2211 Metalloproteinase-11 Is Increased
2212 under Conditions of Insulin Resistance.
2213 *World J Diabetes* **2017**, *8*, 422–428,
2214 doi:10.4239/wjd.v8.i9.422.
- 2215 76. Rockstroh, D.; Löffler, D.; Kiess, W.;
2216 Landgraf, K.; Körner, A. Regulation of
2217 Human Adipogenesis by MiR125b-5p.
2218 *Adipocyte* **2016**, *5*, 283–297,
2219 doi:10.1080/21623945.2016.1195044.
- 2220 77. Manka, S.W.; Carafoli, F.; Visse, R.;
2221 Bihan, D.; Raynal, N.; Farndale, R.W.;
2222 Murphy, G.; Enghild, J.J.; Hohenester, E.;
2223 Nagase, H. Structural Insights into
2224 Triple-Helical Collagen Cleavage by
2225 Matrix Metalloproteinase 1. *PNAS* **2012**,
2226 *109*, 12461–12466.
- 2227 78. Pardo, A.; Selman, M. MMP-1: The Elder
2228 of the Family. *Int J Biochem Cell Biol*
2229 **2005**, *37*, 283–288,
2230 doi:10.1016/j.biocel.2004.06.017.
- 2231 79. Gao, D.; Bing, C. Macrophage-Induced
2232 Expression and Release of Matrix
2233 Metalloproteinase 1 and 3 by Human
2234 Preadipocytes Is Mediated by IL-1 β via
2235 Activation of MAPK Signaling. *Journal of*
2236 *Cellular Physiology* **2011**, *226*, 2869–
2237 2880, doi:10.1002/jcp.22630.
- 2238 80. Iwata, T.; Kuwajima, M.; Sukeno, A.;
2239 Ishimaru, N.; Hayashi, Y.; Wabitsch, M.;

- 2240 Mizusawa, N.; Itakura, M.; Yoshimoto, K.
2241 YKL-40 Secreted from Adipose Tissue
2242 Inhibits Degradation of Type I Collagen.
2243 *Biochemical and Biophysical Research*
2244 *Communications* **2009**, *388*, 511–516,
2245 doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.024.
2246 81. Traurig, M.T.; Permana, P.A.; Nair, S.;
2247 Kobes, S.; Bogardus, C.; Baier, L.J.
2248 Differential Expression of Matrix
2249 Metalloproteinase 3 (MMP3) in
2250 Preadipocytes/Stromal Vascular Cells
2251 from Nonobese Nondiabetic versus
2252 Obese Nondiabetic Pima Indians.
2253 *Diabetes* **2006**, *55*, 3160–3165,
2254 doi:10.2337/db06-0373.
2255 82. Song, B.; Zhang, H.; Zhang, S. Toll-like
2256 Receptor 2 Mediates Deposition of
2257 Collagen I in Adipose Tissue of High Fat
2258 Diet-induced Obese Mice. *Molecular*
2259 *Medicine Reports* **2018**, *17*, 5958–5963,
2260 doi:10.3892/mmr.2018.8590.
2261 83. Keophiphath, M.; Achard, V.; Henegar,
2262 C.; Rouault, C.; Clément, K.; Lacasa, D.
2263 Macrophage-Secreted Factors Promote
2264 a Profibrotic Phenotype in Human
2265 Preadipocytes. *Mol Endocrinol* **2009**, *23*,
2266 11–24, doi:10.1210/me.2008-0183.
2267 84. Huber, J.; Löffler, M.; Bilban, M.;
2268 Reimers, M.; Kadl, A.; Todoric, J.; Zeyda,
2269 M.; Geyeregger, R.; Schreiner, M.;
2270 Weichhart, T.; et al. Prevention of High-
2271 Fat Diet-Induced Adipose Tissue
2272 Remodeling in Obese Diabetic Mice by
2273 n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Int J*
2274 *Obes (Lond)* **2007**, *31*, 1004–1013,
2275 doi:10.1038/sj.ijo.0803511.
2276 85. Huang, H.-L.; Wu, S.; Hsu, L.-A.; Teng,
2277 M.-S.; Lin, J.-F.; Sun, Y.-C.; Ko, Y.-L.
2278 Genetic Variants Associated with
2279 Circulating MMP1 Levels near Matrix
2280 Metalloproteinase Genes on
2281 Chromosome 11q21-22 in Taiwanese:
2282 Interaction with Obesity. *BMC Med*
2283 *Genet* **2013**, *14*, 30, doi:10.1186/1471-
2284 2350-14-30.
2285 86. Drzewoski, J.; Sliwińska, A.;
2286 Przybyłowska, K.; Sliwiński, T.; Kasznicki,
2287 J.; Zurawska-Klis, M.; Kosmowski, M.;
2288 Majsterek, I. Gene Polymorphisms and
2289 Antigen Levels of Matrix
2290 Metalloproteinase-1 in Type 2 Diabetes
2291 Mellitus Coexisting with Coronary Heart
2292 Disease. *Kardiol Pol* **2008**, *66*, 1042–
2293 1048; discussion 1049.
2294 87. Ma, Y.Z.; Jiang, Q.Y.; Kong, D.Q.
2295 Association between Matrix
2296 Metalloproteinase 1 and Type 2 Diabetes
2297 Mellitus Coexisting with Coronary Heart
2298 Disease in a Han Chinese Population.
2299 *Genet Mol Res* **2016**, *15*,
2300 doi:10.4238/gmr.15027938.
2301 88. Lin, Y.; Li, J.; Wu, D.; Wang, F.; Fang, Z.;
2302 Shen, G. Identification of Hub Genes in
2303 Type 2 Diabetes Mellitus Using
2304 Bioinformatics Analysis. *Diabetes Metab*
2305 *Syndr Obes* **2020**, *13*, 1793–1801,
2306 doi:10.2147/DMSO.S245165.
2307 89. Fan, S.-H.; Xiong, Q.-F.; Wang, L.; Zhang,
2308 L.-H.; Shi, Y.-W. Glucagon-like Peptide 1
2309 Treatment Reverses Vascular
2310 Remodelling by Downregulating Matrix
2311 Metalloproteinase 1 Expression through
2312 Inhibition of the ERK1/2/NF-KB
2313 Signalling Pathway. *Mol Cell Endocrinol*
2314 **2020**, *518*, 111005,
2315 doi:10.1016/j.mce.2020.111005.
2316 90. Van Lint, P.; Libert, C. Matrix
2317 Metalloproteinase-8: Cleavage Can Be
2318 Decisive. *Cytokine & Growth Factor*
2319 *Reviews* **2006**, *17*, 217–223,
2320 doi:10.1016/j.cytogfr.2006.04.001.
2321 91. Khokha, R.; Murthy, A.; Weiss, A.
2322 Metalloproteinases and Their Natural
2323 Inhibitors in Inflammation and
2324 Immunity. *Nat Rev Immunol* **2013**, *13*,
2325 649–665, doi:10.1038/nri3499.
2326 92. Laxton, R.C.; Hu, Y.; Duchene, J.; Zhang,
2327 F.; Zhang, Z.; Leung, K.-Y.; Xiao, Q.;
2328 Scotland, R.S.; Hodgkinson, C.P.; Smith,
2329 K.; et al. A Role of Matrix
2330 Metalloproteinase-8 in Atherosclerosis.
2331 *Circ Res* **2009**, *105*, 921–929,
2332 doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.200279.
2333 93. Herman, M.P.; Sukhova, G.K.; Libby, P.;
2334 Gerdes, N.; Tang, N.; Horton, D.B.;
2335 Kilbride, M.; Breitbart, R.E.; Chun, M.;
2336 Schönbeck, U. Expression of Neutrophil
2337 Collagenase (Matrix Metalloproteinase-
2338 8) in Human Atheroma: A Novel
2339 Collagenolytic Pathway Suggested by
2340 Transcriptional Profiling. *Circulation*
2341 **2001**, *104*, 1899–1904,
2342 doi:10.1161/hc4101.097419.
2343 94. Turu, M.M.; Krupinski, J.; Catena, E.;
2344 Rosell, A.; Montaner, J.; Rubio, F.;
2345 Alvarez-Sabin, J.; Cairols, M.; Badimon,
2346 L. Intraplaque MMP-8 Levels Are
2347 Increased in Asymptomatic Patients
2348 with Carotid Plaque Progression on
2349 Ultrasound. *Atherosclerosis* **2006**, *187*,
2350 161–169,
2351 doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.0
2352 39.
2353 95. Kato, R.; Momiyama, Y.; Ohmori, R.;
2354 Taniguchi, H.; Nakamura, H.; Ohsuzu, F.
2355 Plasma Matrix Metalloproteinase-8
2356 Concentrations Are Associated with the
2357 Presence and Severity of Coronary
2358 Artery Disease. *Circ J* **2005**, *69*, 1035–
2359 1040, doi:10.1253/circj.69.1035.
2360 96. Tuomainen, A.M.; Nyyssönen, K.;
2361 Laukkanen, J.A.; Tervahartiala, T.;
2362 Tuomainen, T.-P.; Salonen, J.T.; Sorsa,
2363 T.; Pussinen, P.J. Serum Matrix
2364 Metalloproteinase-8 Concentrations Are
2365 Associated With Cardiovascular
2366 Outcome in Men. *Arteriosclerosis,*
2367 *Thrombosis, and Vascular Biology* **2007**,
2368 *27*, 2722–2728,
2369 doi:10.1161/ATVBAHA.107.154831.
2370 97. Morla, S.; Desai, U.R. Discovery of
2371 Sulfated Small Molecule Inhibitors of
2372 Matrix Metalloproteinase-8.
2373 *Biomolecules* **2020**, *10*, E1166,
2374 doi:10.3390/biom10081166.
2375 98. Salminen, A.; Åström, P.; Metso, J.;
2376 Soliymani, R.; Salo, T.; Jauhainen, M.;
2377 Pussinen, P.J.; Sorsa, T. Matrix

- 2378 Metalloproteinase 8 Degrades
2379 Apolipoprotein A-I and Reduces Its
2380 Cholesterol Efflux Capacity. *The FASEB*
2381 *Journal* **2015**, *29*, 1435–1445,
2382 doi:10.1096/fj.14-262956.
- 2383 99. Golub, L.M.; Lee, H.M.; Ryan, M.E.;
2384 Giannobile, W.V.; Payne, J.; Sorsa, T.
2385 Tetracyclines Inhibit Connective Tissue
2386 Breakdown by Multiple Non-
2387 Antimicrobial Mechanisms. *Adv Dent*
2388 *Res* **1998**, *12*, 12–26,
2389 doi:10.1177/08959374980120010501.
- 2390 100. Lauhio, A.; Färkkilä, E.; Pietiläinen, K.H.;
2391 Åström, P.; Winkelmann, A.;
2392 Tervahartiala, T.; Pirilä, E.; Rissanen, A.;
2393 Kaprio, J.; Sorsa, T.A.; et al. Association
2394 of MMP-8 with Obesity, Smoking and
2395 Insulin Resistance. *European Journal of*
2396 *Clinical Investigation* **2016**, *46*, 757–765,
2397 doi:10.1111/eci.12649.
- 2398 101. Gonçalves, F.M.; Jacob-Ferreira, A.L.B.;
2399 Gomes, V.A.; Casella-Filho, A.; Chagas,
2400 A.C.P.; Marcaccini, A.M.; Gerlach, R.F.;
2401 Tanus-Santos, J.E. Increased Circulating
2402 Levels of Matrix Metalloproteinase
2403 (MMP)-8, MMP-9, and pro-
2404 Inflammatory Markers in Patients with
2405 Metabolic Syndrome. *Clinica Chimica*
2406 *Acta* **2009**, *403*, 173–177,
2407 doi:10.1016/j.cca.2009.02.013.
- 2408 102. Zayani, Y.; El Golli, N.; Zidi, W.; Guizani,
2409 I.; Boussairi, S.; Aloui, S.; Ayadi, I.;
2410 Ftouhi, B.; Feki, M.; Ben Romdhane, N.;
2411 et al. Inflammations Mediators and
2412 Circulating Levels of Matrix
2413 Metalloproteinases: Biomarkers of
2414 Diabetes in Tunisians Metabolic
2415 Syndrome Patients. *Cytokine* **2016**, *86*,
2416 47–52, doi:10.1016/j.cyto.2016.07.009.
- 2417 103. Liberale, L.; Bonaventura, A.; Carbone,
2418 F.; Bertolotto, M.; Contini, P.; Scopinaro,
2419 N.; Camerini, G.B.; Papadia, F.S.;
2420 Cordera, R.; Camici, G.G.; et al. Early
2421 Reduction of Matrix Metalloproteinase-
2422 8 Serum Levels Is Associated with Leptin
2423 Drop and Predicts Diabetes Remission
2424 after Bariatric Surgery. *Int J Cardiol*
2425 **2017**, *245*, 257–262,
2426 doi:10.1016/j.ijcard.2017.07.044.
- 2427 104. Kuehl, M.N.; Rodriguez, H.; Burkhardt,
2428 B.R.; Alman, A.C. Tumor Necrosis Factor-
2429 α , Matrix-Metalloproteinases 8 and 9
2430 Levels in the Saliva Are Associated with
2431 Increased Hemoglobin A1c in Type 1
2432 Diabetes Subjects. *PLoS One* **2015**, *10*,
2433 e0125320,
2434 doi:10.1371/journal.pone.0125320.
- 2435 105. Akcali, A.; Gümüş, P.; Özçaka, Ö.;
2436 Öztürk-Ceyhan, B.; Tervahartiala, T.;
2437 Husu, H.; Heikkinen, A.M.; Sorsa, T.;
2438 Buduneli, N. Proteolytic Mediators in
2439 Gestational Diabetes Mellitus and
2440 Gingivitis. *J Periodontol* **2017**, *88*, 289–
2441 297, doi:10.1902/jop.2016.160158.
- 2442 106. Huhtala, M.S.; Tertti, K.; Juhila, J.; Sorsa,
2443 T.; Rönnemaa, T. Metformin and Insulin
2444 Treatment of Gestational Diabetes:
2445 Effects on Inflammatory Markers and
2446 IGF-Binding Protein-1 – Secondary
2447 Analysis of a Randomized Controlled
2448 Trial. *BMC Pregnancy Childbirth* **2020**,
2449 *20*, doi:10.1186/s12884-020-03077-6.
- 2450 107. KIM, S.M.; ROMERO, R.; PARK, J.W.; OH,
2451 K.J.; JUN, J.K.; YOON, B.H. The
2452 Relationship between the Intensity of
2453 Intra-Amniotic Inflammation and the
2454 Presence and Severity of Acute
2455 Histologic Chorioamnionitis in Preterm
2456 Gestations. *J Matern Fetal Neonatal*
2457 *Med* **2015**, *28*, 1500–1509,
2458 doi:10.3109/14767058.2014.961009.
- 2459 108. Ashford, K.; Chavan, N.R.; Wiggins, A.T.;
2460 Sayre, M.M.; McCubbin, A.; Critchfield,
2461 A.S.; O'Brien, J. Comparison of Serum
2462 and Cervical Cytokine Levels throughout
2463 Pregnancy between Preterm and Term
2464 Births. *AJP Rep* **2018**, *8*, e113–e120,
2465 doi:10.1055/s-0038-1656534.
- 2466 109. Berg, G.; Barchuk, M.; Mikszowicz, V.
2467 Behavior of Metalloproteinases in
2468 Adipose Tissue, Liver and Arterial Wall:
2469 An Update of Extracellular Matrix
2470 Remodeling. *Cells* **2019**, *8*, 158,
2471 doi:10.3390/cells8020158.
- 2472 110. Shih, C.L.; Ajuwon, K.M. Inhibition of
2473 MMP-13 Prevents Diet-Induced Obesity
2474 in Mice and Suppresses Adipogenesis in
2475 3T3-L1 Preadipocytes. *Molecular biology*
2476 *reports* **2015**, doi:10.1007/s11033-015-
2477 3861-2.
- 2478 111. Stickens, D.; Behonick, D.J.; Ortega, N.;
2479 Heyer, B.; Hartenstein, B.; Yu, Y.;
2480 Fosang, A.J.; Schorpp-Kistner, M.; Angel,
2481 P.; Werb, Z. Altered Endochondral Bone
2482 Development in Matrix
2483 Metalloproteinase 13-Deficient Mice.
2484 *Development* **2004**, *131*, 5883–5895,
2485 doi:10.1242/dev.01461.
- 2486 112. Smith, L.R.; Kok, H.J.; Zhang, B.; Chung,
2487 D.; Spradlin, R.A.; Rakoczy, K.D.; Lei, H.;
2488 Boesze-Battaglia, K.; Barton, E.R. Matrix
2489 Metalloproteinase 13 from Satellite
2490 Cells Is Required for Efficient Muscle
2491 Growth and Regeneration. *Cell Physiol*
2492 *Biochem* **2020**, *54*, 333–353,
2493 doi:10.33594/000000223.
- 2494 113. Murphy, G.; Knäuper, V.; Cowell, S.;
2495 Hembry, R.; Stanton, H.; Butler, G.;
2496 Freije, J.; Pendás, A.M.; López-Otín, C.
2497 Evaluation of Some Newer Matrix
2498 Metalloproteinases. *Annals of the New*
2499 *York Academy of Sciences* **1999**, *878*,
2500 25–39, doi:10.1111/j.1749-
2501 6632.1999.tb07672.x.
- 2502 114. Pendás, A.M.; Folgueras, A.R.; Llano, E.;
2503 Caterina, J.; Frerard, F.; Rodríguez, F.;
2504 Astudillo, A.; Noël, A.; Birkedal-Hansen,
2505 H.; López-Otín, C. Diet-Induced Obesity
2506 and Reduced Skin Cancer Susceptibility
2507 in Matrix Metalloproteinase 19-
2508 Deficient Mice. *Mol Cell Biol* **2004**, *24*,
2509 5304–5313,
2510 doi:10.1128/MCB.24.12.5304-
2511 5313.2004.
- 2512 115. Stracke, J.O.; Fosang, A.J.; Last, K.;
2513 Mercuri, F.A.; Pendás, A.M.; Llano, E.;
2514 Perris, R.; Di Cesare, P.E.; Murphy, G.;
2515 Knäuper, V. Matrix Metalloproteinases

- 19 and 20 Cleave Aggrecan and Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP). *FEBS Lett* **2000**, 478, 52–56, doi:10.1016/s0014-5793(00)01819-6.
116. Stracke, J.O.; Hutton, M.; Stewart, M.; Pendás, A.M.; Smith, B.; López-Otin, C.; Murphy, G.; Knäuper, V. Biochemical Characterization of the Catalytic Domain of Human Matrix Metalloproteinase 19. Evidence for a Role as a Potent Basement Membrane Degrading Enzyme. *J Biol Chem* **2000**, 275, 14809–14816, doi:10.1074/jbc.275.20.14809.
117. Werb, Z.; Gordon, S. Elastase Secretion by Stimulated Macrophages. Characterization and Regulation. *J Exp Med* **1975**, 142, 361–377, doi:10.1084/jem.142.2.361.
118. Belaaouaj, A.; Shipley, J.M.; Kobayashi, D.K.; Zimonjic, D.B.; Popescu, N.; Silverman, G.A.; Shapiro, S.D. Human Macrophage Metalloelastase. Genomic Organization, Chromosomal Location, Gene Linkage, and Tissue-Specific Expression. *J Biol Chem* **1995**, 270, 14568–14575, doi:10.1074/jbc.270.24.14568.
119. Bauters, D.; Van Hul, M.; Lijnen, H.R. Macrophage Elastase (MMP-12) in Expanding Murine Adipose Tissue. *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1830, 2954–2959, doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.024.
120. Lee, J.-T.; Pamir, N.; Liu, N.-C.; Kirk, E.A.; Averill, M.M.; Becker, L.; Larson, I.; Hagman, D.K.; Foster-Schubert, K.E.; van Yserloo, B.; et al. Macrophage Metalloelastase (MMP12) Regulates Adipose Tissue Expansion, Insulin Sensitivity, and Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Endocrinology* **2014**, 155, 3409–3420, doi:10.1210/en.2014-1037.
121. Grzechocińska, B.; Dąbrowski, F.A.; Sierdzinski, J.; Cyganek, A.; Wielgoś, M. The Association between Serum Metalloproteinase Concentration, Obesity, and Hormone Levels in Reproductive-Aged Women. *Endokrynol Pol* **2019**, 70, 49–56, doi:10.5603/EP.a2018.0067.
122. Lawler, H.M.; Underkofler, C.M.; Kern, P.A.; Erickson, C.; Bredbeck, B.; Rasouli, N. Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation, and Fibrosis in Obese Insulin-Sensitive and Obese Insulin-Resistant Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **2016**, 101, 1422–1428, doi:10.1210/jc.2015-4125.
123. Ress, C.; Tschoner, A.; Ciardi, C.; Laimer, M.W.; Engl, J.W.; Sturm, W.; Weiss, H.; Tilg, H.; Ebenbichler, C.F.; Patsch, J.R.; et al. Influence of Significant Weight Loss on Serum Matrix Metalloproteinase (MMP)-7 Levels. *Eur Cytokine Netw* **2010**, 21, 65–70, doi:10.1684/ecn.2009.0177.
124. Barber, D.L.; Cacace, A.M.; Raucchi, D.T.; Ganz, M.B. Fatty Acids Stereospecifically Stimulate Neurotensin Release and Increase [Ca²⁺]_i in Enteric Endocrine Cells. *Am J Physiol* **1991**, 261, G497–503, doi:10.1152/ajpgi.1991.261.3.G497.
125. Miyashita, T.; Hashimoto, T.; Gomez, G.; Courtney M. Townsend, J.; George H. Greeley, J.; Thompson, J.C. Neurotensin Secretion in Response to Intraduodenal and Intraileal Administration of Fat in Dogs. *NSG* **1992**, 1, 275–281, doi:10.1159/000109332.
126. Drewe, J.; Mihailovic, S.; D’Amato, M.; Beglinger, C. Regulation of Fat-Stimulated Neurotensin Secretion in Healthy Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **2008**, 93, 1964–1970, doi:10.1210/jc.2007-2238.
127. Li, J.; Li, X.; Song, J.; Yan, B.; Rock, S.A.; Jia, J.; Liu, J.; Wang, C.; Weiss, T.; Weiss, H.L.; et al. Absence of Neurotensin Attenuates Intestinal Dysbiosis and Inflammation by Maintaining Mmp7/α-Defensin Axis in Diet-Induced Obese Mice. *The FASEB Journal* **2020**, 34, 8596–8610, doi:10.1096/fj.201902374RR.
128. Li, J.; Song, J.; Zaytseva, Y.Y.; Liu, Y.; Rychahou, P.; Jiang, K.; Starr, M.E.; Kim, J.T.; Harris, J.W.; Yiannikouris, F.B.; et al. An Obligatory Role for Neurotensin in High-Fat-Diet-Induced Obesity. *Nature* **2016**, 533, 411–415, doi:10.1038/nature17662.
129. Lin, B.-Z.; Pilch, P.F.; Kandror, K.V. Sortilin Is a Major Protein Component of Glut4-Containing Vesicles *. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 24145–24147, doi:10.1074/jbc.272.39.24145.
130. Morris, N.J.; Ross, S.A.; Lane, W.S.; Moestrup, S.K.; Petersen, C.M.; Keller, S.R.; Lienhard, G.E. Sortilin Is the Major 110-KDa Protein in GLUT4 Vesicles from Adipocytes. *J Biol Chem* **1998**, 273, 3582–3587, doi:10.1074/jbc.273.6.3582.
131. de Coignac, A.B.; Elson, G.; Delneste, Y.; Magistrelli, G.; Jeannin, P.; Aubry, J.P.; Berthier, O.; Schmitt, D.; Bonnefoy, J.Y.; Gauchat, J.F. Cloning of MMP-26. A Novel Matrilysin-like Proteinase. *Eur J Biochem* **2000**, 267, 3323–3329, doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01363.x.
132. Marchenko, G.N.; Ratnikov, B.I.; Rozanov, D.V.; Godzik, A.; Deryugina, E.I.; Strongin, A.Y. Characterization of Matrix Metalloproteinase-26, a Novel Metalloproteinase Widely Expressed in Cancer Cells of Epithelial Origin. *Biochem J* **2001**, 356, 705–718, doi:10.1042/0264-6021:3560705.
133. Marchenko, N.D.; Marchenko, G.N.; Strongin, A.Y. Unconventional Activation Mechanisms of MMP-26, a Human Matrix Metalloproteinase with a Unique PHCGXXD Cysteine-Switch Motif. *J Biol Chem* **2002**, 277, 18967–18972, doi:10.1074/jbc.M201197200.
134. Park, H.I.; Turk, B.E.; Gerkema, F.E.; Cantley, L.C.; Sang, Q.-X.A. Peptide

- 2654 Substrate Specificities and Protein
2655 Cleavage Sites of Human
2656 Endometase/Matrilysin-2/Matrix
2657 Metalloproteinase-26 *. *Journal of*
2658 *Biological Chemistry* **2002**, 277, 35168–
2659 35175, doi:10.1074/jbc.M205071200.
2660 135. Zhao, Y.-G.; Xiao, A.-Z.; Newcomer, R.G.;
2661 Park, H.I.; Kang, T.; Chung, L.W.K.;
2662 Swanson, M.G.; Zhou, H.E.;
2663 Kurhanewicz, J.; Sang, Q.-X.A. Activation
2664 of Pro-Gelatinase B by
2665 Endometase/Matrilysin-2 Promotes
2666 Invasion of Human Prostate Cancer
2667 Cells. *J Biol Chem* **2003**, 278, 15056–
2668 15064, doi:10.1074/jbc.M210975200.
2669 136. Mu, T.; Liang, W.; Ju, Y.; Wang, Z.;
2670 Wang, Z.; Roycik, M.D.; Sang, Q.-X.A.;
2671 Yu, D.; Xiang, H.; Fang, X. Efficient
2672 Soluble Expression of Secreted Matrix
2673 Metalloproteinase 26 in *Brevibacillus*
2674 *Choshinensis*. *Protein Expr Purif* **2013**,
2675 91, 125–133,
2676 doi:10.1016/j.pep.2013.07.012.
2677 137. Savinov, A.Y.; Remacle, A.G.; Golubkov,
2678 V.S.; Krajewska, M.; Kennedy, S.; Duffy,
2679 M.J.; Rozanov, D.V.; Krajewski, S.;
2680 Strongin, A.Y. Matrix Metalloproteinase
2681 26 Proteolysis of the NH2-Terminal
2682 Domain of the Estrogen Receptor Beta
2683 Correlates with the Survival of Breast
2684 Cancer Patients. *Cancer Res* **2006**, 66,
2685 2716–2724, doi:10.1158/0008-
2686 5472.CAN-05-3592.
2687 138. Yu, C.; Wang, Z.; Xu, X.; Xiang, W.;
2688 Huang, X. Circulating Hepatocellular
2689 Carcinoma Cells Are Characterized by
2690 CXCR4 and MMP26. *CPB* **2015**, 36,
2691 2393–2402, doi:10.1159/000430201.
2692 139. Cauchi, S.; Proença, C.; Choquet, H.;
2693 Gaget, S.; De Graeve, F.; Marre, M.;
2694 Balkau, B.; Tichet, J.; Meyre, D.;
2695 Vaxillaire, M.; et al. Analysis of Novel
2696 Risk Loci for Type 2 Diabetes in a
2697 General French Population: The
2698 D.E.S.I.R. Study. *J Mol Med (Berl)* **2008**,
2699 86, 341–348, doi:10.1007/s00109-007-
2700 0295-x.
2701 140. Sladek, R.; Rocheleau, G.; Rung, J.; Dina,
2702 C.; Shen, L.; Serre, D.; Boutin, P.;
2703 Vincent, D.; Belisle, A.; Hadjadj, S.; et al.
2704 A Genome-Wide Association Study
2705 Identifies Novel Risk Loci for Type 2
2706 Diabetes. *Nature* **2007**, 445, 881–885,
2707 doi:10.1038/nature05616.
2708 141. Itoh, Y. Membrane-Type Matrix
2709 Metalloproteinases: Their Functions and
2710 Regulations. *Matrix Biol* **2015**, 44–46,
2711 207–223,
2712 doi:10.1016/j.matbio.2015.03.004.
2713 142. Turunen, S.P.; Tatti-Bugaeva, O.; Lehti,
2714 K. Membrane-Type Matrix
2715 Metalloproteases as Diverse Effectors of
2716 Cancer Progression. *Biochimica et*
2717 *Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell*
2718 *Research* **2017**, 1864, 1974–1988,
2719 doi:10.1016/j.bbamcr.2017.04.002.
2720 143. Sternlicht, M.D.; Werb, Z. How Matrix
2721 Metalloproteinases Regulate Cell
2722 Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
2723 **2001**, 17, 463–516,
2724 doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.463.
2725 144. Deryugina, E.I.; Ratnikov, B.; Monosov,
2726 E.; Postnova, T.I.; DiScipio, R.; Smith,
2727 J.W.; Strongin, A.Y. MT1-MMP Initiates
2728 Activation of pro-MMP-2 and Integrin
2729 $\text{Av}\beta 3$ Promotes Maturation of MMP-2 in
2730 Breast Carcinoma Cells. *Experimental*
2731 *Cell Research* **2001**, 263, 209–223,
2732 doi:10.1006/excr.2000.5118.
2733 145. Buache, E.; Thai, R.; Wendling, C.; Alpy,
2734 F.; Page, A.; Chenard, M.-P.; Dive, V.;
2735 Ruff, M.; Dejaegere, A.; Tomasetto, C.;
2736 et al. Functional Relationship between
2737 Matrix Metalloproteinase-11 and Matrix
2738 Metalloproteinase-14. *Cancer Med*
2739 **2014**, 3, 1197–1210,
2740 doi:10.1002/cam4.290.
2741 146. Mori, H.; Bhat, R.; Bruni-Cardoso, A.;
2742 Chen, E.I.; Jorgens, D.M.; Coutinho, K.;
2743 Louie, K.; Bowen, B.B.; Inman, J.L.;
2744 Tecca, V.; et al. New Insight into the
2745 Role of MMP14 in Metabolic Balance.
2746 *PeerJ* **2016**, 4, e2142,
2747 doi:10.7717/peerj.2142.
2748 147. Chun, T.-H.; Inoue, M.; Morisaki, H.;
2749 Yamanaka, I.; Miyamoto, Y.; Okamura,
2750 T.; Sato-Kusubata, K.; Weiss, S.J. Genetic
2751 Link between Obesity and MMP14-
2752 Dependent Adipogenic Collagen
2753 Turnover. *Diabetes* **2010**, 59, 2484–
2754 2494, doi:10.2337/db10-0073.
2755 148. Li, X.; Zhao, Y.; Chen, C.; Yang, L.; Lee,
2756 H.-H.; Wang, Z.; Zhang, N.; Kolonin,
2757 M.G.; An, Z.; Ge, X.; et al. Critical Role of
2758 Matrix Metalloproteinase 14 in Adipose
2759 Tissue Remodeling during Obesity.
2760 *Molecular and Cellular Biology* **2020**, 40,
2761 doi:10.1128/MCB.00564-19.
2762 149. Chavey, C.; Mari, B.; Montheuol, M.-N.;
2763 Bonnafous, S.; Anglard, P.; Obberghen,
2764 E.V.; Tartare-Deckert, S. Matrix
2765 Metalloproteinases Are Differentially
2766 Expressed in Adipose Tissue during
2767 Obesity and Modulate Adipocyte
2768 Differentiation *. *Journal of Biological*
2769 *Chemistry* **2003**, 278, 11888–11896,
2770 doi:10.1074/jbc.M209196200.
2771 150. Ohtake, Y.; Tojo, H.; Seiki, M.
2772 Multifunctional Roles of MT1-MMP in
2773 Myofiber Formation and Morphostatic
2774 Maintenance of Skeletal Muscle. *J Cell*
2775 *Sci* **2006**, 119, 3822–3832,
2776 doi:10.1242/jcs.03158.
2777 151. Koehler, M.R.; Sauer, C.G.; Reismann,
2778 N.; Steinlein, C.; Weber, B.H.; Will, H.;
2779 Schmid, M. Localization of the Human
2780 Membrane-Type 2 Matrix
2781 Metalloproteinase Gene (MMP15) to
2782 16q12.1 near DNA Elements That Are
2783 Part of Centromeric and Non-
2784 Centromeric Heterochromatin of 11
2785 Human Chromosomes. *Chromosome*
2786 *Res* **1998**, 6, 199–203,
2787 doi:10.1023/a:1009259617758.
2788 152. Zhang, J.; Sarkar, S.; Yong, V.W. The
2789 Chemokine Stromal Cell Derived Factor-
2790 1 (CXCL12) Promotes Glioma
2791 Invasiveness through MT2-Matrix

- 2792 Metalloproteinase. *Carcinogenesis*
2793 **2005**, 26, 2069–2077,
2794 doi:10.1093/carcin/bgi183.
- 2795 153. Abraham, R.; Schäfer, J.; Rothe, M.;
2796 Bange, J.; Knyazev, P.; Ullrich, A.
2797 Identification of MMP-15 as an Anti-
2798 Apoptotic Factor in Cancer Cells. *J Biol*
2799 *Chem* **2005**, 280, 34123–34132,
2800 doi:10.1074/jbc.M508155200.
- 2801 154. Do, M.-S.; Jeong, H.-S.; Choi, B.-H.;
2802 Hunter, L.; Langley, S.; Pazmany, L.;
2803 Trayhurn, P. Inflammatory Gene
2804 Expression Patterns Revealed by DNA
2805 Microarray Analysis in TNF-Alpha-
2806 Treated SGBS Human Adipocytes. *Yonsei*
2807 *Med J* **2006**, 47, 729–736,
2808 doi:10.3349/ymj.2006.47.5.729.
- 2809 155. Strong, A.L.; Semon, J.A.; Strong, T.A.;
2810 Santoke, T.T.; Zhang, S.; McFerrin, H.E.;
2811 Gimble, J.M.; Bunnell, B.A. Obesity-
2812 Associated Dysregulation of Calpastatin
2813 and MMP-15 in Adipose-Derived
2814 Stromal Cells Results in Their Enhanced
2815 Invasion. *STEM CELLS* **2012**, 30, 2774–
2816 2783, doi:10.1002/stem.1229.
- 2817 156. Jotzu, C.; Alt, E.; Welte, G.; Li, J.;
2818 Hennessy, B.T.; Devarajan, E.;
2819 Krishnappa, S.; Pinilla, S.; Droll, L.; Song,
2820 Y.-H. Adipose Tissue Derived Stem Cells
2821 Differentiate into Carcinoma-Associated
2822 Fibroblast-like Cells under the Influence
2823 of Tumor Derived Factors. *Cellular Onc.*
2824 **2011**, 34, 55–67, doi:10.1007/s13402-
2825 011-0012-1.
- 2826 157. Zimmerlin, L.; Donnenberg, A.D.; Rubin,
2827 J.P.; Basse, P.; Landreneau, R.J.;
2828 Donnenberg, V.S. Regenerative Therapy
2829 and Cancer: In Vitro and in Vivo Studies
2830 of the Interaction between Adipose-
2831 Derived Stem Cells and Breast Cancer
2832 Cells from Clinical Isolates. *Tissue Eng*
2833 *Part A* **2011**, 17, 93–106,
2834 doi:10.1089/ten.TEA.2010.0248.
- 2835 158. Romanic, A.M.; Burns-Kurtis, C.L.; Ao, Z.;
2836 Arleth, A.J.; Ohlstein, E.H. Upregulated
2837 Expression of Human Membrane Type-5
2838 Matrix Metalloproteinase in Kidneys
2839 from Diabetic Patients. *Am J Physiol*
2840 *Renal Physiol* **2001**, 281, F309–F317,
2841 doi:10.1152/ajprenal.2001.281.2.F309.
- 2842 159. Itoh, Y.; Kajita, M.; Kinoh, H.; Mori, H.;
2843 Okada, A.; Seiki, M. Membrane Type 4
2844 Matrix Metalloproteinase (MT4-MMP,
2845 MMP-17) Is a
2846 Glycosylphosphatidylinositol-Anchored
2847 Proteinase. *J Biol Chem* **1999**, 274,
2848 34260–34266,
2849 doi:10.1074/jbc.274.48.34260.
- 2850 160. English, W.R.; Puente, X.S.; Freije, J.M.;
2851 Knauper, V.; Amour, A.; Merryweather,
2852 A.; Lopez-Otin, C.; Murphy, G.
2853 Membrane Type 4 Matrix
2854 Metalloproteinase (MMP17) Has Tumor
2855 Necrosis Factor-Alpha Convertase
2856 Activity but Does Not Activate pro-
2857 MMP2. *J Biol Chem* **2000**, 275, 14046–
2858 14055, doi:10.1074/jbc.275.19.14046.
- 2859 161. Kolkenbrock, H.; Essers, L.; Ulbrich, N.;
2860 Will, H. Biochemical Characterization of
2861 the Catalytic Domain of Membrane-
2862 Type 4 Matrix Metalloproteinase. *Biol*
2863 *Chem* **1999**, 380, 1103–1108,
2864 doi:10.1515/BC.1999.137.
- 2865 162. Wang, Y.; Johnson, A.R.; Ye, Q.Z.; Dyer,
2866 R.D. Catalytic Activities and Substrate
2867 Specificity of the Human Membrane
2868 Type 4 Matrix Metalloproteinase
2869 Catalytic Domain. *J Biol Chem* **1999**, 274,
2870 33043–33049,
2871 doi:10.1074/jbc.274.46.33043.
- 2872 163. Gao, G.; Plaas, A.; Thompson, V.P.; Jin,
2873 S.; Zuo, F.; Sandy, J.D. ADAMTS4
2874 (Aggrecanase-1) Activation on the Cell
2875 Surface Involves C-Terminal Cleavage by
2876 Glycosylphosphatidyl Inositol-Anchored
2877 Membrane Type 4-Matrix
2878 Metalloproteinase and Binding of the
2879 Activated Proteinase to Chondroitin
2880 Sulfate and Heparan Sulfate on
2881 Syndecan-1. *J Biol Chem* **2004**, 279,
2882 10042–10051,
2883 doi:10.1074/jbc.M312100200.
- 2884 164. Clements, K.M.; Flannelly, J.K.; Tart, J.;
2885 Brockbank, S.M.V.; Wardale, J.; Freeth,
2886 J.; Parker, A.E.; Newham, P. Matrix
2887 Metalloproteinase 17 Is Necessary for
2888 Cartilage Aggrecan Degradation in an
2889 Inflammatory Environment. *Annals of*
2890 *the Rheumatic Diseases* **2011**, 70, 683–
2891 689, doi:10.1136/ard.2010.130757.
- 2892 165. Kojima, S.; Itoh, Y.; Matsumoto, S.;
2893 Masuho, Y.; Seiki, M. Membrane-Type 6
2894 Matrix Metalloproteinase (MT6-MMP,
2895 MMP-25) Is the Second Glycosyl-
2896 Phosphatidyl Inositol (GPI)-Anchored
2897 MMP. *FEBS Lett* **2000**, 480, 142–146,
2898 doi:10.1016/S0014-5793(00)01919-0.
- 2899 166. Radichev, I.A.; Remacle, A.G.; Shiryayev,
2900 S.A.; Purves, A.N.; Johnson, S.L.;
2901 Pelliccia, M.; Strongin, A.Y.
2902 Biochemical Characterization of the
2903 Cellular Glycosylphosphatidylinositol-
2904 Linked Membrane Type-6 Matrix
2905 Metalloproteinase. *J Biol Chem* **2010**,
2906 285, 16076–16086,
2907 doi:10.1074/jbc.M110.107094.
- 2908 167. Fortin, C.F.; Sohail, A.; Sun, Q.;
2909 McDonald, P.P.; Fridman, R.; Fülöp, T.
2910 MT6-MMP Is Present in Lipid Rafts and
2911 Faces Inward in Living Human PMNs but
2912 Translocates to the Cell Surface during
2913 Neutrophil Apoptosis. *Int Immunol*
2914 **2010**, 22, 637–649,
2915 doi:10.1093/intimm/dxq048.
- 2916 168. Soria-Valles, C.; Gutiérrez-Fernández, A.;
2917 Osorio, F.G.; Carrero, D.; Ferrando, A.A.;
2918 Colado, E.; Fernández-García, M.S.;
2919 Bonzon-Kulichenko, E.; Vázquez, J.;
2920 Fueyo, A.; et al. MMP-25
2921 Metalloprotease Regulates Innate
2922 Immune Response through NF-KB
2923 Signaling. *J Immunol* **2016**, 197, 296–
2924 302, doi:10.4049/jimmunol.1600094.
- 2925 169. Kresovich, J.K.; Zheng, Y.; Cardenas, A.;
2926 Joyce, B.T.; Rifas-Shiman, S.L.; Oken, E.;
2927 Gillman, M.W.; Hivert, M.-F.; Baccarelli,
2928 A.A.; Hou, L. Cord Blood DNA
2929 Methylation and Adiposity Measures in

- 2930 Early and Mid-Childhood. *Clin*
2931 *Epigenetics* **2017**, *9*, 86,
2932 doi:10.1186/s13148-017-0384-9.
- 2933 170. Yilmaz, Y.; Eren, F. Serum Biomarkers of
2934 Fibrosis and Extracellular Matrix
2935 Remodeling in Patients with
2936 Nonalcoholic Fatty Liver Disease:
2937 Association with Liver Histology. *Eur J*
2938 *Gastroenterol Hepatol* **2019**, *31*, 43–46,
2939 doi:10.1097/MEG.0000000000001240.
- 2940 171. Munsterman, I.D.; Kendall, T.J.; Khelil,
2941 N.; Popa, M.; Lomme, R.; Drenth, J.P.H.;
2942 Tjwa, E.T.T.L. Extracellular Matrix
2943 Components Indicate Remodelling
2944 Activity in Different Fibrosis Stages of
2945 Human Non-Alcoholic Fatty Liver
2946 Disease. *Histopathology* **2018**, *73*, 612–
2947 621, doi:10.1111/his.13665.
- 2948 172. Thiele, N.D.; Wirth, J.W.; Steins, D.;
2949 Koop, A.C.; Ittrich, H.; Lohse, A.W.;
2950 Kluwe, J. TIMP-1 Is Upregulated, but Not
2951 Essential in Hepatic Fibrogenesis and
2952 Carcinogenesis in Mice. *Sci Rep* **2017**, *7*,
2953 714, doi:10.1038/s41598-017-00671-1.
- 2954 173. Wang, H.; Lafdil, F.; Wang, L.; Yin, S.;
2955 Feng, D.; Gao, B. Tissue Inhibitor of
2956 Metalloproteinase 1 (TIMP-1) Deficiency
2957 Exacerbates Carbon Tetrachloride-
2958 Induced Liver Injury and Fibrosis in
2959 Mice: Involvement of Hepatocyte STAT3
2960 in TIMP-1 Production. *Cell Biosci* **2011**,
2961 *1*, 14, doi:10.1186/2045-3701-1-14.
- 2962 174. Meissburger, B.; Stachorski, L.; Roder,
2963 E.; Rudofsky, G.; Wolfrum, C. Tissue
2964 Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1
2965 (TIMP1) Controls Adipogenesis in
2966 Obesity in Mice and in Humans.
2967 *Diabetologia* **2011**, *54*, 1468–1479,
2968 doi:10.1007/s00125-011-2093-9.
- 2969 175. Lijnen, H.R.; Demeulemeester, D.; Van
2970 Hoef, B.; Collen, D.; Maquoi, E.
2971 Deficiency of Tissue Inhibitor of Matrix
2972 Metalloproteinase-1 (TIMP-1) Impairs
2973 Nutritionally Induced Obesity in Mice.
2974 *Thromb Haemost* **2003**, *89*, 249–255.
- 2975 176. Fjære, E.; Andersen, C.; Myrmet, L.S.;
2976 Petersen, R.K.; Hansen, J.B.; Tastesen,
2977 H.S.; Mandrup-Poulsen, T.; Brünner, N.;
2978 Kristiansen, K.; Madsen, L.; et al. Tissue
2979 Inhibitor Of Matrix Metalloproteinase-1
2980 Is Required for High-Fat Diet-Induced
2981 Glucose Intolerance and Hepatic
2982 Steatosis in Mice. *PLoS One* **2015**, *10*,
2983 e0132910,
2984 doi:10.1371/journal.pone.0132910.
- 2985 177. Gerin, I.; Louis, G.W.; Zhang, X.;
2986 Prestwich, T.C.; Kumar, T.R.; Myers,
2987 M.G.; Macdougald, O.A.; Nothnick, W.B.
2988 Hyperphagia and Obesity in Female
2989 Mice Lacking Tissue Inhibitor of
2990 Metalloproteinase-1. *Endocrinology*
2991 **2009**, *150*, 1697–1704,
2992 doi:10.1210/en.2008-1409.
- 2993 178. Bjørnholm, M.; Münzberg, H.; Leshan,
2994 R.L.; Villanueva, E.C.; Bates, S.H.; Louis,
2995 G.W.; Jones, J.C.; Ishida-Takahashi, R.;
2996 Bjørbaek, C.; Myers, M.G. Mice Lacking
2997 Inhibitory Leptin Receptor Signals Are
2998 Lean with Normal Endocrine Function. *J*
2999 *Clin Invest* **2007**, *117*, 1354–1360,
3000 doi:10.1172/JCI30688.
- 3001 179. Stricker-Krongrad, A.; Richy, S.; Beck, B.
3002 Orexins/Hypocretins in the Ob/Ob
3003 Mouse: Hypothalamic Gene Expression,
3004 Peptide Content and Metabolic Effects.
3005 *Regulatory Peptides* **2002**, *104*, 11–20,
3006 doi:10.1016/S0167-0115(01)00344-5.
- 3007 180. Cai, X.J.; Lister, C.A.; Buckingham, R.E.;
3008 Pickavance, L.; Wilding, J.; Arch, J.R.;
3009 Wilson, S.; Williams, G. Down-
3010 Regulation of Orexin Gene Expression
3011 by Severe Obesity in the Rats: Studies in
3012 Zucker Fatty and Zucker Diabetic Fatty
3013 Rats and Effects of Rosiglitazone. *Brain*
3014 *Res Mol Brain Res* **2000**, *77*, 131–137,
3015 doi:10.1016/S0169-328X(00)00041-3.
- 3016 181. Beck, B.; Richy, S.; Dimitrov, T.; Stricker-
3017 Krongrad, A. Opposite Regulation of
3018 Hypothalamic Orexin and Neuropeptide
3019 Y Receptors and Peptide Expressions in
3020 Obese Zucker Rats. *Biochem Biophys Res*
3021 *Commun* **2001**, *286*, 518–523,
3022 doi:10.1006/bbrc.2001.5420.
- 3023 182. Pinto, S.; Roseberry, A.G.; Liu, H.; Diano,
3024 S.; Shanabrough, M.; Cai, X.; Friedman,
3025 J.M.; Horvath, T.L. Rapid Rewiring of
3026 Arcuate Nucleus Feeding Circuits by
3027 Leptin. *Science* **2004**, *304*, 110–115,
3028 doi:10.1126/science.1089459.
- 3029 183. Chaillan, F.A.; Rivera, S.; Marchetti, E.;
3030 Jourquin, J.; Werb, Z.; Soloway, P.D.;
3031 Khrestchatsky, M.; Roman, F.S.
3032 Involvement of Tissue Inhibition of
3033 Metalloproteinases-1 in Learning and
3034 Memory in Mice. *Behav Brain Res* **2006**,
3035 *173*, 191–198,
3036 doi:10.1016/j.bbr.2006.06.020.
- 3037 184. Jourquin, J.; Tremblay, E.; Bernard, A.;
3038 Charton, G.; Chaillan, F.A.; Marchetti, E.;
3039 Roman, F.S.; Soloway, P.D.; Dive, V.;
3040 Yiotakis, A.; et al. Tissue Inhibitor of
3041 Metalloproteinases-1 (TIMP-1)
3042 Modulates Neuronal Death, Axonal
3043 Plasticity, and Learning and Memory.
3044 *Eur J Neurosci* **2005**, *22*, 2569–2578,
3045 doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04426.x.
- 3046 185. Brew, K.; Nagase, H. The Tissue
3047 Inhibitors of Metalloproteinases
3048 (TIMPs): An Ancient Family with
3049 Structural and Functional Diversity.
3050 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*
3051 *Molecular Cell Research* **2010**, *1803*, 55–
3052 71, doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
- 3053 186. Jaworski, D.M.; Soloway, P.; Caterina, J.;
3054 Falls, W.A. Tissue Inhibitor of
3055 Metalloproteinase-2 (TIMP-2)-Deficient
3056 Mice Display Motor Deficits. *J Neurobiol*
3057 **2006**, *66*, 82–94,
3058 doi:10.1002/neu.20205.
- 3059 187. Lluri, G.; Langlois, G.D.; McClellan, B.;
3060 Soloway, P.D.; Jaworski, D.M. Tissue
3061 Inhibitor of Metalloproteinase-2 (TIMP-
3062 2) Regulates Neuromuscular Junction
3063 Development via a Beta1 Integrin-
3064 Mediated Mechanism. *J Neurobiol* **2006**,
3065 *66*, 1365–1377, doi:10.1002/neu.20315.
- 3066 188. Lluri, G.; Langlois, G.D.; Soloway, P.D.;
3067 Jaworski, D.M. Tissue Inhibitor of

- 3068 Metalloproteinase-2 (TIMP-2) Regulates
3069 Myogenesis and Beta1 Integrin
3070 Expression in Vitro. *Exp Cell Res* **2008**,
3071 314, 11–24,
3072 doi:10.1016/j.yexcr.2007.06.007.
- 3073 189. Jaworski, D.M.; Sideleva, O.; Stradecki,
3074 H.M.; Langlois, G.D.; Habibovic, A.;
3075 Satish, B.; Tharp, W.G.; Lausier, J.;
3076 LaRock, K.; Jetton, T.L.; et al. Sexually
3077 Dimorphic Diet-Induced Insulin
3078 Resistance in Obese Tissue Inhibitor of
3079 Metalloproteinase-2 (TIMP-2)-Deficient
3080 Mice. *Endocrinology* **2011**, 152, 1300–
3081 1313, doi:10.1210/en.2010-1029.
- 3082 190. Stradecki, H.M.; Jaworski, D.M.
3083 Hyperphagia and Leptin Resistance in
3084 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2
3085 Deficient Mice. *J Neuroendocrinol* **2011**,
3086 23, 269–281, doi:10.1111/j.1365-
3087 2826.2010.02105.x.
- 3088 191. Murphy, G.; Murthy, A.; Khokha, R.
3089 Clipping, Shedding and RIPping Keep
3090 Immunity on Cue. *Trends Immunol*
3091 **2008**, 29, 75–82,
3092 doi:10.1016/j.it.2007.10.009.
- 3093 192. Federici, M.; Hribal, M.L.; Menghini, R.;
3094 Kanno, H.; Marchetti, V.; Porzio, O.;
3095 Sunnarborg, S.W.; Rizza, S.; Serino, M.;
3096 Cunsolo, V.; et al. Timp3 Deficiency in
3097 Insulin Receptor-Haploinsufficient Mice
3098 Promotes Diabetes and Vascular
3099 Inflammation via Increased TNF-Alpha. *J*
3100 *Clin Invest* **2005**, 115, 3494–3505,
3101 doi:10.1172/JCI26052.
- 3102 193. Menghini, R.; Menini, S.; Amoruso, R.;
3103 Fiorentino, L.; Casagrande, V.; Marzano,
3104 V.; Tornei, F.; Bertucci, P.; Iacobini, C.;
3105 Serino, M.; et al. Tissue Inhibitor of
3106 Metalloproteinase 3 Deficiency Causes
3107 Hepatic Steatosis and Adipose Tissue
3108 Inflammation in Mice. *Gastroenterology*
3109 **2009**, 136, 663–672.e4,
3110 doi:10.1053/j.gastro.2008.10.079.
- 3111 194. Menghini, R.; Casagrande, V.; Menini, S.;
3112 Marino, A.; Marzano, V.; Hribal, M.L.;
3113 Gentileschi, P.; Lauro, D.; Schillaci, O.;
3114 Pugliese, G.; et al. TIMP3
3115 Overexpression in Macrophages
3116 Protects from Insulin Resistance,
3117 Adipose Inflammation, and
3118 Nonalcoholic Fatty Liver Disease in
3119 Mice. *Diabetes* **2012**, 61, 454–462,
3120 doi:10.2337/db11-0613.
- 3121 195. Casagrande, V.; Menghini, R.; Menini, S.;
3122 Marino, A.; Marchetti, V.; Cavallera, M.;
3123 Fabrizi, M.; Hribal, M.L.; Pugliese, G.;
3124 Gentileschi, P.; et al. Overexpression of
3125 Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3
3126 in Macrophages Reduces
3127 Atherosclerosis in Low-Density
3128 Lipoprotein Receptor Knockout Mice.
3129 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**, 32,
3130 74–81,
3131 doi:10.1161/ATVBAHA.111.238402.
- 3132 196. Mejia-Cristobal, L.M.; Reus, E.; Lizarraga,
3133 F.; Espinosa, M.; Ceballos-Cancino, G.;
3134 López, T.V.; Garay, S.; Maldonado, V.;
3135 Melendez-Zajgla, J. Tissue Inhibitor of
3136 Metalloproteases-4 (TIMP-4) Modulates
3137 Adipocyte Differentiation in Vitro.
3138 *Experimental Cell Research* **2015**, 335,
3139 207–215,
3140 doi:10.1016/j.yexcr.2015.05.006.
- 3141 197. Chae, G.-N.; Kwak, S.-J. NF-KappaB Is
3142 Involved in the TNF-Alpha Induced
3143 Inhibition of the Differentiation of 3T3-
3144 L1 Cells by Reducing PPARgamma
3145 Expression. *Exp Mol Med* **2003**, 35, 431–
3146 437, doi:10.1038/emmm.2003.56.
- 3147 198. Strissel, K.J.; Stancheva, Z.; Miyoshi, H.;
3148 Perfield, J.W.; DeFuria, J.; Jick, Z.;
3149 Greenberg, A.S.; Obin, M.S. Adipocyte
3150 Death, Adipose Tissue Remodeling, and
3151 Obesity Complications. *Diabetes* **2007**,
3152 56, 2910–2918, doi:10.2337/db07-0767.
- 3153 199. Wang, Q.A.; Tao, C.; Gupta, R.K.;
3154 Scherer, P.E. Tracking Adipogenesis
3155 during White Adipose Tissue
3156 Development, Expansion and
3157 Regeneration. *Nat Med* **2013**, 19, 1338–
3158 1344, doi:10.1038/nm.3324.
- 3159 200. Lemonnier, D. Effect of Age, Sex, and
3160 Site on the Cellularity of the Adipose
3161 Tissue in Mice and Rats Rendered Obese
3162 by a High-Fat Diet. *J Clin Invest* **1972**, 51,
3163 2907–2915, doi:10.1172/JCI107115.
- 3164 201. Faust, I.M.; Johnson, P.R.; Stern, J.S.;
3165 Hirsch, J. Diet-Induced Adipocyte
3166 Number Increase in Adult Rats: A New
3167 Model of Obesity. *American Journal of*
3168 *Physiology-Endocrinology and*
3169 *Metabolism* **1978**, 235, E279,
3170 doi:10.1152/ajpendo.1978.235.3.E279.
- 3171 202. Sakamuri, S.S.V.P.; Watts, R.; Takawale,
3172 A.; Wang, X.; Hernandez-Anzaldo, S.;
3173 Bahitham, W.; Fernandez-Patron, C.;
3174 Lehner, R.; Kassiri, Z. Absence of Tissue
3175 Inhibitor of Metalloproteinase-4
3176 (TIMP4) Ameliorates High Fat Diet-
3177 Induced Obesity in Mice Due to
3178 Defective Lipid Absorption. *Sci Rep*
3179 **2017**, 7, 6210, doi:10.1038/s41598-017-
3180 05951-4.
- 3181 203. Pendergast, D.R.; Leddy, J.J.;
3182 Venkatraman, J.T. A Perspective on Fat
3183 Intake in Athletes. *Journal of the*
3184 *American College of Nutrition* **2000**, 19,
3185 345–350,
3186 doi:10.1080/07315724.2000.10718930.
- 3187 204. Rask-Madsen, C.; King, G.L. Vascular
3188 Complications of Diabetes: Mechanisms
3189 of Injury and Protective Factors. *Cell*
3190 *Metab* **2013**, 17, 20–33,
3191 doi:10.1016/j.cmet.2012.11.012.
- 3192 205. Stettler, C.; Allemann, S.; Jüni, P.; Cull,
3193 C.A.; Holman, R.R.; Egger, M.;
3194 Krähenbühl, S.; Diem, P. Glycemic
3195 Control and Macrovascular Disease in
3196 Types 1 and 2 Diabetes Mellitus: Meta-
3197 Analysis of Randomized Trials. *Am Heart*
3198 *J* **2006**, 152, 27–38,
3199 doi:10.1016/j.ahj.2005.09.015.
- 3200 206. Signorelli, S.S.; Malaponte, G.; Libra, M.;
3201 Di Pino, L.; Celotta, G.; Bevelacqua, V.;
3202 Petrino, M.; Nicotra, G.S.; Indelicato, M.;
3203 Navolanic, P.M.; et al. Plasma Levels and
3204 Zymographic Activities of Matrix
3205 Metalloproteinases 2 and 9 in Type II

- Diabetics with Peripheral Arterial Disease. *Vasc Med* **2005**, *10*, 1–6, doi:10.1191/1358863x05vm582oa.
207. Kadoglou, N.P.; Daskalopoulou, S.S.; Perrea, D.; Liapis, C.D. Matrix Metalloproteinases and Diabetic Vascular Complications. *Angiology* **2005**, *56*, 173–189, doi:10.1177/000331970505600208.
208. Giagtzidis, I.; Karkos, C.; Pitoulis, G.; Papazoglou, K. Matrix Metalloproteinases and Peripheral Arterial Disease. *Int Angiol* **2015**, *34*, 195–201.
209. Xu, X.; Xiao, L.; Xiao, P.; Yang, S.; Chen, G.; Liu, F.; Kanwar, Y.S.; Sun, L. A Glimpse of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Nephropathy. *Curr Med Chem* **2014**, *21*, 3244–3260, doi:10.2174/0929867321666140716092052.
210. Rysz, J.; Banach, M.; Stolarek, R.A.; Paszniak, J.; Cialkowska-Rysz, A.; Koktysz, R.; Piechota, M.; Baj, Z. Serum Matrix Metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and Metalloproteinase Tissue Inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in Diabetic Nephropathy. *J Nephrol* **2007**, *20*, 444–452.
211. Jeong, S.-R.; Park, H.-Y.; Kim, Y.; Lee, K.-W. Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products Induce Matrix Metalloproteinases through Activation of ERK/JNK/NF-KB Pathway in Kidney Proximal Epithelial Cells. *Food Sci Biotechnol* **2020**, *29*, 675–682, doi:10.1007/s10068-019-00704-7.
212. Singh, R.M.; Howarth, F.C.; Adeghate, E.; Bidasee, K.; Singh, J.; Waqar, T. Type 1 Diabetes Mellitus Induces Structural Changes and Molecular Remodelling in the Rat Kidney. *Mol Cell Biochem* **2018**, *449*, 9–25, doi:10.1007/s11010-018-3338-4.
213. Sapienza, C.; Lee, J.; Powell, J.; Erinle, O.; Yafai, F.; Reichert, J.; Siraj, E.S.; Madaio, M. DNA Methylation Profiling Identifies Epigenetic Differences between Diabetes Patients with ESRD and Diabetes Patients without Nephropathy. *Epigenetics* **2011**, *6*, 20–28, doi:10.4161/epi.6.1.13362.
214. Aldemir, O.; Turgut, F.; Gokce, C. The Association between Methylation Levels of Targeted Genes and Albuminuria in Patients with Early Diabetic Kidney Disease. *Ren Fail* **2017**, *39*, 597–601, doi:10.1080/0886022X.2017.1358180.
215. McKittrick, I.B.; Bogaert, Y.; Nadeau, K.; Snell-Bergeon, J.; Hull, A.; Jiang, T.; Wang, X.; Levi, M.; Moulton, K.S. Urinary Matrix Metalloproteinase Activities: Biomarkers for Plaque Angiogenesis and Nephropathy in Diabetes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2011**, *301*, F1326–F1333, doi:10.1152/ajprenal.00267.2011.
216. Albert, C.; Kube, J.; Albert, A.; Schanze, D.; Zenker, M.; Mertens, P.R. Cubilin Single Nucleotide Polymorphism Variants Are Associated with Macroangiopathy While a Matrix Metalloproteinase-9 Single Nucleotide Polymorphism Flip-Flop May Indicate Susceptibility of Diabetic Nephropathy in Type-2 Diabetic Patients. *NEF* **2019**, *141*, 156–165, doi:10.1159/000494391.
217. Gantala, S.R.; Kondapalli, M.S.; Kummari, R.; Padala, C.; Tupurani, M.A.; Kupsal, K.; Galimudi, R.K.; Gundapaneni, K.K.; Puranam, K.; Shyamala, N.; et al. Collagenase-1 (-1607 1G/2G), Gelatinase-A (-1306 C/T), Stromelysin-1 (-1171 5A/6A) Functional Promoter Polymorphisms in Risk Prediction of Type 2 Diabetic Nephropathy. *Gene* **2018**, *673*, 22–31, doi:10.1016/j.gene.2018.06.007.
218. Llano, E.; Pendás, A.M.; Freije, J.P.; Nakano, A.; Knäuper, V.; Murphy, G.; López-Otin, C. Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-Bound Activator of Progelatinase A Overexpressed in Brain Tumors. *Cancer Res* **1999**, *59*, 2570–2576.
219. Pei, D. Identification and Characterization of the Fifth Membrane-Type Matrix Metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 8925–8932, doi:10.1074/jbc.274.13.8925.
220. Omran, O.M. Effects of Thymoquinone on STZ-Induced Diabetic Nephropathy: An Immunohistochemical Study. *Ultrastruct Pathol* **2014**, *38*, 26–33, doi:10.3109/01913123.2013.830166.
221. Abu El-Asrar, A.M.; Alam, K.; Nawaz, M.I.; Mohammad, G.; Van den Eynde, K.; Siddiquei, M.M.; Mousa, A.; De Hertogh, G.; Opdenakker, G. Upregulation of Thrombin/Matrix Metalloproteinase-1/Protease-Activated Receptor-1 Chain in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Current Eye Research* **2016**, *41*, 1590–1600, doi:10.3109/02713683.2016.1141964.
222. Mohammad, G.; Kowluru, R.A. Novel Role of Mitochondrial Matrix Metalloproteinase-2 in the Development of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2011**, *52*, 3832–3841, doi:10.1167/iovs.10-6368.
223. Kowluru, R.A.; Mishra, M. Regulation of Matrix Metalloproteinase in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2017**, *148*, 67–85, doi:10.1016/bs.pmbts.2017.02.004.
224. Van Linthout, S.; Seeland, U.; Riad, A.; Eckhardt, O.; Hohl, M.; Dhayat, N.; Richter, U.; Fischer, J.W.; Böhm, M.; Pauschinger, M.; et al. Reduced MMP-2 Activity Contributes to Cardiac Fibrosis in Experimental Diabetic Cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* **2008**, *103*, 319–327, doi:10.1007/s00395-008-0715-2.

225. Illman, S.A.; Lohi, J.; Keski-Oja, J. Epilysin (MMP-28)--Structure, Expression and Potential Functions. *Exp Dermatol* **2008**, *17*, 897–907, doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00782.x.
226. Bořanská, B.; Barteková, M.; Ferenczyová, K.; Fogarassyová, M.; Kindernay, L.; Barančík, M. Matrix Metalloproteinases and Their Role in Mechanisms Underlying Effects of Quercetin on Heart Function in Aged Zucker Diabetic Fatty Rats. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 4457, doi:10.3390/ijms22094457.
227. Cohen, J.C.; Horton, J.D.; Hobbs, H.H. Human Fatty Liver Disease: Old Questions and New Insights. *Science* **2011**, *332*, 1519–1523, doi:10.1126/science.1204265.
228. Parlati, L.; Régnier, M.; Guillou, H.; Postic, C. New Targets for NAFLD. *JHEP Rep* **2021**, *3*, 100346, doi:10.1016/j.jhepr.2021.100346.
229. Dali-Youcef, N.; Vix, M.; Costantino, F.; El-Saghire, H.; Lhermitte, B.; Callari, C.; D'Agostino, J.; Perretta, S.; Paveliu, S.; Gualtierotti, M.; et al. Interleukin-32 Contributes to Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Hepatology Communications* **2019**, *3*, 1205–1220, doi:10.1002/hep4.1396.
230. Bianco, C.; Casirati, E.; Malvestiti, F.; Valenti, L. Genetic Predisposition Similarities between NASH and ASH: Identification of New Therapeutic Targets. *JHEPReport* **2021**, *3*, doi:10.1016/j.jhepr.2021.100284.
231. Munsterman, I.D.; Kendall, T.J.; Khelil, N.; Popa, M.; Lomme, R.; Drenth, J.P.H.; Tjwa, E.T.T.L. Extracellular Matrix Components Indicate Remodelling Activity in Different Fibrosis Stages of Human Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Histopathology* **2018**, *73*, 612–621, doi:10.1111/his.13665.
232. Ljumovic, D.; Diamantis, I.; Alegakis, A.K.; Kouroumalis, E.A. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases in Viral and Non-Viral Chronic Liver Diseases. *Clin Chim Acta* **2004**, *349*, 203–211, doi:10.1016/j.cccn.2004.06.028.
233. Toyoda, H.; Kumada, T.; Kiriya, S.; Tanikawa, M.; Hisanaga, Y.; Kanamori, A.; Tada, T.; Murakami, Y. Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 Are Associated with Steatohepatitis in Non-Alcoholic Fatty Liver Diseases. *Biomarkers* **2013**, *18*, 82–87, doi:10.3109/1354750X.2012.738249.
234. Ren, J.-J.; Huang, T.-J.; Zhang, Q.-Q.; Zhang, H.-Y.; Guo, X.-H.; Fan, H.-Q.; Li, R.-K.; Liu, L.-X. Insulin-like Growth Factor Binding Protein Related Protein 1 Knockdown Attenuates Hepatic Fibrosis via the Regulation of MMPs/TIMPs in Mice. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **2019**, *18*, 38–47, doi:10.1016/j.hbpd.2018.08.008.
235. Jiang, J.X.; Chen, X.; Fukada, H.; Serizawa, N.; Devaraj, S.; Török, N.J. Advanced Glycation Endproducts Induce Fibrogenic Activity in Nonalcoholic Steatohepatitis by Modulating TNF- α -Converting Enzyme Activity in Mice. *Hepatology* **2013**, *58*, 1339–1348, doi:10.1002/hep.26491.
236. Sampath, H.; Ntambi, J.M. The Role of Stearoyl-CoA Desaturase in Obesity, Insulin Resistance, and Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2011**, *1243*, 47–53, doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06303.x.
237. Gutiérrez-Juárez, R.; Poci, A.; Mulas, C.; Ono, H.; Bhanot, S.; Monia, B.P.; Rossetti, L. Critical Role of Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) in the Onset of Diet-Induced Hepatic Insulin Resistance. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 1686–1695, doi:10.1172/JCI26991.

RESULTATS

Etude du mécanisme d'action de la MMP11 dans le cancer du sein

I. Objectifs de la thèse

La MMP11 est surexprimée dans les cancers invasifs et cette surexpression est associée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein. En effet, la survie sans récurrence des patientes est réduite lorsque la MMP11 est surexprimée dans les tumeurs primaires (Chenard et al., 1996; Motrescu and Rio, 2008b). L'expression de la MMP11 est d'ailleurs exploitée au travers de deux tests qui permettent de prédire la probabilité de récurrence : Oncotype Dx® et PAM50-Prosigna®. Une des spécificités de la MMP11 est qu'elle n'est pas exprimée par les cellules cancéreuses mais par les cellules mésenchymateuses (CAA et CAF). Pourtant, de nombreux modèles précliniques établis et exploités au laboratoire montre qu'elle contribue bel et bien à la progression tumorale. En effet, les tumeurs ont une taille plus importante en présence de MMP11 qu'en son absence (Andarawewa et al., 2003; Boulay et al., 2001; Rio et al., 1996). L'ensemble de ces éléments justifie mon projet de thèse portant sur l'étude du mécanisme d'action de la MMP11 dans la progression tumorale du cancer du sein par 2 approches : *in vitro* et *in vivo*.

II. Etude *in vitro* du mécanisme moléculaire d'action de la MMP11

A. Interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP2

1. Contexte

Lors de l'invasion tumorale, la MMP11 ne dégrade aucun composant de la membrane basale sous-épithéliale, bien qu'elle influe sur la progression tumorale par son activité protéolytique (Noël et al., 2000). Ceci suggère que la MMP11 agit indirectement sur la dégradation de la matrice extracellulaire potentiellement en activant une autre MMP du microenvironnement tumoral. Les MMP font partie d'un réseau d'interactions entre protéases qui a donné naissance au concept de « protease web » (Fortelny et al., 2014; Overall and Dean, 2006). Les interconnexions précises entre les acteurs de ce réseau sont peu connues mais une interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP14 a été découverte au laboratoire (Buache et al., 2014) : la MMP14 clive la MMP11, la rendant inactive (Figure R1). La MMP11 pourrait être impliquée dans une interaction avec une ou plusieurs autre(s) protéase(s). Les recherches

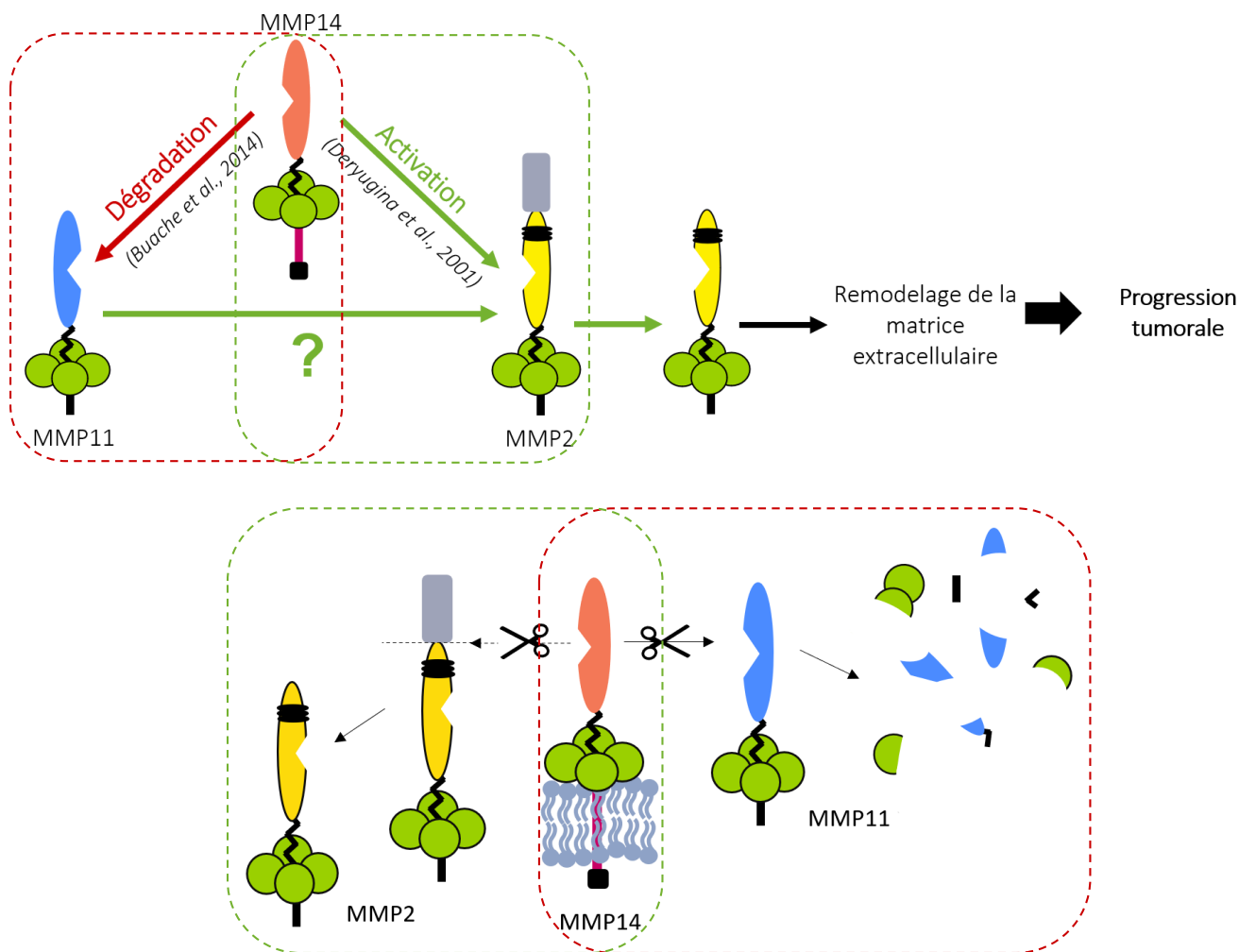


Figure R1 : Interaction fonctionnelle entre MMP11-MMP14 et MMP14-MMP2

Les MMP sont impliquées dans un réseau d'interactions entre protéases (le « protease web »). Au sein de ce réseau, une interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP14 a été découverte au laboratoire (encadrés rouges en pointillés) : la MMP14 clive la MMP11, la rendant inactive (Buache et al., 2014). La MMP14 participe aussi à l'activation de la pro-MMP2 (encadrés verts en pointillés) (Deryugina et al., 2001). De manière intéressante, la MMP2 joue un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire qui est essentielle à la progression tumorale. La MMP11 n'étant pas capable de dégrader elle-même les éléments de la matrice extracellulaire, l'ensemble de ces éléments suggèrent que la MMP11 participe à la progression tumorale en agissant indirectement sur le remodelage de la matrice extracellulaire via l'activation de la MMP2.

dans la littérature ont montré que la MMP14 participe aussi à l'activation de la pro-MMP2 (Deryugina et al., 2001). La MMP2 est connue pour jouer un rôle majeur lors de la dégradation des composants principaux de la matrice extracellulaire tels que le collagène IV et les collagènes dénaturés (gélatine). La MMP2 joue donc un rôle dans le remodelage de la matrice extracellulaire qui est essentielle pour la migration cellulaire lors de la progression tumorale (Figure R1) (Jezierska and Motyl, 2009). De plus, le profil d'expression physiologique de la MMP2 se superpose en partie à celui de la MMP11 et de la MMP14 (Chenard et al., 1999; Kessenbrock et al., 2010; Löffek et al., 2011). Tous ces éléments font de la MMP2 un candidat très intéressant.

Mon projet de recherche a consisté à étudier l'interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP2 dans un modèle de surexpression de la MMP2 et/ou de la MMP11. L'objectif était de déterminer si la MMP11 participe étroitement aux phénomènes invasifs rencontrés lors de la progression tumorale en agissant indirectement sur la dégradation matricielle via l'activation de la MMP2 (Figure R1). La MMP2 ne possédant pas de site de clivage par la furine, elle est forcément activée dans la matrice extracellulaire et non dans les cellules (Deryugina et al., 2001; Sternlicht and Werb, 2001).

2. Vérification des activités catalytiques des MMP11 recombinantes humaine et murine

Pour étudier l'interaction fonctionnelle entre la MMP2 et la MMP11, j'ai commencé par utiliser des protéines MMP11 recombinantes produites dans *E. Coli* disponibles au laboratoire (Figure R2A). L'activité catalytique des MMP11 recombinantes humaine et murine (hMMP11/FL et mMMP11/Cat) a été vérifiée en réalisant un test indirect de clivage de l' α 1-PI (alpha1-proteinase inhibitor) qui est un des rares substrats connus de la MMP11 (Pei et al., 1994). L' α 1-PI inhibe l'alpha-chymotrypsine (α CT). Ce test indirect d'activité de la MMP11 a été mis au point au laboratoire (Kannan et al., 1999).

Lors de ce test, en présence de MMP11 recombinante mature active (Figure R2B), l' α 1-PI est clivé et n'agira donc pas sur l'alpha-chymotrypsine qui pourra cliver son substrat de synthèse (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-panilide). Ce substrat de synthèse possède la propriété de donner une coloration jaune dosable à 405 nm. A l'inverse, en présence de MMP11 recombinante inactive, l' α 1-PI n'est pas clivé et inhibe l' α CT. Le substrat de l' α CT ne sera donc pas clivé, il n'y aura par conséquent pas de coloration jaune. Un contrôle positif et un contrôle négatif sont réalisés à chaque fois pour valider le bon fonctionnement du test (Figure R2C).

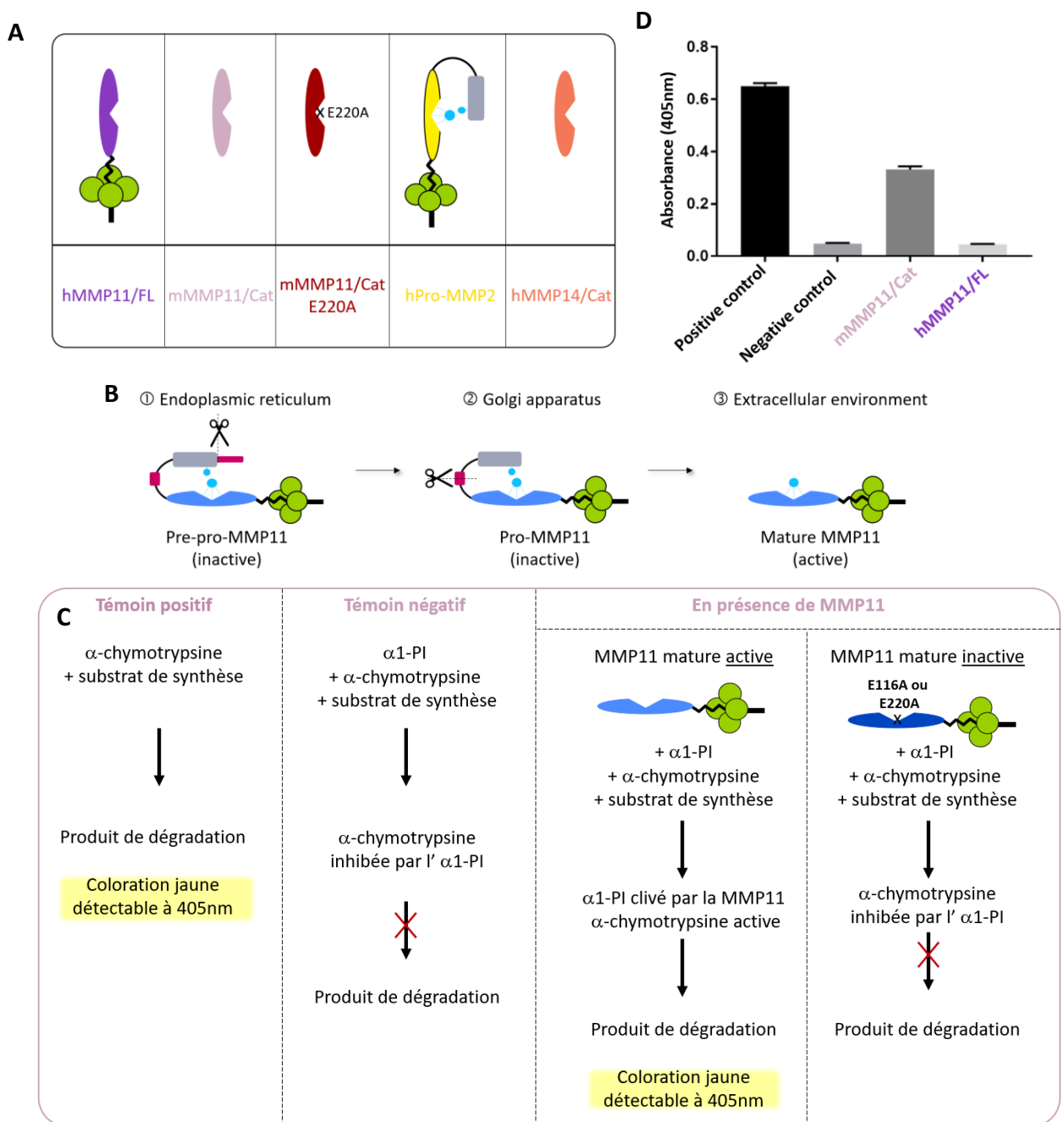


Figure R2 : Etablissement des protéines recombinantes utilisées pour l'étude *in vitro* de l'interaction fonctionnelle MMP11- MMP2

A. Représentation schématique des protéines recombinantes utilisées : la MMP11 recombinante humaine mature (hMMP11/FL: human MMP11/full-length), le domaine catalytique de la MMP11 recombinante murine (mMMP11/Cat = mouse MMP11/catalytic domain), le domaine catalytique de la MMP11 recombinante murine dont l'acide glutamique de la position 220 a été substitué par une alanine (mMMP11/Cat E220A = mouse MMP11/catalytic domain E220A), la pro-MMP2 recombinante humaine (hPro-MMP2= human Pro-MMP2) et le domaine catalytique de la MMP14 recombinante humaine (hMMP14/Cat=human MMP14/catalytic domain).

B. Illustration du processus de maturation de la MMP11.

C. Principe de fonctionnement du test indirect d'activité de la MMP11 (test indirect de clivage de l' α 1-PI) (Adapté de Kannan et al., 1999/Pei et al., 1994).

D. Résultats du test de l' α 1-PI permettant de vérifier l'activité catalytique des mMMP11/Cat et hMMP11/FL. Les barres d'erreur représentent un écart-type.

En présence du domaine catalytique de la MMP11 recombinante murine (mMMP11/Cat) produite au laboratoire, on remarque une absorbance nettement supérieure au contrôle négatif ce qui signifie que la MMP11 recombinante murine est catalytiquement active. En revanche, en présence de la MMP11 recombinante humaine mature (hMMP11/FL), on remarque une absorbance équivalente au contrôle négatif, la MMP11 recombinante humaine est donc catalytiquement inactive (**Figure R2D**). De ce fait, pour mesurer l'activité catalytique de la MMP11 recombinante sur la pro-MMP2 recombinante humaine, j'ai utilisé la MMP11 recombinante murine (mMMP11/Cat).

3. Mesure de l'activité catalytique de la MMP11 recombinante murine sur la pro-MMP2 recombinante humaine

a) Essai de clivage *in vitro* et analyse par zymographie

Des résultats non publiés du laboratoire ont montré que la MMP11 a une action protéolytique sur la MMP2. Afin de savoir si cette action est directe, la MMP11 recombinante murine active (mMMP11/Cat) ou inactive (mMMP11/Cat E220A), mutée dans le site catalytique en position 220, est mise en présence de la MMP2 recombinante humaine sous sa forme zymogène (hPro-MMP2). Ensuite, l'activité catalytique de la MMP2 active est analysée. La MMP2 étant une gélatinase (endopeptidase qui dégrade la gélatine), j'ai étudié l'activité catalytique de la MMP2 sur un gélatinographe (**Figure R3A**).

Un gélatinographe est une technique de zymographie utilisée pour observer l'activité enzymatique des MMP sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et en présence de gélatine. Le profil de migration et les empreintes de gélatine dégradée permettent de distinguer les différentes formes de la MMP2 : la MMP2 active a un poids moléculaire inférieur à celui de la forme zymogène (pro-MMP2).

Comme le montre la **Figure R3A**, J'ai d'abord vérifié que les différentes MMP recombinantes utilisées ne dégradent pas la gélatine de manière isolée et sont donc des contrôles négatifs (**colonnes 1 à 4**). Ainsi, en présence de la pro-MMP2 humaine seule (**colonne 1**), de la MMP11 recombinante murine active (mMMP11/Cat) (**colonne 2**) ou inactive seule (mMMP11/Cat E220A) (**colonne 3**), aucune bande de gélatine n'est dégradée. La MMP14 est le contrôle positif de l'expérience, elle active la pro-MMP2 (Deryugina et al., 2001). Ainsi en présence de la MMP14 recombinante humaine (hMMP14/Cat), la gélatine est dégradée par la MMP2 active (**colonne 7**).

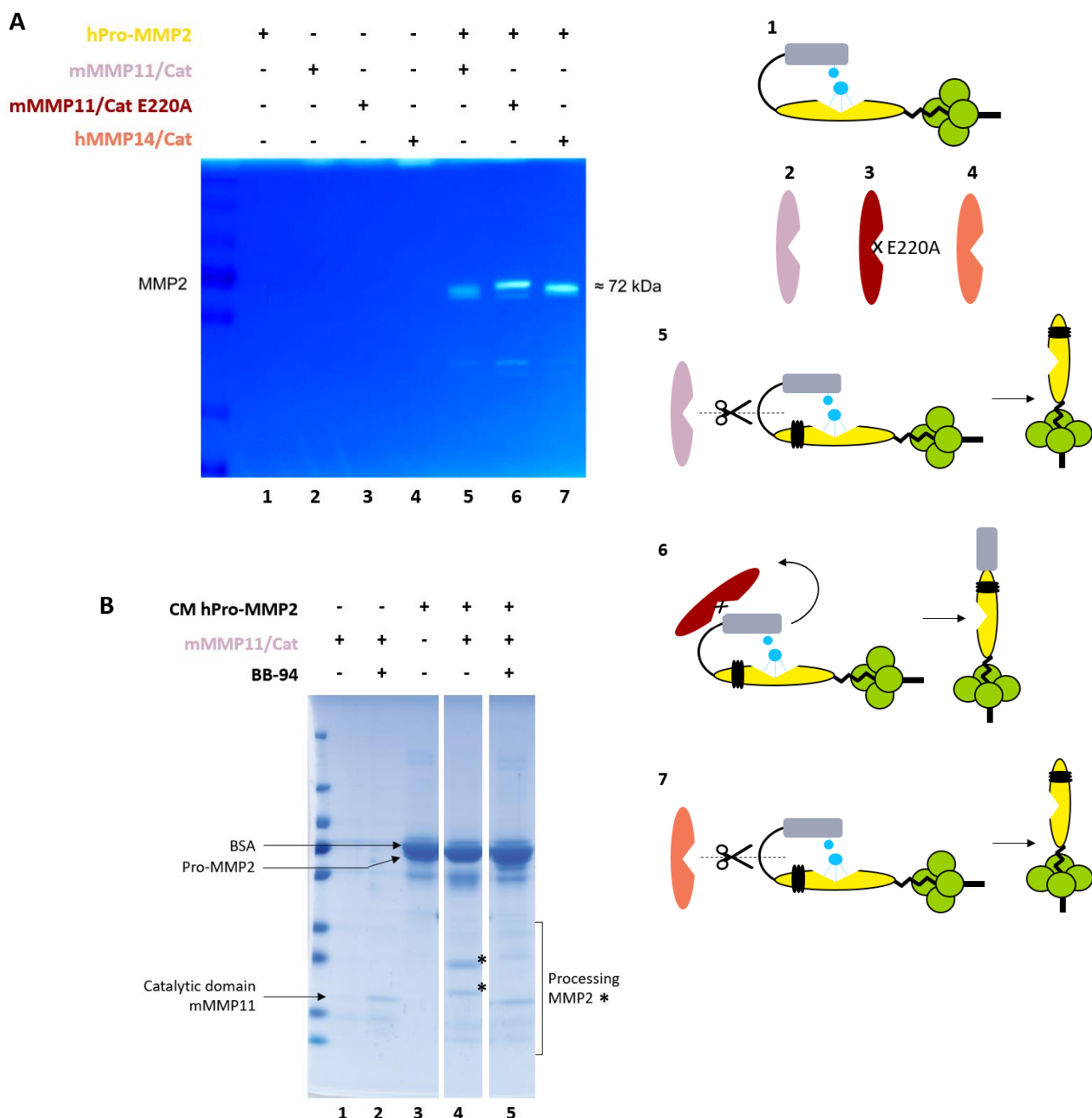


Figure R3 : Mesure de l'activité catalytique de la MMP11 recombinante murine sur la pro-MMP2 recombinante humaine

A. Analyse de l'activité gélatinolytique de la MMP2 seule (1) ou en présence de mMMP11/Cat (5), mMMP11/Cat E220A (6) ou hMMP14/Cat (7) par zymographie en présence de gélatine. Les zones où la gélatine a été dégradée par la MMP2 apparaissent comme des bandes claires sur le fond bleu foncé.

B. Analyse de l'activité protéolytique de mMMP11/Cat (1) sur la hpro-MMP2, produite dans le milieu conditionné (CM=conditioned medium) de cellules HEK293T transfectées avec le plasmide pCMV-MMP2, en absence (4) ou en présence (5) de BB-94, sur gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie.

Lorsque la pro-MMP2 est en présence de la mMMP11/Cat, on observe une bande ayant la même taille que celle obtenue en présence de MMP14 (colonne 5). Cette bande correspond à la MMP2 active dépourvue du pro-domaine. En revanche, avec la mMMP11/Cat E220A, on observe une bande de taille supérieure à celle du contrôle positif (colonne 6). Elle correspond à la présence de la pro-MMP2. La mMMP11/Cat E220A serait capable d'interagir avec la MMP2 et engendrerait un changement conformationnel de la pro-MMP2, libérant le site catalytique qui est fonctionnel.

b) Essai de clivage *in vitro* et analyse sur gel SDS-PAGE

La zymographie est très sensible mais elle ne permet pas de visualiser les produits de clivage secondaires. Afin de confirmer l'activité protéolytique sur la pro-MMP2, produite par des cellules, et d'identifier le profil de clivage, la MMP11 recombinante murine active (mMMP11/Cat ; 19,3kDa) a été mise en présence du milieu conditionné par les cellules HEK293T transfectées avec un plasmide d'expression de la pro-MMP2 (hPro-MMP2 ; 72kDa), en y ajoutant ou non le batimastat (BB-94), un inhibiteur synthétique puissant et spécifique des MMP (Wojtowicz-Praga et al., 1997). Ensuite, l'ensemble est déposé sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-Page) coloré au bleu de Coomassie (Figure R3B).

J'ai d'abord vérifié que le BB-94 inhibe l'activité catalytique de la MMP11 recombinante. Ainsi, comme le montre la Figure R3B, l'incubation de la mMMP11/Cat dans un milieu enzymatique de clivage entraîne la disparition de la MMP11 par autoclivage (colonne 1). La MMP11 a une forte activité autocatalytique et se dégrade rapidement (Noël et al., 1995). En revanche, lorsque la réaction est réalisée en présence de BB-94, la protéine reste intacte (colonne 2). Cette condition confirme que le BB-94 inhibe la MMP11, l'empêchant ainsi de s'autodégrader.

J'ai ensuite étudié le clivage de la pro-MMP2, produite par transfection dans le surnageant des cellules HEK293T, par la MMP11 recombinante. Comme le montre la Figure R3B, en présence du milieu conditionné par les cellules HEK293T transfectées avec un plasmide d'expression de la MMP2, on détecte la présence d'une bande en-dessous de la forte bande associée à la BSA (colonne 3). Lorsque la MMP2 est mise en présence de la mMMP11/Cat, on détecte deux fortes bandes à un poids moléculaire plus bas, à 25kDa et 20kDa environ (colonne 4), qui correspondent aux produits de dégradation de la MMP2. De plus, la bande à 25kDa semble plus intense, il pourrait donc s'agir d'un doublet. Ceci suggère que la MMP11 serait responsable de plusieurs clivages (25, 25 et 20kDa). Lorsque la MMP2 est mise en présence de la mMMP11/Cat et de BB-94, on ne détecte plus les deux bandes associées aux

produits de clivage (colonne 5). La mMMP11/Cat étant inhibée par BB-94, elle ne peut pas cliver la MMP2. La mMMP11/Cat active semble donc cliver la MMP2 sur au moins deux sites, cependant la MMP2 utilisée étant dans un milieu conditionné, il est également possible que la mMMP11/Cat clive indirectement la MMP2 en agissant sur une autre protéase du milieu conditionné.

En conclusion, dans ces deux tests *in vitro*, la MMP11 recombinante murine semble avoir une action protéolytique sur la pro-MMP2. L'expérience de zymographie indique que la MMP11 a une activité similaire à celle de la MMP14, elle permet l'activation de la MMP2 en éliminant le pro-domaine. La zymographie ne permet pas de détecter des formes plus dégradées. L'analyse en utilisant le milieu conditionné comme source de pro-MMP2 indique un processus de clivage plus complexe avec au moins deux sites de clivage, entraînant l'inactivation de la MMP2. Ces résultats présentent plusieurs limites. La première est que le système est hétérologue, nous utilisons le site catalytique isolé de la MMP11 de souris, on se demande donc si la protéine humaine possède la même activité. La deuxième est que le domaine catalytique seul n'est pas physiologique, la MMP11 mature est normalement constituée du domaine catalytique associé au domaine de l'hémopexine (Figure R2B). Or, le domaine de l'hémopexine possède un rôle de régulation et pourrait moduler l'action du domaine catalytique de la MMP11 en faveur de l'activation ou de l'inactivation de la MMP2. La troisième est que nous n'avons pas identifié les sites de clivage, un séquençage des peptides par spectrométrie de masse pourrait confirmer le profil de clivage. Pour mieux cerner le rôle de la MMP11 sur l'activité de la MMP2, dans des conditions physiologiques, nous avons tenté de produire la MMP11 humaine entière sous forme mature et catalytiquement active, et reproduire ces expériences *in vitro*.

4. Production de la MMP11 humaine dans un système de mammifère

L'action de la MMP11 recombinante humaine sur la MMP2 n'a pas pu être étudiée car la protéine recombinante produite au laboratoire dans *E. Coli*, ou isolée par d'autres protocoles, n'est pas active. J'ai donc essayé de produire la MMP11 humaine mature et active dans un système mammifère, en utilisant des cellules transfectées transitoirement dont le milieu conditionné a été récupéré et concentré au polyéthylène glycol (PEG) ou au sulfate d'ammonium et testé avec le test α 1-PI (Figure R4).

Les cellules mammifères fréquemment utilisées pour produire des protéines recombinantes sont les CHO et les COS (Wurm, 2004). Les cellules HeLa ont également été

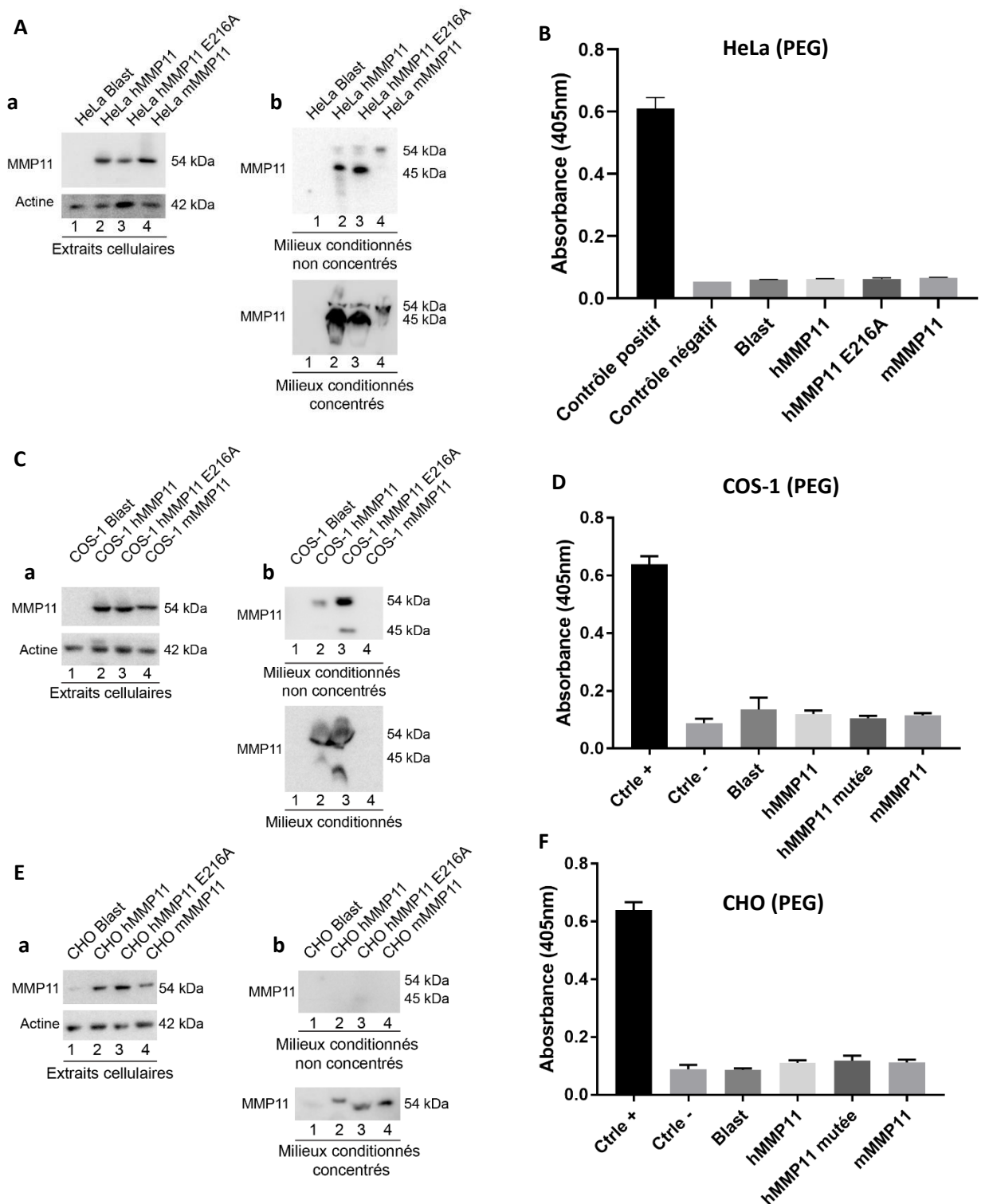


Figure R4 : Production de la MMP11 humaine mature et active dans un système de mammifère (concentration du milieu conditionné au PEG)

A, C, E. *A gauche (a)* : Analyse de l'expression de la MMP11 dans les cellules HeLa (A), COS-1 (C) et CHO (E) par immunoblot après transfection des cellules avec différents plasmides : pQCXIP (1), pQCXIP/hMMP11 (2), pQCXIP/hMMP11 E216A (3), pQCXIP/mMMP11 (4). L'actine est utilisée comme contrôle de charge. *A droite (b)* : Analyse de la MMP11 sécrétée dans les milieux non concentrés et concentrés au PEG.

B, D, F. Résultats du test de l' α 1-PI permettant de vérifier l'activité catalytique de la MMP11 sécrétée dans le milieu conditionné des cellules HeLa (B), COS-1 (D), et CHO (F) après concentration au PEG. Les barres d'erreur représentent un écart-type.

utilisées car, par expérience, il s'agit d'une des rares lignées qui permet aussi bien l'analyse de la MMP11 intracellulaire que de la MMP11 sécrétée dans le milieu de culture. De plus, l'ensemble de ces cellules n'expriment pas la MMP11 de façon endogène ce qui rend possible la réalisation d'études comparatives.

Dans un premier temps, les cellules HeLa, COS-1 et CHO ont été transfectées avec des plasmides permettant d'exprimer la MMP11 humaine sauvage (hMMP11), la MMP11 humaine inactive (hMMP11 E216A) et la MMP11 murine sauvage (mMMP11). En parallèle, des cellules ont été transfectées avec un plasmide contrôle dans lequel aucune séquence n'a été insérée (pQCXIP). La présence de la MMP11 dans les extraits protéiques et les milieux conditionnés non concentrés et concentrés au PEG a été analysée par immunoblot (Figure R4A, 4C, 4E).

Pour l'ensemble des types cellulaires utilisés, la MMP11 est synthétisée sous la forme d'une proenzyme (pro-MMP11 ; 54kDa) dans les cellules et elle est sécrétée sous forme mature (45kDa), dépourvue du pro-domaine, dans le milieu conditionné (Santavicca et al., 1996). La MMP11 est maturée intracellulairement par l'enzyme furine, une protéase à sérine du réseau trans-golgien. Ainsi, on constate que les 3 plasmides d'expression de la MMP11 humaine et murine permettent la synthèse de l'enzyme sous forme pro dans les extraits cellulaires de cellules HeLa, COS et CHO (Figure R4Aa, 4Ca, Ea). En revanche dans les milieux conditionnés, différents profils se présentent. Dans les cellules HeLa, seule la forme pro de la MMP11 murine est détectée (Figure R4Ab, colonne 4), et dans les COS, la MMP11 murine n'est pas détectée (Figure R4Cb, colonne 4), elle est probablement dégradée par autoclivage. Dans les cellules HeLa et COS, la forme pro de la MMP11 humaine active est détectée (Figure R4Ab, 4Cb, colonne 2). En revanche, la MMP11 humaine sous sa forme mature active est présente dans les cellules HeLa (Figure R4Ab, colonne 2) mais pas dans les COS (Figure R4Cb, colonne 2). Le mutant inactif de la MMP11 humaine est détecté sous forme pro et mature dans les cellules HeLa et COS (Figure R4Ab, 4Cb, colonne 3). Dans les cellules CHO, les milieux conditionnés sont dépourvus de protéine mature (Figure R4Eb, colonnes 2 à 4). J'ai vérifié l'activité catalytique de la MMP11 dans les milieux conditionnés des cellules par le test de l' α 1-PI (Figure R4B, 4D, 4F). Afin de valider le test, un contrôle négatif et un contrôle positif ont été réalisés. Aucune activité catalytique significative n'a été mesurée suggérant que la MMP11 produite dans les milieux cellulaires est inactive. La production de MMP11 humaine et murine dans les cellules en culture se heurte à des difficultés. La protéine de souris est très instable et semble dégradée avant sa sortie de la cellule. La protéine humaine est plus stable mais la forme mature sécrétée par les cellules HeLa est inactive.

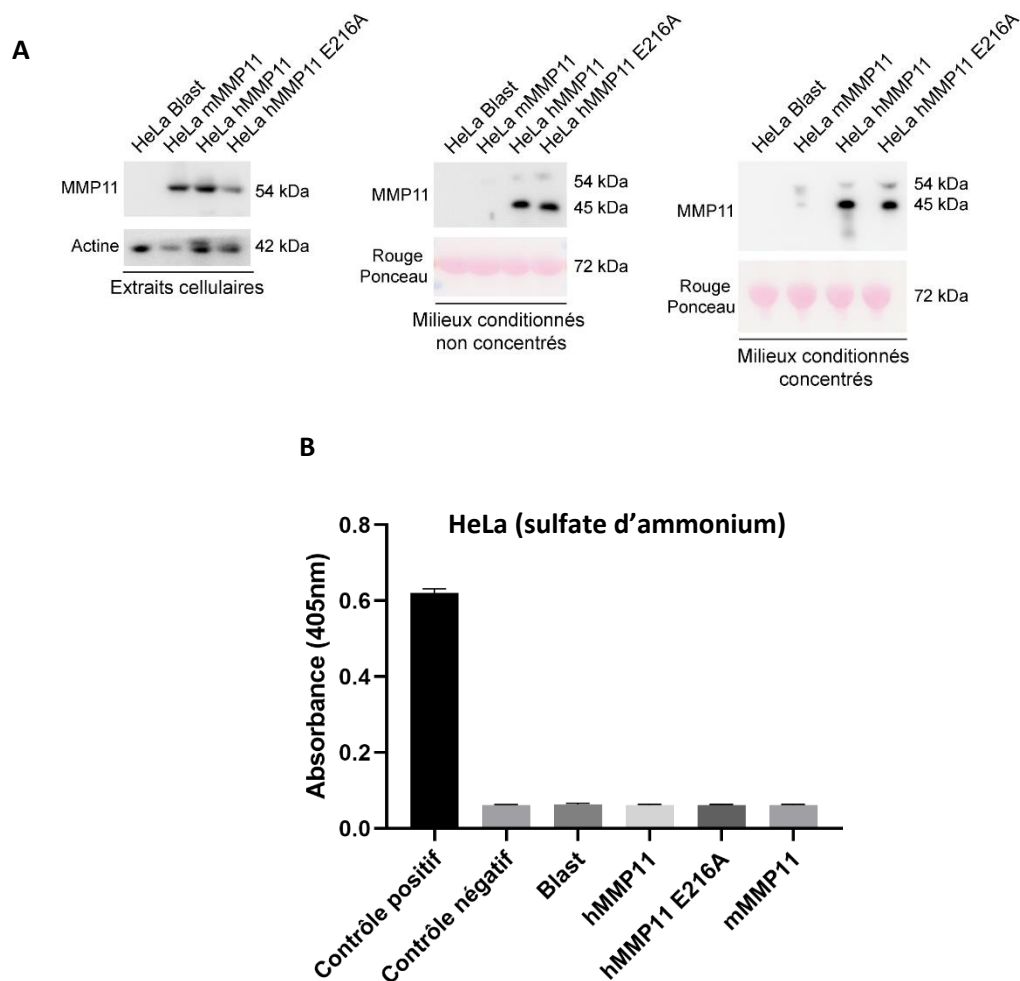


Figure R5 : Production de la MMP11 humaine mature et active dans les cellules HeLa (concentration du milieu conditionné au sulfate d'ammonium)

A. *A gauche*: Analyse de l'expression de la MMP11 dans les cellules HeLa par immunoblot après transfection des cellules par différents plasmides : pQCXIP, pQCXIP/hMMP11 pQCXIP/hMMP11 E216A, pQCXIP/mMMP11. L'actine est utilisée comme contrôle de charge. *Au milieu et à droite*: Analyse de la MMP11 sécrétée dans les milieux non concentrés et concentrés au sulfate d'ammonium, respectivement.

B. Résultats du test de l' α 1-PI permettant de vérifier l'activité catalytique de la MMP11 sécrétée dans le milieu conditionné des cellules HeLa après concentration au sulfate d'ammonium. Les barres d'erreur représentent un écart-type.

J'ai reproduit la tentative de production de MMP11 dans les cellules HeLa en utilisant la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium comme moyen de concentrer le milieu conditionné. Cette méthode de concentration a déjà fait ses preuves auparavant au laboratoire pour concentrer la MMP11 humaine (Buache et al., 2014). Elle repose sur la solubilité différentielle des protéines lors de la modification de la force ionique du milieu qui les contient. Ce sel présente l'avantage de ne pas dénaturer les protéines et de ne pas affecter la température du milieu, maximisant ainsi les chances d'obtenir des protéines actives. Malgré une optimisation du protocole, l'ensemble des résultats obtenus sont les mêmes que ceux obtenus dans l'expérience précédente pour les cellules HeLa (Figure R5).

Devant ses difficultés, j'ai tenté de modifier les vecteurs d'expression de la MMP11 en substituant le site de clivage par la furine par le site de clivage P3C. Nous disposons au laboratoire de la protéase HRV-3C recombinante dérivée du rhinovirus humain de type 14. La protéase HRV-3C clive une séquence d'acides aminés spécifique (LeuGluValLeuPheGln↓GlyPro). L'introduction du site P3C devait permettre d'assurer la maturation de la MMP11 extemporanément, nous affranchissant ainsi des difficultés liées à l'auto-dégradation. Cependant, nous avons observé que la protéine MMP11 P3C était sécrétée dans le milieu conditionné sous une forme de plus haut poids moléculaire correspondant sans doute à une forme glycosylée et que cette forme était résistante à la protéase P3C (non montré).

En conclusion, aucun des trois types cellulaires (COS-1, CHO, HeLa) et aucune des deux méthodes de concentration (PEG, sulfate d'ammonium) étudiés ne permettent de produire de la MMP11 murine ou de la MMP11 humaine active. Devant ce constat, nous avons décidé d'étudier l'impact de la MMP11 sur une fonction cellulaire de la MMP2.

B. Rôle pathologique de l'interaction fonctionnelle MMP11-MMP2

1. Contexte

La MMP2 joue un rôle dans l'invasion tumorale (Brinckerhoff and Matrisian, 2002; Ma et al., 2009), on suppose donc que la MMP11 module l'action de la MMP2 endogène et cette modulation est associée à une augmentation ou une diminution du caractère invasif des cellules. C'est pourquoi, j'ai étudié le rôle pathologique de l'interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP2.

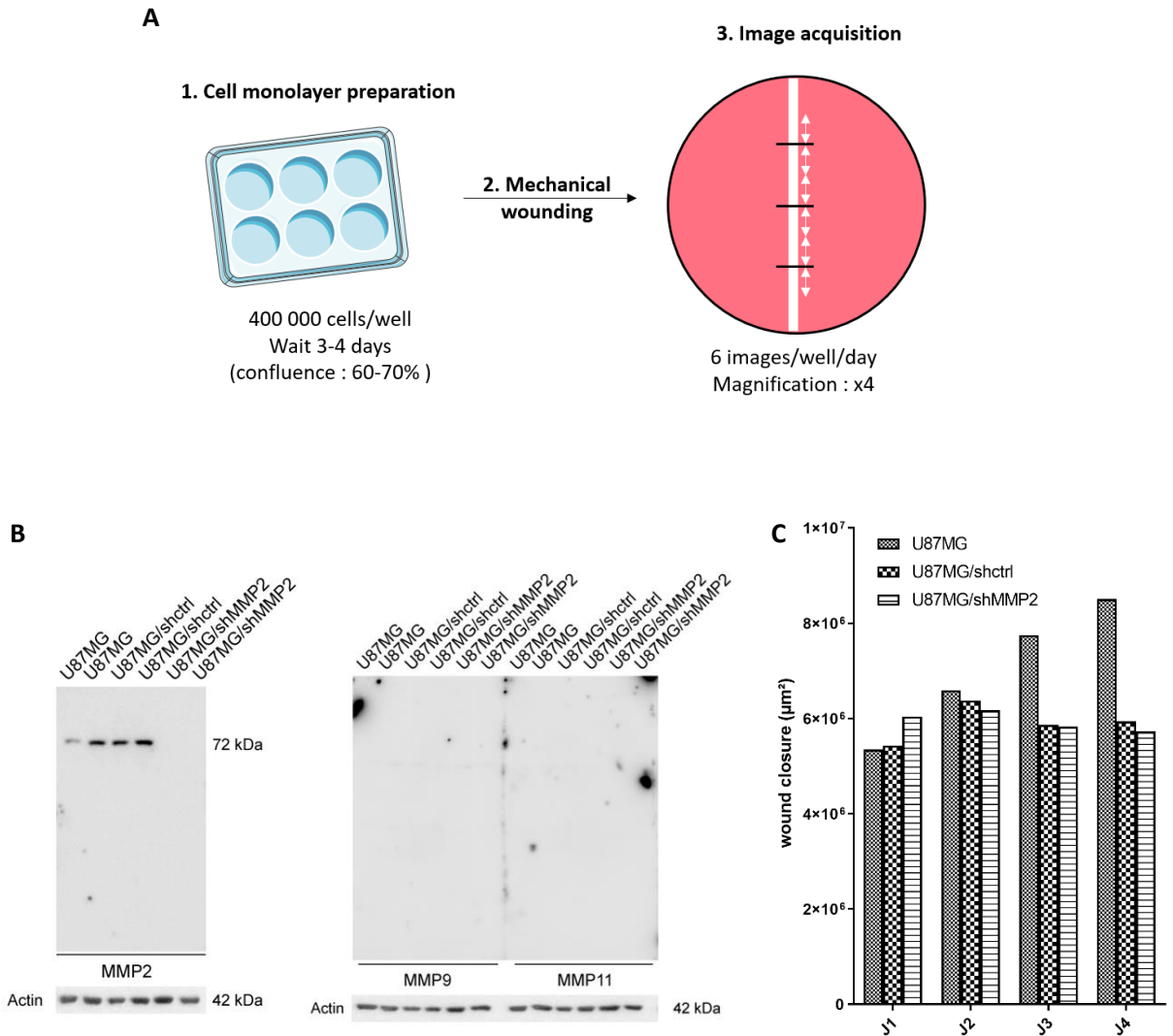


Figure R6 : Impact de la MMP2 sur la migration des cellules U87MG

A. Représentation schématique de la réalisation du test de migration par blessure (ou test de cicatrisation).

B. Analyse de l'expression de la MMP2, MMP9 et MMP11 dans les cellules U87MG contrôles et shMMP2 par immunoblot. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

C. Mesure de l'aire de la blessure (en μm^2) à J1, J2, J3 et J4 après avoir réalisé la blessure sur le tapis de cellules U87MG contrôles et shMMP2.

2. Impact de la MMP2 sur la migration/invasion des cellules cancéreuses

Dans un premier temps, l'objectif était de trouver un modèle cellulaire répondant aux critères suivants : les cellules ont des capacités de migration et d'invasion dépendantes de la MMP2 et elles n'expriment pas la MMP11. Suite à différentes recherches dans la littérature, j'ai donc étudié les U2OS (lignée cellulaire d'ostéosarcome), les HT-1080 (lignée cellulaire de fibrosarcome) (Maquoi et al., 1998; Panth et al., 2016; Poudel et al., 2014) et les U87MG (lignée cellulaire de glioblastome) (Jang et al., 2010; Panth et al., 2016; Yoshida et al., 1998). Dans un second temps, il était nécessaire de s'assurer de la dépendance en MMP2 des cellules modèles choisies en comparant la migration et l'invasion des cellules sauvages et contrôles à celles dont l'expression de la MMP2 aura été inhibée par ARN interférent (shRNA MMP2). Pour éviter toute interférence, j'ai également vérifié que la MMP9 n'était pas exprimée dans ces cellules car il s'agit d'une MMP de la même famille que la MMP2 qui intervient également dans la migration et l'invasion de nombreuses cellules. J'ai également vérifié que la MMP11 n'était pas détectée puisque le but était de faire des expériences de gain de fonction pour voir l'impact de la MMP11 sur la MMP2. Seules les U87MG validaient tous ces critères et sont donc un bon modèle d'étude de l'impact de la MMP2 sur la migration/invasion des cellules cancéreuses (Figure R6B).

La migration et l'invasion des cellules sont étudiées en réalisant des tests de migration et d'invasion (test de cicatrisation, test de chambre de Boyden). À la suite des tests de cicatrisation (Figure R6A), on voit que la blessure faite sur le tapis de cellules sauvages se referme plus vite que pour les deux lignées cellulaires shctrl et shMMP2. Il est donc possible que l'on ait un artefact avec les cellules contrôles (Figure R6C). Cependant, aucune différence de migration n'a été observée en l'absence de MMP2 par rapport au contrôle.

Cette expérience a été répétée et optimisée plusieurs fois, puis des tests de migration et d'invasion ont été réalisés en chambre de Boyden, et pour finir un test d'invasion a été réalisé par zymographie *in situ* en présence de gélatine fluorescente. Aucun de ces tests n'a montré que la MMP2 a un effet sur la migration ou l'invasion. Par conséquent, les U87MG ne semblent pas dépendantes en MMP2 pour leur migration et invasion. Etant confrontée à cette difficulté supplémentaire, cette partie de mon projet de thèse a donc été suspendue.

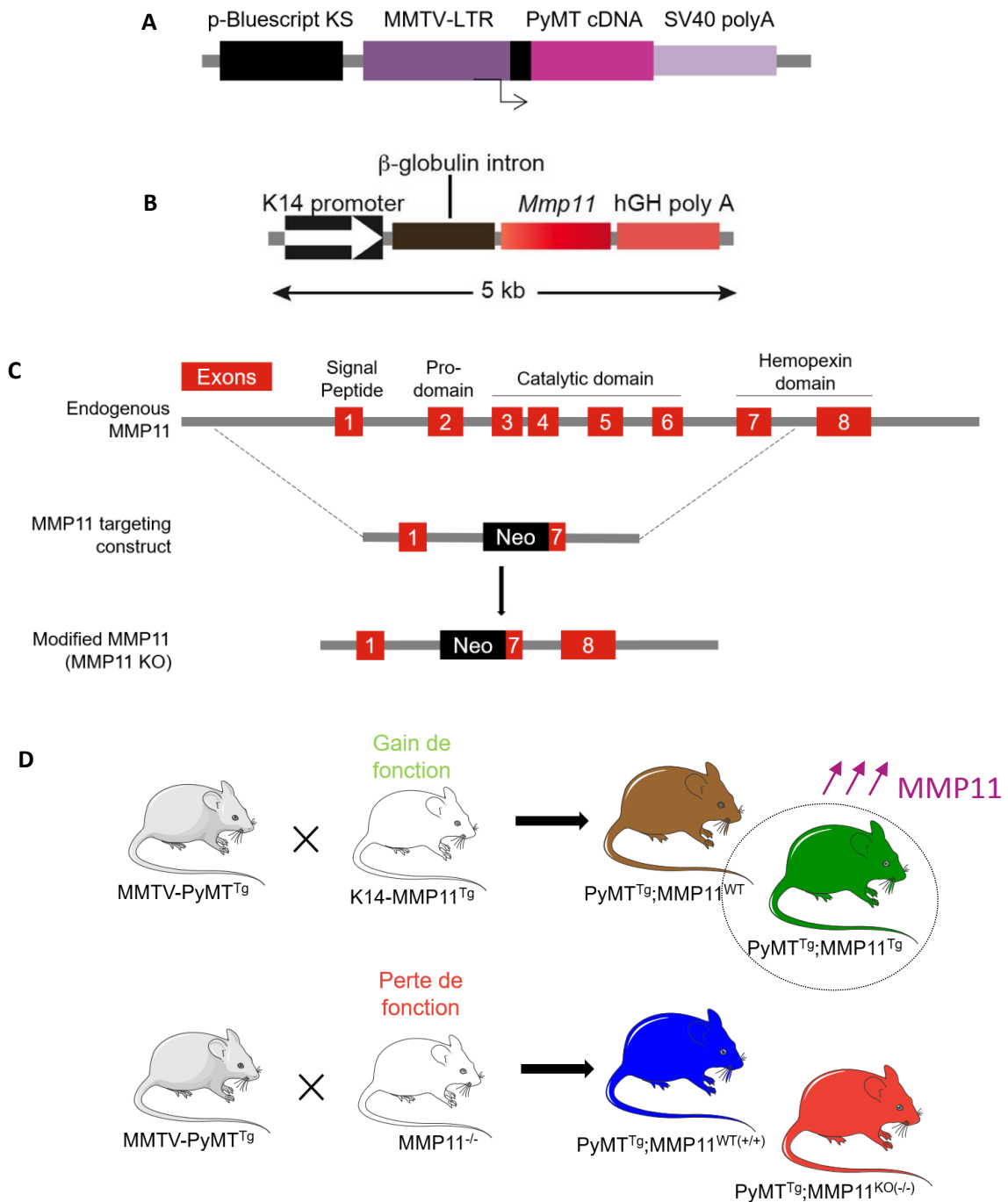


Figure R7 : Etablissement des modèles de souris constitutifs (GOF/LOF) pour la MMP11 croisés avec le modèle murin génétique de cancer du sein (MMTV-PyMT)

A. Représentation schématique de la construction transgénique MMTV-PyMT.

B. Représentation schématique de la construction transgénique K14-MMP11 (Adapté de Dali-Youcef et al., 2016).

C. Représentation schématique de l'inactivation du gène de la MMP11 endogène par recombinaison homologue (Adapté de Masson et al., 1998).

D. Illustration des croisements réalisés entre le modèle MMTV-PyMT et les modèles K14-MMP11-Tg (GOF) et MMP11^{-/-} (LOF). On obtient donc des souris MMTV-PyMTxMMP11-Tg et des souris MMTV-PyMTxKO-MMP11. Ces modèles sont des modèles constitutifs dans lesquels la MMP11 est surexprimée ou absente dans l'ensemble de l'organisme.

III. Etude *in vivo* de l'impact de la MMP11 sur le cancer du sein

A. Impact de la MMP11 sur le métabolisme tumoral - Publication Cancers

1. Contexte

Des résultats publiés du laboratoire ont montré que la MMP11 entraînait une diminution de la masse grasseuse, protégeait de l'obésité induite par un régime riche en lipides et protégeait du diabète de type II, et entraînait des changements métaboliques (Andarawewa et al., 2005; Dali-Youcef et al., 2016). Ces résultats démontrent un rôle de la MMP11 dans la régulation du métabolisme énergétique. Cette étude a été menée grâce à des modèles de souris, gain- et perte de fonction de la MMP11, constitutifs et impliquant l'organisme entier. Les souris gain de fonction ont une surexpression de la MMP11 dans la peau. L'hypothèse émise est que la MMP11 favoriserait le développement tumoral en agissant sur le métabolisme énergétique au sein des cancers. L'objectif consiste alors à caractériser l'impact métabolique de la MMP11 dans la formation tumorale *in vivo*.

2. Manuscrit

Des lignées surexprimant la MMP11 (K14-MMP11/MMP11-Tg) et des lignées de souris déficientes en MMP11 (MMP11-KO) ont été croisées avec des souris représentant un modèle murin génétique de cancer du sein (MMTV-PyMT) (Figure R7D) (Guy et al., 1992; Lin et al., 2003). Les souris MMTV-PyMT développent spontanément des tumeurs mammaires en raison de l'expression de l'oncoprotéine PyMT (Polyoma Virus middle T antigen) sous le contrôle du promoteur MMTV (mouse mammary tumor virus), spécifique de la glande mammaire (Figure R7A). Les souris K14-MMP11 et MMTV-PyMT sont sur le fond génétique FVB/N, et les souris MMP11-KO sont sur le fond génétique 129/SvJ. Les souris MMP11-KO ont été obtenues par inactivation du gène *MMP11* après recombinaison homologue avec une construction de transgène où les exons 2 à 7 du gène de la MMP11 ont été supprimés (Figure R7C) (Masson et al., 1998). Les souris K14-MMP11 ont été générées grâce à une construction de transgène dans laquelle a été insérée la séquence codante de la MMP11 de souris sous le contrôle du promoteur de la kératine K14 (K14), spécifique des cellules épithéliales (Figure R7B) (Dali-Youcef et al., 2016). On obtient donc des souris MMTV-PyMTxMMP11-Tg et des souris MMTV-PyMTxMMP11-KO qui ont été comparées avec leurs contrôles respectifs (Figure R7D). Les modèles obtenus sont des modèles constitutifs dans lesquels la MMP11 est surexprimée ou absente dans l'ensemble de l'organisme. Nous avons étudié le développement

tumoral en présence et en absence de la MMP11. Nous avons observé que l'incidence tumorale due à l'oncogène PyMT n'était pas significativement différente chez les souris Tg bien qu'augmentée alors qu'elle était retardée chez les souris KO. De plus, la surexpression de la MMP11 accélère la croissance tumorale à un stade précoce du développement tumoral. Cela va de pair avec l'augmentation de l'aire des lésions hyperplasiques quand la MMP11 est surexprimée et avec la diminution de l'aire des lésions mammaires hyperplasiques quand la MMP11 est absente. D'un point de vue cellulaire, nous avons observé que la surexpression de la MMP11 diminue la nécrose et l'apoptose des cellules tumorales et augmente la prolifération des cellules tumorales au sein des tumeurs, et inversement en absence de MMP11. D'un point de vue moléculaire, l'étude mécanistique conforte le lien entre la MMP11 et la voie de l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1). La MMP11 entraîne une augmentation de la biodisponibilité d'IGF1 en diminuant IGFBP1 (IGF-Binding Protein 1) par clivage protéolytique (Dali-Youcef et al., 2016; Mañes et al., 1997). Ceci a pour conséquence d'activer la voie IGF1/Akt, connue pour jouer un rôle important dans la prolifération (Pollak, 2008). De plus, les cellules cancéreuses subissant une reprogrammation de leur métabolisme (Jang et al., 2013; Wang et al., 2018), nous supposons que la MMP11 favorisait l'utilisation de lipides et la glycolyse aérobie pour permettre la croissance tumorale. L'analyse des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique a révélé que la MMP11 entraînait une augmentation de la captation tumorale des lipides, de leur utilisation et de leur turnover. Ensuite, l'analyse des gènes impliqués dans le métabolisme du lactate a révélé que la MMP11 induisait une augmentation de la production et de l'expulsion/la sécrétion du lactate ce qui traduit une augmentation de la glycolyse aérobie. En se fiant à l'analyse des gènes impliqués dans la chaîne de transports d'électrons de la mitochondrie, ceci s'accompagne d'une diminution de la respiration mitochondriale. Enfin, des résultats préliminaires ont montré que la MMP11 augmenterait le stress du réticulum et altérerait l'UPR mitochondriale (UPR^{mt}). Les résultats miroirs sont obtenus en l'absence de MMP11 par les mêmes analyses des souris MMP11-KO croisées avec des souris MMTV-PyMT. En conclusion, l'ensemble de ces éléments confirme l'impact de la MMP11 sur la formation tumorale et précise le mécanisme moléculaire de la MMP11. En effet, la MMP11 intervient dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, leur donnant ainsi un avantage de survie et des propriétés prolifératives. Un manuscrit regroupant les résultats obtenus a été publié dans *Cancers* (Tan, Jaulin et al., 2020). Le manuscrit intitulé « Matrix Metalloproteinase-11 Promotes Early Mouse Mammary Gland Tumor Growth through Metabolic Reprogramming and Increased

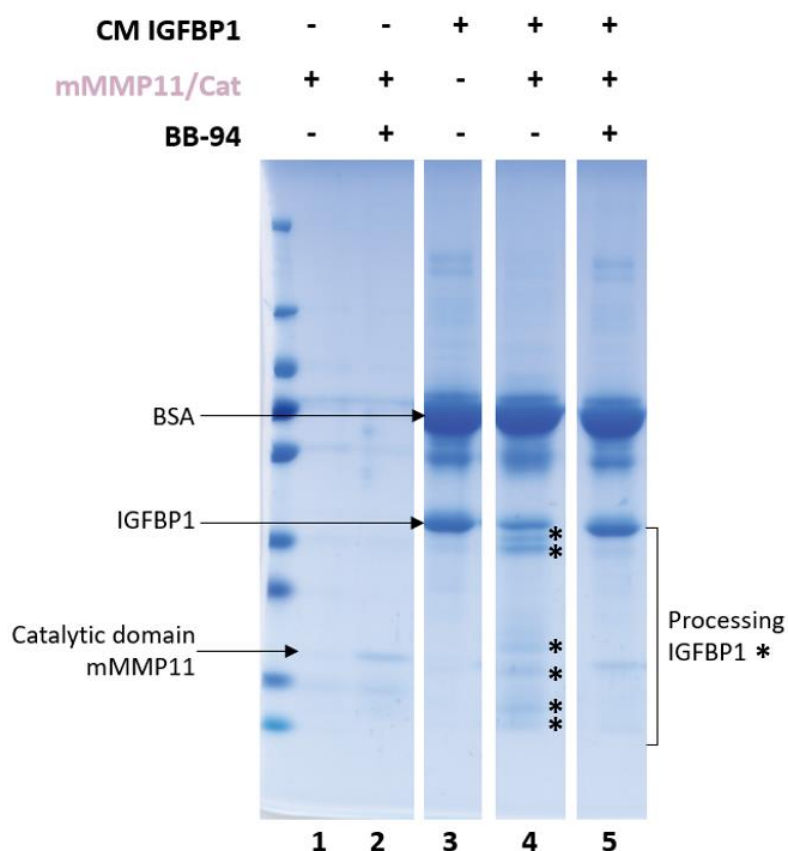


Figure R8 : Mesure de l'activité catalytique de la MMP11 recombinante murine sur IGFBP1

Analyse de l'activité protéolytique de mMMP11/Cat (1) sur IGFBP1, produite dans le milieu conditionné (CM=conditioned medium) de cellules HEK293T transfectées avec le plasmide pCMV-IGFBP1-myc, en absence (4) ou en présence (5) de BB-94, sur gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie.

IGF1/AKT/FoxO1 Signaling Pathway, Enhanced ER Stress and Alteration in Mitochondrial UPR» est inclus à la fin de cette partie « Résultats ».

Dans la continuité du manuscrit, j'ai réalisé une expérience *in vitro* qui vient renforcer le rôle de la MMP11 sur la voie IGF1/Akt, par la dégradation d'IGFBP1. Pour cela, la MMP11 recombinante murine active (mMMP11/Cat ; 19,3kDa) a été mise en présence du milieu conditionné par les cellules HEK293T transfectées avec un plasmide d'expression d'IGFBP1, en y ajoutant ou non le batimastat (BB-94), un inhibiteur de la MMP11. Ensuite, l'ensemble est déposé sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-Page) coloré au bleu de Coomassie (Figure R8). Ainsi, en présence d'IGFBP1 seule (Figure R8, colonne 3), on détecte une forte bande qui lui est associée. Lorsqu'IGFBP1 est mise en présence de la mMMP11/Cat, on détecte plusieurs bandes qui correspondraient aux produits de dégradation d'IGFBP1 (Figure R8, colonne 4). Contrairement à ce qui a été montré par Mañes et al. en 1997, la mMMP11/Cat semble donc cliver IGBP1 sur plusieurs sites et non sur un seul site. Lorsqu'IGBP1 est mise en présence de la mMMP11/Cat et de BB-94, on observe à nouveau une unique et forte bande associée à IGFBP1 (Figure R8, colonne 5). La MMP11 est inhibée par BB-94 ce qui l'empêche de cliver IGFBP1. Cette analyse basée sur l'utilisation du milieu conditionné comme source d'IGFBP1 indique un processus de dégradation complexe avec au moins deux sites de clivage reconnus par la MMP11, entraînant donc l'inactivation d'IGBP1 et l'activation de la voie IGF1/Akt.

B. Impact de la MMP11 adipocytaire sur la croissance tumorale

1. Contexte

La MMP11 n'est pas exprimée par les cellules cancéreuses mais par les cellules mésenchymateuses péri tumorales (adipocytes, fibroblastes). En effet, des études ont montré que les cellules cancéreuses invasives induisaient l'expression de la MMP11 dans les adipocytes présents au front d'invasion (Andarawewa et al., 2005). On parle alors d'adipocytes associés au cancer (CAA) (Dirat et al., 2011). De plus, des résultats du laboratoire supportent l'idée que la MMP11 sécrétée par les adipocytes est impliquée dans le remodelage tissulaire et favorise la croissance tumorale. L'objectif consiste alors à démontrer que la MMP11 adipocytaire favorise la progression tumorale. Les deux précédents modèles (MMP11-KO ; K14-MMP11) croisés avec des souris MMTV-PyMT ne permettent pas d'étudier cette question. En effet, étant constitutifs, ils ne permettaient pas d'appréhender le rôle spécifique de la MMP11 adipocytaire. De plus, les souris MMTV-PyMT développent spontanément des tumeurs mammaires très

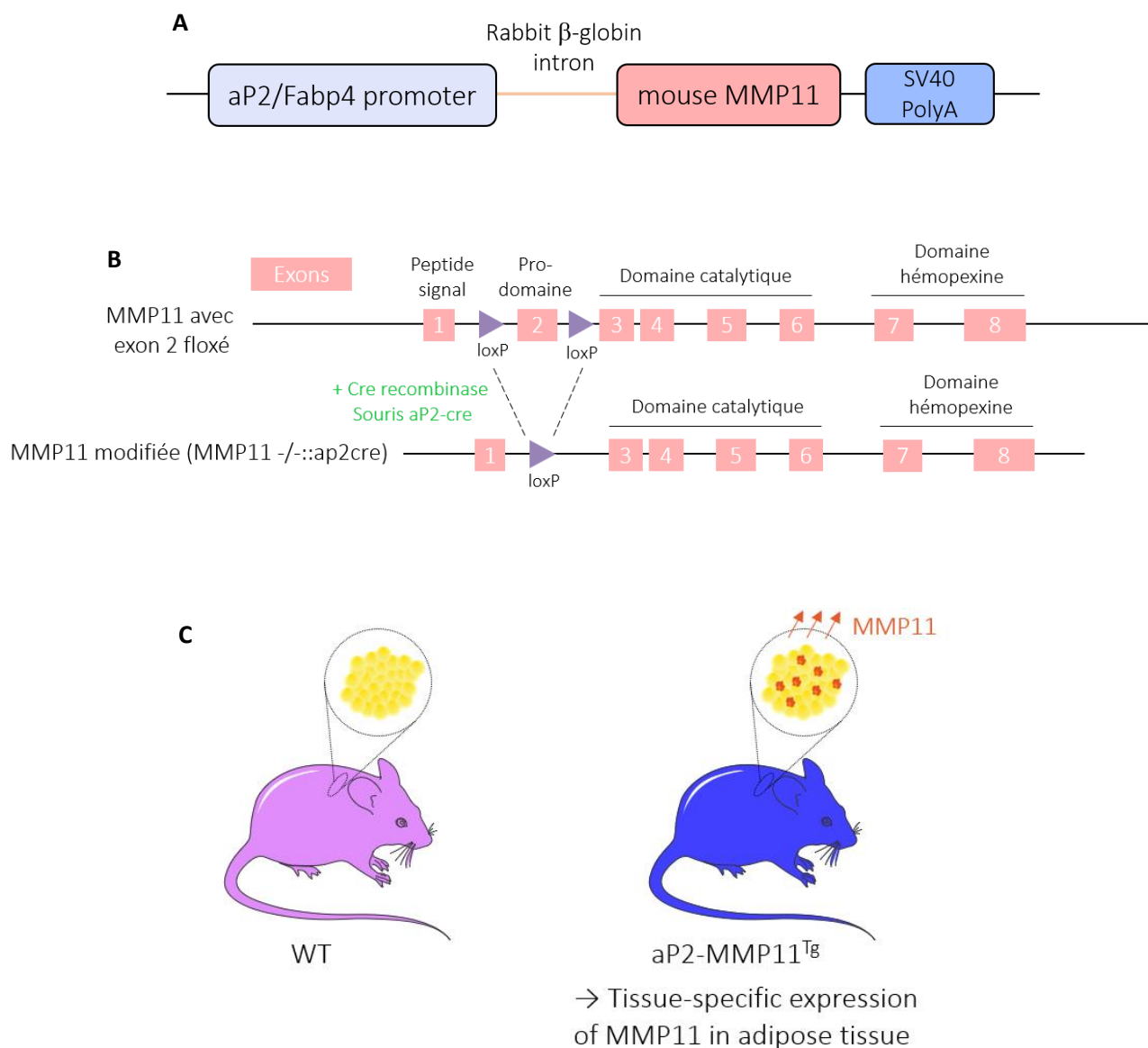


Figure R9 : Etablissement des modèles murins d'inactivation conditionnelle (MMP11 $-/-::aP2$ -Cre) et de surexpression tissu-spécifique (aP2-MMP11) de la MMP11

A. Représentation schématique de la construction transgénique aP2-MMP11.

B. Représentation schématique de l'inactivation conditionnelle de la MMP11 endogène par la stratégie Cre-LoxP.

C. Illustration du modèle aP2-MMP11^{Tg}. Dans ce modèle de surexpression tissu-spécifique, le transgène MMP11 est sous le contrôle du promoteur spécifique du tissu adipeux aP2.

hétérogènes (Hollern and Andrechek, 2014; Lin et al., 2003). Il est donc difficile de comparer les tumeurs entre elles et d'avoir accès à des mécanismes moléculaires précis. Pour pallier à cela, des nouvelles lignées de souris d'inactivation conditionnelle (MMP11^{-/-}::aP2-cre ; [Figure R9B](#)) et de surexpression tissu-spécifique (aP2-MMP11 ; [Figure R9A](#)) de la MMP11 ont été générées pour étudier le rôle de la MMP11 produite par les adipocytes à proximité des cellules cancéreuses. Durant ma thèse, mon projet s'est limité à l'étude du modèle de surexpression tissu-spécifique où l'expression du transgène MMP11 est sous le contrôle du promoteur spécifique du tissu adipeux aP2 ([Figure R9A](#)).

2. Description de la construction aP2-MMP11

Mon étude se focalise sur le modèle de gain de fonction de la MMP11 dans le tissu adipeux ([Figure R9C](#)). Ce modèle est généré à partir d'une construction de transgénèse où l'expression de la MMP11 est sous le contrôle du promoteur spécifique du tissu adipeux aP2. Le gène *aP2* ou *FABP4* code pour la Fatty Acid-Binding Protein 4 (ou Protéine 4 de Liaison aux Acides gras), une protéine cytosolique qui régule le trafic des lipides dans les adipocytes matures (Smathers and Petersen, 2011). Ce gène est exprimé par les adipocytes et les macrophages mais l'expression dans les adipocytes domine largement (Furuhashi et al., 2015; Shum et al., 2006).

La construction utilisée est dérivée du squelette plasmidique pBS-aP2-polyA qui possède le promoteur aP2 de 5,4 kb et le signal polyA du SV40 (Addgene, pBS aP2 promoter (5,4 kb) polyA, plasmide #11424). Ainsi, cette construction plasmidique contient le promoteur murin aP2 spécifique des adipocytes (5,4 kb) et le site initiateur de la transcription, la cassette d'expression de la MMP11 de souris, avec une séquence intronique de la bêta-globine de lapin et la phase ouverte de lecture de la MMP11. L'intron de bêta-globine de lapin peut améliorer l'expression du gène *MMP11*. Cette construction se termine par un fragment d'ADN qui correspond au signal de polyadénylation afin de produire et stabiliser l'ARNm mature pour la traduction ([Figure R9A](#)).

3. Validation de la construction aP2-MMP11 *in vitro*

Afin de vérifier que la construction aP2-MMP11 permet l'expression de la MMP11 dans les adipocytes *in vitro*, la construction a été transfectée transitoirement dans les cellules épithéliales HeLa et dans les cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes ([Figure R10A](#)). Plusieurs constructions contrôles ont également été transfectées dans les HeLa et 3T3-L1 (pQCXIP/mMMP11 et pBS/aP2-polyA).

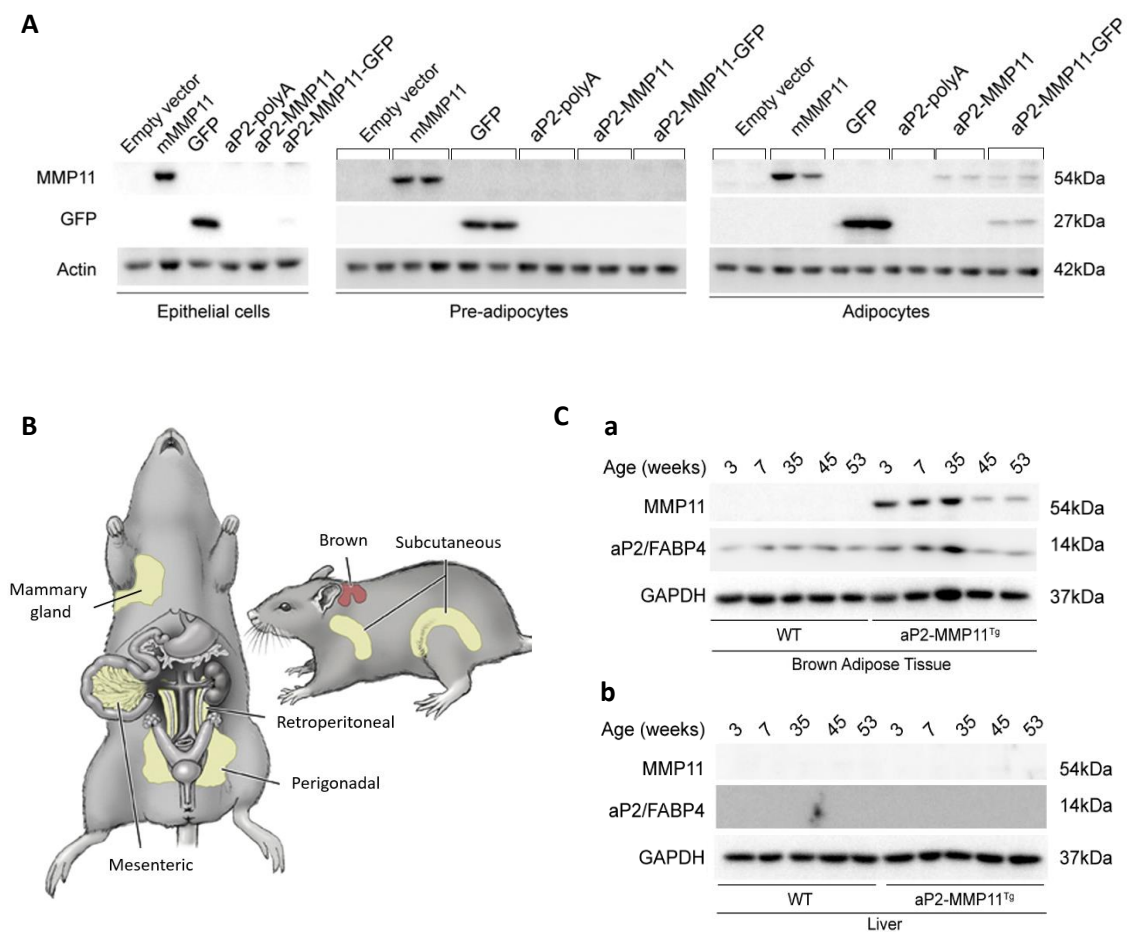


Figure R10 : Validation de la construction aP2-MMP11 *in vitro* et de la lignée transgénique aP2-MMP11

A. Analyse de l'expression de la MMP11 dans les cellules épithéliales (HeLa; à gauche) et dans les cellules 3T3-L1 différenciées (à droite) ou non (au milieu) en adipocytes par immunoblot après transfection des cellules avec différents plasmides : pQCXIP, pQCXIP/mMMP11, pBS/aP2-polyA et pBS/aP2-MMP11. L'actine est utilisée comme contrôle de charge.

B. Illustration des différents tissus adipeux dans lesquels l'expression de la MMP11 a été analysée (Adapté de Tchkonina et al., 2013).

C. Analyse de l'expression de la MMP11 et d'aP2/FABP4 dans le tissu adipeux brun (a) et dans le foie (b) des souris contrôles (WT) et aP2-MMP11^{Tg}, à différents âges, par immunoblot. Le GAPDH est utilisé comme contrôle de charge.

L'expression de la MMP11 a été analysée par immunoblot à partir des protéines extraites des cellules HeLa et des cellules 3T3-L1 incubées dans un milieu de différenciation adipocytaire durant 48 heures. La construction aP2-MMP11 ne permet pas l'expression de la MMP11 ni dans les cellules épithéliales (Figure R10A, à gauche) ni dans les préadipocytes en l'absence de cocktail de différenciation (Figure R10A, au milieu). En revanche, elle permet l'expression de la MMP11 dans les conditions de différenciation des 3T3-L1 en adipocytes (Figure R10A, à droite). La construction aP2-MMP11 permet donc l'expression spécifique de la MMP11 dans les adipocytes, elle a été utilisée pour générer la lignée transgénique aP2-MMP11.

4. Description et validation de la lignée transgénique aP2-MMP11

Dans le modèle transgénique aP2-MMP11, la MMP11 est censée être exprimée de manière ectopique dans tous les tissus adipeux. Cette lignée est viable et fertile. L'expression tissu-spécifique du transgène MMP11 a été analysée par immunoblot à partir des protéines extraites du tissu adipeux brun interscapulaire (BAT), de différents tissus adipeux blancs (rétropéritonéal, mammaire, gonadal), et du foie, à différents âges (Figure R10B). Les résultats obtenus pour les souris aP2-MMP11 ont été comparés avec ceux obtenus pour les souris sauvages contrôles. On observe que la pro-MMP11 (54kDa) est spécifiquement détectée dans les tissus adipeux des souris aP2-MMP11, la plus forte expression étant observée dans le tissu adipeux brun (Figure R10Ca). La MMP11 n'est pas exprimée dans le foie (Figure R10Cb). La forme mature de la MMP11 n'est pas détectée, ce résultat suggère que la MMP11 mature est également rapidement dégradée dans le tissu adipeux.

5. Impact de la MMP11 sur la croissance tumorale mammaire

Pour étudier la contribution de la MMP11 adipocytaire sur la croissance tumorale, j'ai greffé de manière orthotopique 200 000 cellules cancéreuses syngéniques dans le tissu adipeux des glandes mammaires #4 droite et gauche de souris sauvages contrôles et transgéniques qui ont entre 15 et 20 semaines (Figure R11A). J'ai ensuite suivi l'évolution des tumeurs avec un pied à coulisse durant 3-4 semaines en mesurant la largeur et la longueur des tumeurs. Pour commencer, j'ai analysé l'expression de la MMP11 dans les différents tissus adipeux des souris sauvages et transgéniques (aP2-MMP11) par immunoblot. On observe que la MMP11 est uniquement exprimée dans les tissus adipeux des souris aP2-MMP11. Elle est fortement exprimée dans le tissu adipeux brun de toutes les souris transgéniques (Figure R11B). Cette surexpression de la MMP11 est associée à une diminution significative de la taille des

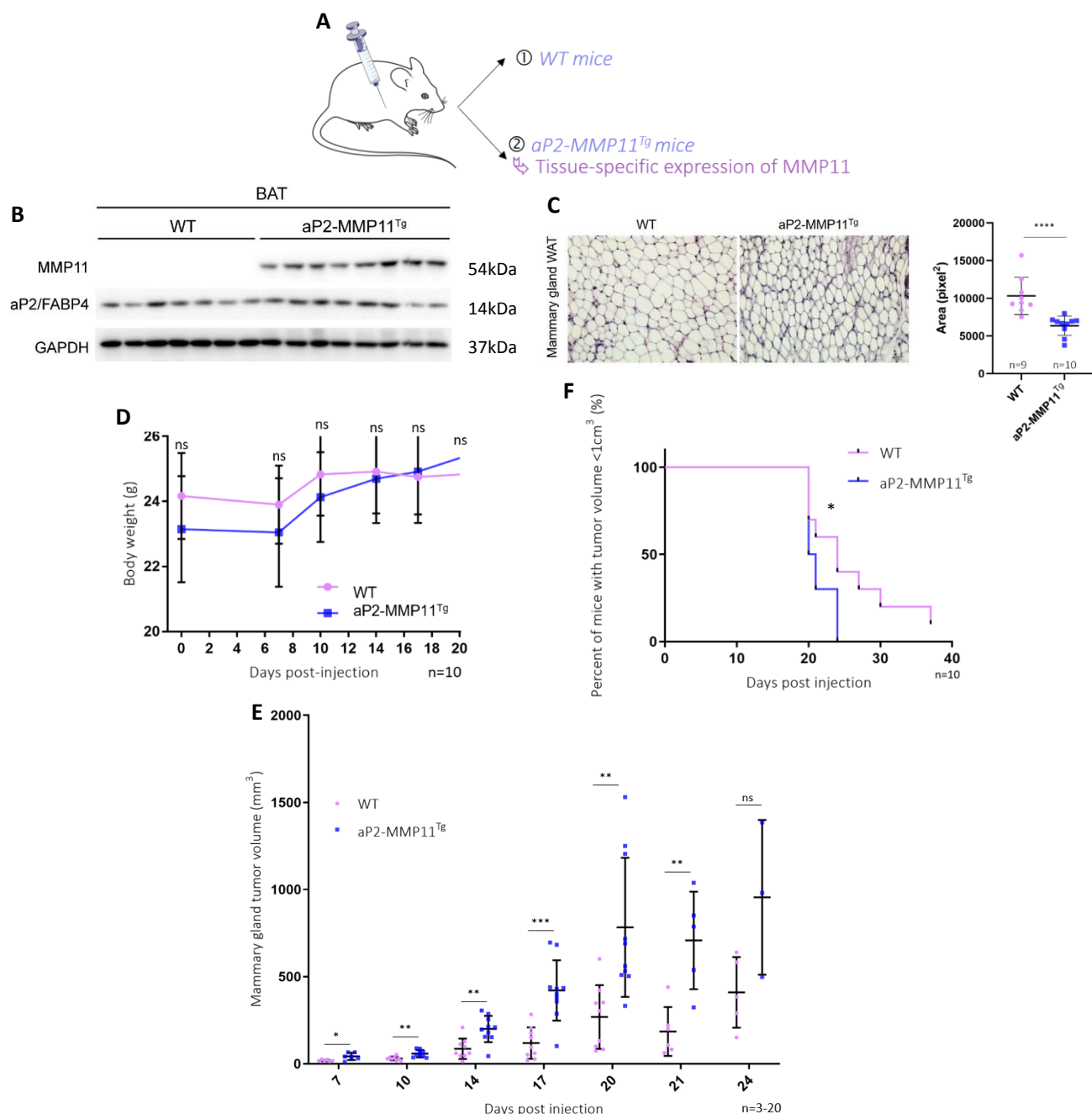


Figure R11 : Expérience pilote d'optimisation de l'analyse de l'impact de la MMP11 sur la croissance tumorale

A. Représentation schématique de la procédure expérimentale : injection orthotopique de 200 000 cellules cancéreuses syngéniques (E0771) dans le tissu adipeux des glandes mammaires #4 droite et gauche des souris contrôles (WT) et transgéniques (aP2-MMP11^{Tg}).

B. Analyse de l'expression de la MMP11 et d'aP2/FABP4 dans le tissu adipeux brun (BAT) des souris contrôles (WT) et aP2-MMP11^{Tg} par immunoblot. Le GAPDH est utilisé comme contrôle de charge.

C. Analyse de l'aire des adipocytes (à droite) à partir des coupes de tissus adipeux mammaires contrôle et aP2-MMP11^{Tg} colorées à l'hématoxyline-éosine (à gauche).

D, E, F. Analyse du poids (D) et du volume tumoral de la glande mammaire #4 droite (E) des souris contrôles et aP2-MMP11^{Tg} durant 3-4 semaines après l'injection des cellules E0771 et établissement d'une courbe de Kaplan-Meier (F).

Informations données : moyenne±SD, ns=non significatif, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, unpaired t test

adipocytes mammaires comparée aux souris contrôles, cela est en accord avec les résultats obtenus précédemment au laboratoire (Figure R11C) (Andarawewa et al., 2005; Dali-Youcef et al., 2016). Cela montre pour la première fois que la MMP11 produite par les adipocytes a un effet autocrine sur leur physiologie. Ces résultats concordent avec le fait que les souris transgéniques ont un poids plus faible que les souris sauvages, bien que cette différence ne soit pas significative et s'estompe au cours des jours qui suivent l'injection des cellules cancéreuses probablement en raison de l'apparition des tumeurs (Figure R11D). Dans ces conditions, j'ai constaté que le volume tumoral au niveau de la glande mammaire #4 droite était significativement plus élevé dans les souris aP2-MMP11, par rapport aux souris contrôles, après analyse du volume tumoral des tumeurs mammaires durant environ 4 semaines (Figure R11E). La différence de volume entre les souris contrôles et aP2-MMP11 est la plus significative 17 jours après l'injection des cellules E0771. Le volume tumoral n'était pas significativement plus élevé au niveau de la glande mammaire #4 gauche des souris aP2-MMP11 (non montré). Ainsi, la MMP11 produite par les adipocytes favorise la croissance tumorale. Quand les tumeurs ont atteint un volume de plus de 1cm³, les souris ont été sacrifiées. Sur la courbe de Kaplan Meier, on observe donc que les souris aP2-MMP11 sont sacrifiées significativement plus tôt que les souris contrôles, car elles ont atteint le point limite plus rapidement (Figure R11F).

L'étude de la contribution de la MMP11 adipocytaire sur la croissance tumorale nécessite des analyses cellulaires et moléculaires sur des tumeurs mammaires de souris sacrifiées en même temps. Ainsi, au vu des résultats obtenus lors de l'expérience ci-dessus, j'ai greffé de manière orthotopique 200 000 cellules cancéreuses syngéniques dans le tissu adipeux de la glande mammaire #4 droite uniquement et suivi l'évolution des tumeurs grâce à un échographe (Vevo 3100, Fujifilm, VisualSonics) durant 17 jours seulement. L'échographe permet d'obtenir des données plus précises avec la mesure de la profondeur des tumeurs, en plus des mesures de la largeur et de la profondeur (Figure R12A). Pour commencer, j'ai analysé l'expression de la MMP11 dans les différents tissus adipeux des souris sauvages et transgéniques (aP2-MMP11) par immunoblot. On observe que la MMP11 est uniquement exprimée dans les tissus adipeux des souris aP2-MMP11 (Figure R12B). Cependant, elle est exprimée de manière variable en fonction des animaux dans le tissu adipeux brun des souris aP2-MMP11. De plus, la différence de poids entre les souris aP2-MMP11 et leurs contrôles est très faible bien que les souris aP2-MMP11 aient un poids légèrement plus faible que les souris contrôles durant les 17 jours qui suivent l'injection des cellules cancéreuses (Figure R12C). Dans ces conditions, j'ai également constaté que le volume tumoral au niveau de la glande mammaire #4 droite était semblable dans les souris aP2-MMP11 et contrôles durant les 17 jours

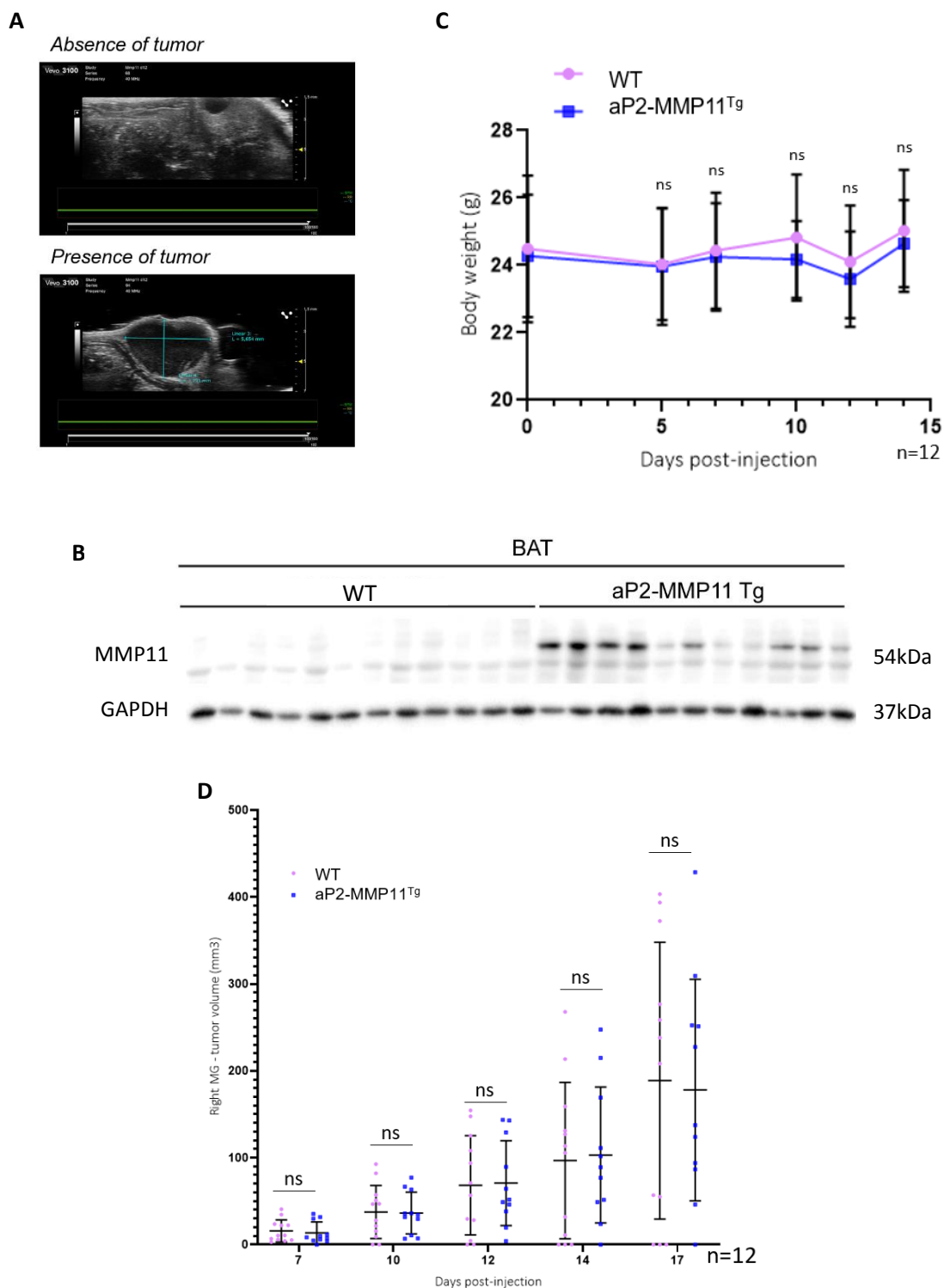


Figure R12 : Analyse de l'impact de la MMP11 sur la croissance tumorale

A. Echographie de la glande mammaire #4 droite en absence (en haut) ou en présence d'une tumeur (en bas).

B. Analyse de l'expression de la MMP11 et d'aP2/FABP4 dans le tissu adipeux brun (BAT) des souris contrôles (WT) et aP2-MMP11^{Tg} par immunoblot. Le GAPDH est utilisé comme contrôle de charge.

C, D. Analyse du poids (C) et du volume tumoral de la glande mammaire#4 droite (D) des souris contrôles et aP2-MMP11^{Tg} durant environ 2 semaines après l'injection des cellules E0771.

Informations données : moyenne±SD, ns=non significatif, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, unpaired t test

de mesure (Figure R12D). Après une analyse détaillée de l'évolution des tumeurs de chaque souris, je me suis rendue compte qu'il n'y avait pas de tendance observable entre le niveau d'expression de la MMP11 et l'évolution de la tumeur. En effet, les volumes des tumeurs des 4 souris aP2-MMP11 qui expriment le plus fortement la MMP11 dans leur tissu adipeux brun sont similaires ou plus faibles que ceux d'une grande majorité des souris contrôles (non montré). Comme l'expression de la MMP11 dans ces souris était très variable, il sera nécessaire de répéter cette expérience afin de confirmer ou non le rôle de la MMP11 adipocytaire sur la croissance tumorale.

Bien que certains résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la MMP11 remodèle le tissu adipeux et favorise la croissance tumorale, de nombreux problèmes expérimentaux restent à résoudre. De nombreuses limites associées aux résultats viennent également s'ajouter. La principale limite est que les cellules cancéreuses (E0771) que nous utilisons présentent un phénotype agressif ce qui ne permet peut-être pas d'observer l'effet de la MMP11 sur la progression tumorale. Une autre limite importante est que l'injection des cellules cancéreuses dans le tissu adipeux des glandes mammaires est aléatoire, les cinétiques de croissance tumorale sont variables d'un individu à l'autre. Cette variabilité peut aussi masquer un effet biologique.

Article

Matrix Metalloproteinase-11 Promotes Early Mouse Mammary Gland Tumor Growth through Metabolic Reprogramming and Increased IGF1/AKT/FoxO1 Signaling Pathway, Enhanced ER Stress and Alteration in Mitochondrial UPR

Bing Tan ^{1,2,3,4,†,§}, Amélie Jaulin ^{1,2,3,4,§} , Caroline Bund ^{5,6,7}, Hassiba Outilaft ⁵, Corinne Wendling ^{1,2,3,4}, Marie-Pierrette Chenard ^{1,2,3,4,8}, Fabien Alpy ^{1,2,3,4} , A. Ercüment Cicek ^{9,10}, Izzie J. Namer ^{5,6,7}, Catherine Tomasetto ^{1,2,3,4,*} , and Nassim Dali-Youcef ^{1,2,3,4,11,*}

- ¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire Illkirch, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch CEDEX, France; tanbing3537@gmail.com (B.T.); jaulina@igbmc.fr (A.J.); wendling@igbmc.fr (C.W.); marie-pierrette.chenard@chru-strasbourg.fr (M.-P.C.); falpy@igbmc.fr (F.A.)
- ² Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7104, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France
- ³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch CEDEX, France
- ⁴ Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch CEDEX, France
- ⁵ MNMS-Platform, Hôpital de Hautepierre, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1 avenue Molière, 67200 Strasbourg CEDEX, France; c.bund@icans.eu (C.B.); hassiba2a@live.fr (H.O.); ij.namer@icans.eu (I.J.N.)
- ⁶ Service de Médecine Nucléaire et d'Imagerie Moléculaire, Institut de Cancérologie Strasbourg Europe, 67200 Strasbourg, France
- ⁷ ICube, Université de Strasbourg/CNRS, UMR 7357, 67091 Strasbourg CEDEX, France
- ⁸ Département de pathologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital de Hautepierre, 1 avenue Molière, 67200 Strasbourg, France
- ⁹ Computer Engineering Department, Bilkent University EA-514 Bilkent, Ankara 06800, Turkey; cicek@cs.bilkent.edu.tr
- ¹⁰ Computational Biology Department, School of Computer Science, Carnegie Mellon University, 5000 Forbes avenue, Pittsburgh, PA 15213, USA
- ¹¹ Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, Pôle de Biologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, 1 place de l'hôpital, 67091 Strasbourg CEDEX, France
- * Correspondence: cat@igbmc.fr (C.T.); dali@igbmc.fr (N.D.-Y.); Tel.: +33-388-653-423; Fax: +33-388-653-201
- † Current address: School of Clinical Medicine, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, No. 82, Daxuecheng Rd, Shapingba Dist, Chongqing 401331, China.
- ‡ Current address: Chongqing Engineering Research Center of Pharmaceutical Sciences, Chongqing 401331, China.
- § These authors contributed equally to this work.

Received: 7 July 2020; Accepted: 17 August 2020; Published: 20 August 2020



Abstract: Matrix metalloproteinase 11 (MMP11) is an extracellular proteolytic enzyme belonging to the matrix metalloproteinase (MMP11) family. These proteases are involved in extracellular matrix (ECM) remodeling and activation of latent factors. MMP11 is a negative regulator of adipose tissue development and controls energy metabolism in vivo. In cancer, MMP11 expression is associated with poorer survival, and preclinical studies in mice showed that MMP11 accelerates tumor growth. How the metabolic role of MMP11 contributes to cancer development is poorly understood. To address this issue, we developed a series of preclinical mouse mammary gland tumor models by genetic engineering. Tumor growth was studied in mice either deficient (Loss

of Function-LOF) or overexpressing MMP11 (Gain of Function-GOF) crossed with a transgenic model of breast cancer induced by the polyoma middle T antigen (PyMT) driven by the murine mammary tumor virus promoter (MMTV) (MMTV-PyMT). Both GOF and LOF models support roles for MMP11, favoring early tumor growth by increasing proliferation and reducing apoptosis. Of interest, MMP11 promotes Insulin-like Growth Factor-1 (IGF1)/protein kinase B (AKT)/Forkhead box protein O1 (FoxO1) signaling and is associated with a metabolic switch in the tumor, activation of the endoplasmic reticulum stress response, and an alteration in the mitochondrial unfolded protein response with decreased proteasome activity. In addition, high resonance magic angle spinning (HRMAS) metabolomics analysis of tumors from both models established a metabolic signature that favors tumorigenesis when MMP11 is overexpressed. These data support the idea that MMP11 contributes to an adaptive metabolic response, named metabolic flexibility, promoting cancer growth.

Keywords: Warburg effect; breast cancer; UPR^{ER}; UPR^{mt}; metabolomics; metabolic flexibility

1. Introduction

Breast cancer is a leading cause of death by cancer in women [1]. In addition to cancer cells, the tumor microenvironment (TME) plays an important role in breast cancer progression [2]. The TME is composed of an extracellular matrix and distinct cell types including macrophages, immune cells, endothelial cells, and fibroblasts. Adipocytes are an emerging cellular component of the TME, they have a direct impact on cancer cells by cell-cell contacts, but also an indirect contribution by a paracrine action [3]. Matrix metalloproteinase-11 (MMP11), also called stromelysin-3, is a protein secreted by stromal cells during breast cancer invasion, and increased MMP11 levels have been associated with poor outcome in cancer patients [4–7]. In the context of breast cancer, MMP11 is a TME component expressed by cancer-associated fibroblasts (CAFs) in the tumor center and by cancer-associated adipocytes (CAAs) at the tumor invasive front [3,7,8]. In addition, MMP11 is expressed by breast cancer intratumoral mononuclear inflammatory cells and this expression is the most potent and independent factor to predict relapse-free survival and overall survival [9]. Despite its presence in the TME from many carcinomas, the contribution of MMP11 in this compartment remains elusive. We have previously shown that MMP11 acts as a negative regulator of adipogenesis both in vitro and in vivo [8,10,11]. More recently, we highlighted a physiological role of MMP11 as a metabolic regulator of whole-body energy homeostasis. Increased MMP11 expression (MMP11^{Tg}) is associated with a lean phenotype and protection from diet-induced obesity, while loss of MMP11 expression (MMP11^{KO}) promotes weight gain and metabolic syndrome [12]. This study showed that MMP11 mediates a metabolic switch to aerobic glycolysis at the expense of oxidative phosphorylation in the absence of cancer. In breast cancer, the metabolic role of MMP11 was not addressed and mechanisms behind MMP11-mediated breast tumor growth remain poorly comprehended. In order to tackle this issue, we used MMP11 gain-of-function (GOF, MMP11^{Tg}) and loss-of-function (LOF, MMP11^{KO}) mouse models to examine the role of MMP11 on mammary tumor growth and metabolism. We crossed these mice with a genetic model of spontaneous mammary tumors: the murine mammary tumor virus promoter (MMTV)-polyoma middle T antigen (PyMT) genetic strain [13,14]. MMTV-PyMT females develop with high penetrance palpable mammary tumors that metastasize to the lung [15]. In this study, we compare tumor growth in GOF and LOF for MMP11 expression. Both models were consistent and showed that MMP11 favors tumor growth at an early stage. Moreover, this study brings novel insight into the metabolic role of MMP11 in tumor growth through induction of metabolic reprogramming.

2. Results

2.1. MMP11 Decreases MMTV-PyMT Mice Body Weight and Increases Mammary Tumor Incidence

To explore the role of MMP11 in cancer, we took advantage of two genetic models of gain and loss of function and crossed them with the mammary gland tumor prone MMTV-PyMT strain (Figure S1) [12,15]. In the MMP11^{Tg} model, MMP11 is expressed under the control of the keratin 14 promoter (Figure S1), this construct leads to the presence of the MMP11 protein in the skin, a highly vascularized tissue (Figures S1, S2A, and S2B), and results in a complete body exposure to MMP11 [12]. Of note, the size of the MMP11 protein detected in the skin of MMP11^{Tg} indicates that the protein is predominantly present under its pro-form (Figure S2B). The MMP11^{KO} model is a constitutive knock-out resulting in the complete loss of MMP11 expression [12] (Figure S1). In a non-cancer model, we showed that MMP11^{Tg} mice are leaner than their control counterparts and reciprocally that MMP11^{KO} animals are overweight [12]. We examined body weight in double transgenic mice either expressing or lacking MMP11 in the presence of the Py-MT transgene (Figure 1). In the GOF breast cancer model PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg}, MMP11 decreased postnatal body weight of MMTV-PyMT mice from 3 to 9 weeks of age but no difference was noticed after palpable tumor occurred at 9–10 weeks of age (Figure 1Aa). In the LOF model (PyMT^{Tg}; MMP11^{KO}), MMP11 inactivation was accompanied by increased postnatal mice body weight from 3 to 12 weeks of age but no difference was observed after palpable tumor occurred at 13–14 weeks of age (Figure 1Ab). The changes in body weight observed in the GOF and LOF breast cancer models recapitulated those already reported in single MMP11-overexpressed and -inactivated mice models [12]. Even though the tumor grew rapidly to a certain extent in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice, tumor incidence was not significantly different from PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} control mice (Figure 1Ba). However, tumor growth was significantly delayed in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} controls (Figure 1Bb).

Our results show that MMP11 affects body weight and tumor incidence in MMTV-PyMT mice at an early stage of tumor development.

2.2. MMP11 Promotes MMTV-PyMT Mice Mammary Tumor Growth

To assess the impact of MMP11 on tumor development, we measured palpable tumor sizes with a caliper in individual mammary glands of PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice and compared them with their respective controls because both lines are on a different genetic background (Figure S1Bb',Bb). Mice have ten mammary glands organized in pairs. Tumor development is not synchronous among the different pairs and studies showed that in the PyMT model the distinct mammary gland pairs have different tumor-initiating properties [16]. Thus, we evaluated tumor growth in individual mammary glands, except for mammary glands #2 from #3, which are indistinguishable. Therefore, they were considered as one entity #2/3. Overexpression of MMP11 increased tumor volume in #1, #2/3, and #4 mammary glands in 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice, and in #1 mammary gland in 14-week-old animals as compared to controls (Figure 1Ca,Cb and Figure S2C). Conversely, in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice, we observed a decrease in tumor volume in #2/3 and #4 mammary glands in 14-week-old mice, and in #1, #2/3 mammary glands in 17-week-old animals as compared to controls (Figure 1Da,Db and Figure S2C). Then, we examined the tumor lesions and performed whole mount carmine-red staining in the #4 mammary gland to assess hyperplastic and neoplastic lesion areas both in GOF and LOF double transgenic mice at different time points. We chose mammary gland #4 because the fat pad is well developed (Figure S1C). Quantification of carmine red staining indicated that PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice had increased lesion area at 6, 8, 10, and 12 weeks of age (Figure 1Ea,Fa for quantification), whereas PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice had smaller lesions at 10 and 14 weeks of age as compared to their respective control littermates (Figure 1Eb,Fb for quantification). In both models, the tumor burden was similar at later stages close to the experimental end-point.

Together, these data demonstrate that MMP11 accelerates MMTV-PyMT transgenic mice tumor development and growth at early stage.

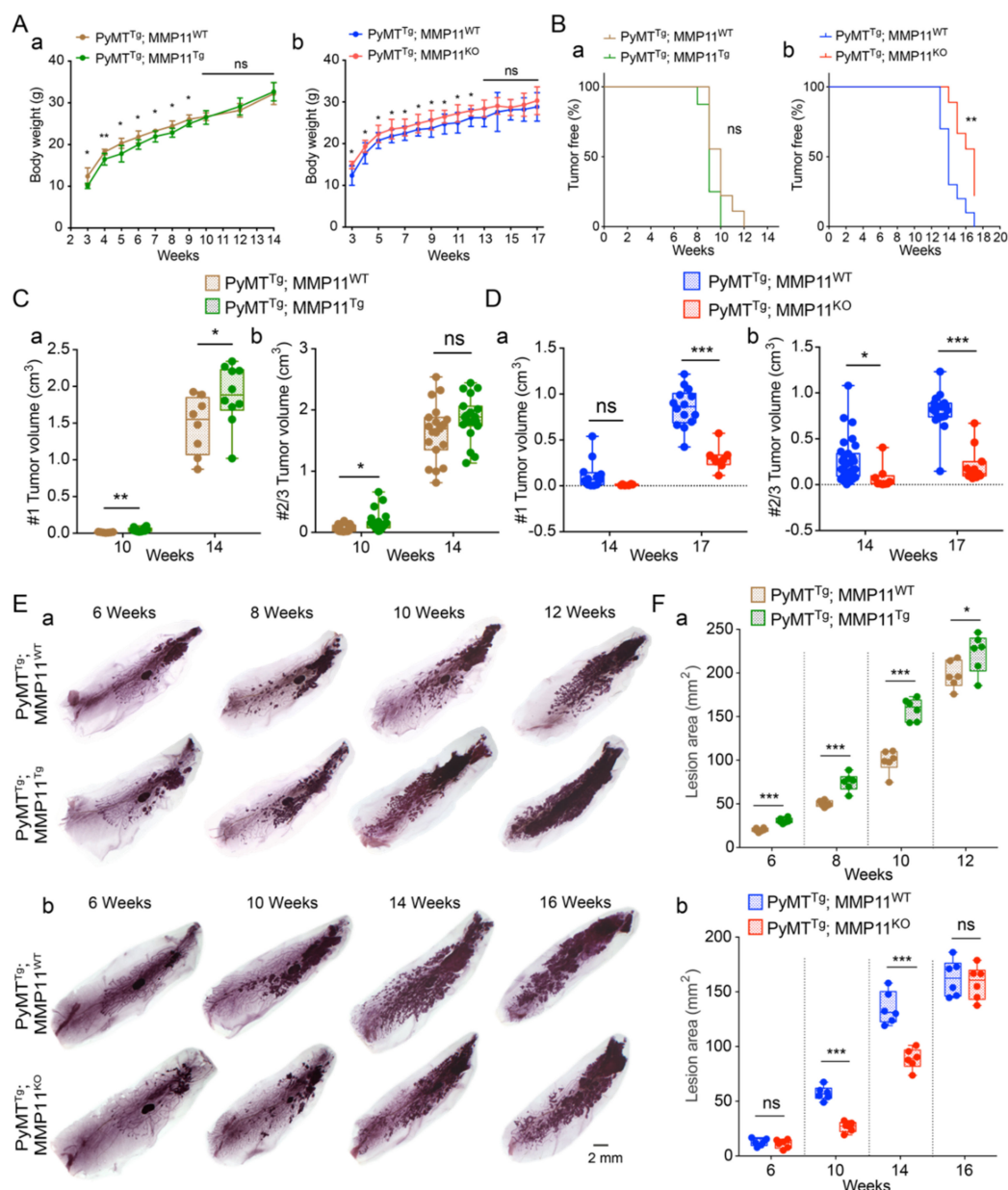


Figure 1. (A) Analysis of mice body weight in polyoma middle T antigen (PyMT)^{Tg}; matrix metalloproteinase 11 (MMP11)^{Tg} (a) and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} (b) animals as compared to their respective PyMT^{Tg} MMP11^{WT} controls. Overexpression of MMP11 decreased body weight before 9 weeks of age, whereas MMP11 inactivation increased mice body weight before 12 weeks of age; (B) Analysis of mice tumor development in 10- and 14-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} (a) and in 14 and 17-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} (b) mice. (a) No difference of percentage of tumor-free mice between PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice and controls; (b) PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice exhibited a significant increase in the percentage of tumor-free mice as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} animals; (C,D) Analysis of tumor volume in mammary glands #1 (a) and #2/3 (b) in 10- and 14-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} (C) and in 14- and 17-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} (D) mice, one dot corresponding to a palpable tumor; (E) Whole mount carmine-red staining of #4 mammary glands showed the developmental hyperplasia and neoplastic lesions at different time points in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice (a) and in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice (b) as compared to their respective controls; (F) Quantification of the lesion area of hyperplasia and neoplasm as represented in E in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice (a) and in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice (b) as compared to their controls. N = 6–8 mice/group, data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t -test).

2.3. MMP11 Reduces Necrosis and Apoptosis in Early Stage Mammary Gland Tumor Development in MMTV-PyMT Mice

To determine the impact of MMP11 on tumor necrosis and apoptosis in MMTV-PyMT mice, we analyzed paraffin-embedded #4 mammary gland tissue sections from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice and their control littermates by hematoxylin and eosin (HE) staining and Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) assay. Using HE staining, cell death and cytolysis (necrosis) are visualized by the light pink color while viable tumor cells are darker (purple color). PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice displayed decreased necrosis area at 8 weeks of age, but no significant difference in necrosis was observed at a later stage (14 weeks) as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} mice (Figure 2Aa). Consistently, PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice exhibited an increase in necrosis area at 14 and 17 weeks of age as compared to controls (Figure 2Ab). We then quantified the ratio of apoptotic cells in GOF and LOF mice as compared to their respective controls by TUNEL assay. We observed a significant decrease in the percentage of apoptotic cells in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} control mice at 6 weeks of age but not at a later stage (10 weeks), whereas PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice displayed a significant increase in the proportion of TUNEL positive cells at 10 weeks of age (Figure 2B). Invariably, the expression level of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was increased in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice and decreased in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice as compared with their respective controls (Figure 2C and Figure S3).

To conclude, at early stage of mammary gland tumor development, the presence of MMP11 decreases cell death and hence confers a survival advantage to tumors, thereby supporting cancer growth.

2.4. MMP11 Promotes Cell Proliferation in MMTV-PyMT Mice Mammary Tumor Development at an Early Stage and Induces the Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling Pathway

To investigate the impact of MMP11 on tumor proliferating cells, tumor tissue sections were analyzed by immunofluorescence using an antibody against the cell proliferation marker Ki-67, a protein encoded by the MKI67 gene [17]. The proportion of Ki-67-positive cells was significantly increased in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} mice in 6-week-old mice (Figure 3Aa), whereas PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice had less Ki-67-positive cells compared to their wildtype controls at 10 weeks of age (Figure 3Ab). However, at a later stage (8 weeks of age), PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} tumors had a similar percentage of proliferating cells as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} tumors (data not shown). These data show that MMP11 increases PyMT tumor cell proliferation at an early stage of tumor development.

Given that the IGF1 pathway is a recognized stimulator of cell growth and plays an important role in neoplasia [18], and that IGF1 bioavailability is increased upon MMP11 overexpression [12], we investigated whether the IGF1 signaling pathway is exacerbated in tumor extracts from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice. Two important components of this cascade, namely protein kinase B (AKT) and its target Forkhead box protein O1 (FoxO1), were more phosphorylated in tumor protein extracts from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to control mice (Figure 3Bb, left blot and Figure S4). Consistently, phosphorylation of AKT and FoxO1 were decreased in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice compared to controls (Figure 3Bb, right blot and Figure S4). Given that Insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1) is a known substrate of MMP11 [19], it is likely that MMP11 activates the IGF1/AKT growth pathway by increasing IGF1 bioavailability. In agreement with this hypothesis, the abundance of IGFBP1, the protein that controls the circulating levels of IGF1 [20], is reduced in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} tumors (Figure 3Ba, left blot) and increased in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} tumors (Figure 3Ba, right blot and Figure S4).

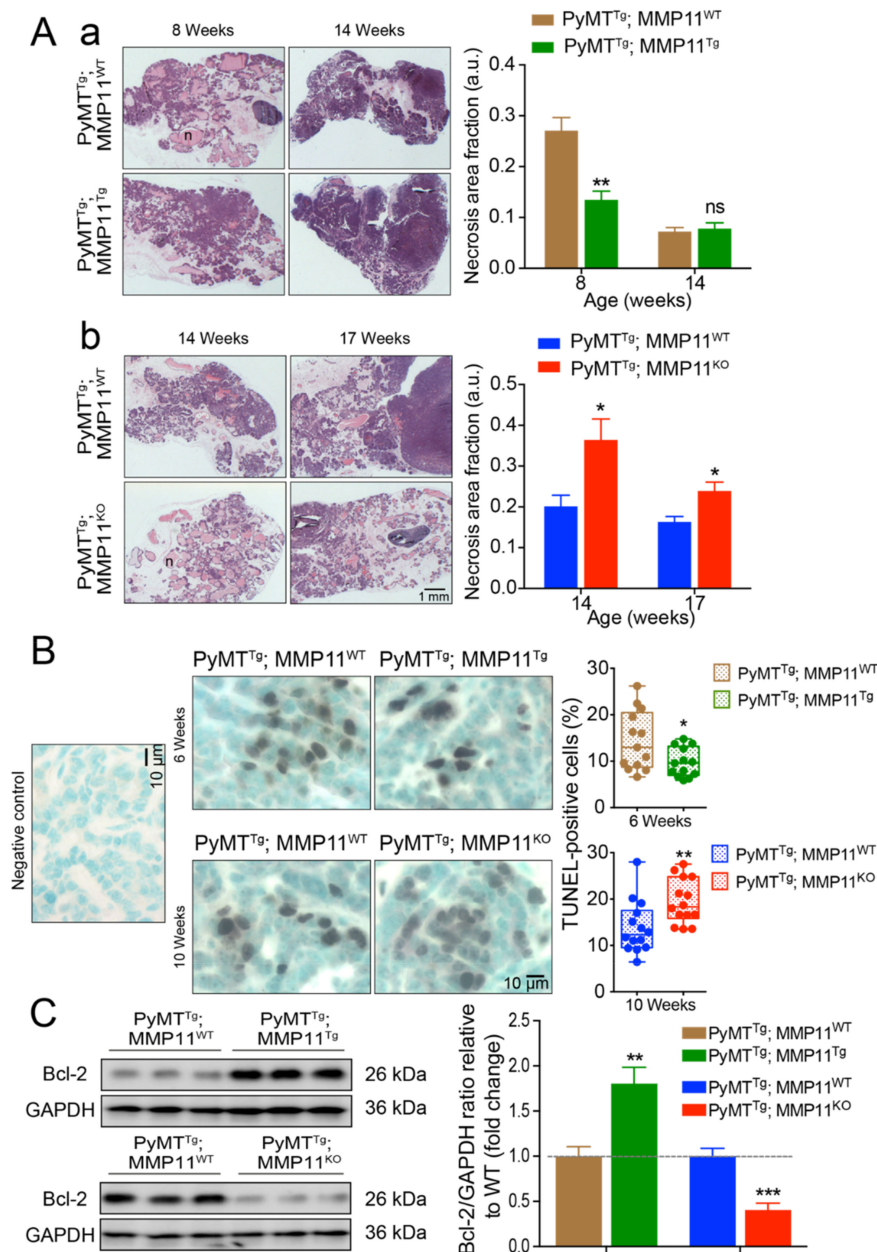


Figure 2. MMP11 plays anti-necrosis and anti-apoptotic roles in early stage of tumor development. (A) (a) Hematoxylin and eosin (HE) staining shows decreased tumor necrosis area in 8-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice but no change in necrosis area at 14-week-old mice as compared to in PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} age-matched mice; (b) 14- and 17-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice exhibit increased necrosis area as compared to control mice; (B) Apoptosis was measured by the TUNEL-assay apoptotic cells in tumors from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to age-matched controls (upper panel), whereas 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice exhibit a significant increase in apoptotic cell percentage as compared to control animals (lower panel); (C) Immunoblots of tumor protein extracts show an increase in the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to controls, while a decrease in Bcl-2 is observed in tumor protein extracts from PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice as compared to controls (left panel). Quantification of immunoblot signal density normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein levels relative to wild type is depicted in the right panel. N = 6–8 mice/group, data are expressed as mean ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t -test).

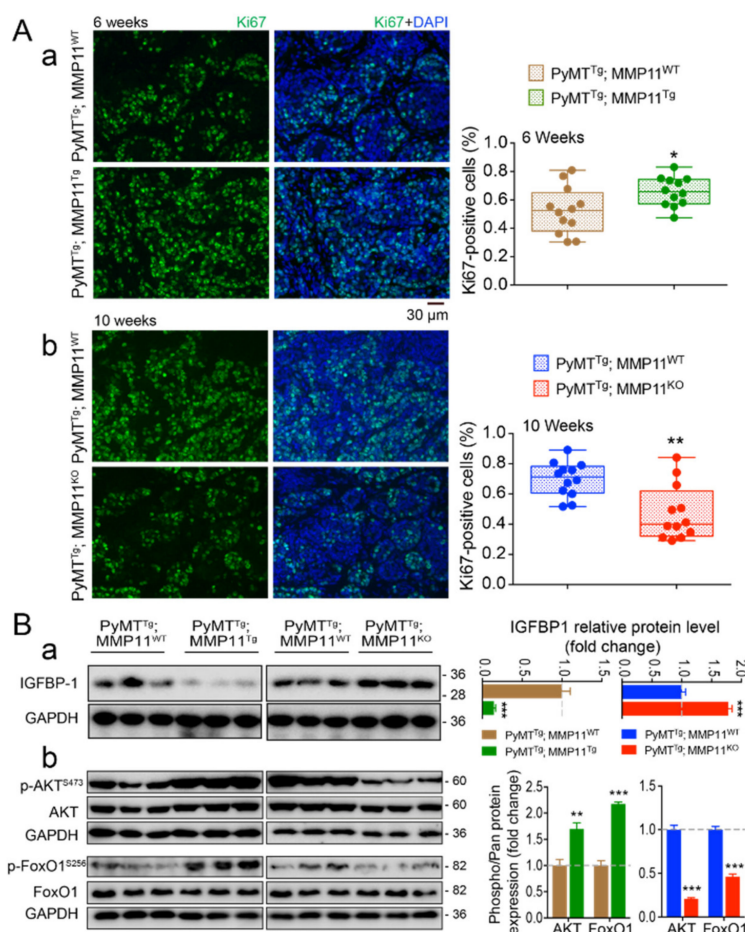


Figure 3. (A) MMP11 promotes tumor cell proliferation at early stage of tumor development. Immunofluorescence staining shows increased percentage of Ki-67-positive cells in the tumors of 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice (a), whereas tumors from 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} animals (b) have less proliferating cells compared with their respective controls; (B) Left panel: Western blot protein expression profiles of Insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1) (a) and of components of its downstream IGF1/AKT/FoxO1 signaling pathway (b) reveal activation of this cascade in representative tumors from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice and its decrease in tumors from 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} animals as compared to their respective control animals. Right panel: quantification of the ratios of phosphorylated proteins to total level compared to wildtype are presented, n = 6–8 mice/group, data are expressed as mean ± SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t -test).

Collectively, these results reveal that MMP11 overexpression promotes cell proliferation in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} tumors and exacerbates the IGF1/AKT/FoxO1 pathway. They support the notion that in the presence of MMP11, IGF1 increases cell proliferation.

2.5. MMP11 Increases Lipid Uptake and Utilization and Promotes Metabolic Reprogramming

Cancer cells exhibit a reprogrammed cell metabolism compared to normal cells resulting from specific enhanced energy demands [21]. In the light of the physiological role of MMP11 [12], we hypothesized that MMP11 stimulates lipid utilization and promotes aerobic glycolysis, a process known as the Warburg effect, to support tumor growth [21]. To address the metabolic role of MMP11 in tumors, we measured the expression of key metabolic genes in tumor samples. Regarding lipid metabolism, in tumor samples from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice, we observed a significant increase in the expression of the fatty acid transporter *Cd36* and the oxidative genes peroxisome

proliferator-activated receptor alpha (*Ppara*) and its target gene acyl coenzyme A oxidase (*Aco*), but also increased expression of acetyl-Coenzyme A carboxylase 1 and 2 (*Acc1* and *Acc2*), supporting an increased lipid uptake, utilization, and turnover (Figure 4Aa) [22–24]. Consistently, we observed the mirror expression profile in tumors from 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice as compared to their control littermates, with the exception that *Ppara* expression was not altered in this case (Figure 4Ab). Next, because in cancer cells aerobic glycolysis (Warburg effect) becomes the major metabolic pathway generating lactate at the expense of oxidative phosphorylation [21], we analyzed the expression of genes implicated in lactate metabolism and observed an increase in the expression of genes involved in lactate production: lactate dehydrogenase A (*Ldha*), release: monocarboxylate transporter 4 (*Mct4*), uptake: monocarboxylate transporter 1 (*Mct1*), and metabolism: lactate dehydrogenase B (*Ldhb*) in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to controls (Figure 4Ba) [25,26]. Interestingly, a significant reduction in the expression of *Mct4* and *Ldha* was found in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} tumors, suggesting a reduction in lactate production and release. No significant difference was observed in the expression of *Mct1* and *Ldhb* (Figure 4Bb). To determine whether the increase in aerobic glycolysis seen in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice is accompanied by negative regulation of certain oxidative phosphorylation (OXPHOS) genes consistent with Warburg's concept, we analyzed the expression of genes involved in the mitochondrial electron transport chain (ETC). In PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} tumors a significant decrease in the expression of *Ndufb5*, a gene that encodes a subunit of complex I of the mitochondrial respiratory chain, which transfers electrons from NADH to ubiquinone; a decrease in *Cox5b* expression, a gene encoding the cytochrome c subunit 5b protein of complex IV of the ETC; and a diminished expression of *Atp5b*, a gene encoding ATP synthase subunit 5 b of complex V were observed (Figure 4Ca). The alteration of these genes suggests that in the presence of MMP11, tumor cells have a decrease in mitochondrial respiration. A mirror phenotype was found in tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice, with increased *Ndufb5*, *Cox5b*, and *Atp5b* expression (Figure 4Cb). Of note, as compared to controls, tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice had increased expression of the mitochondrial encoded gene *Cox2* (cytochrome c oxidase subunit 2, complex IV), suggesting an increase in mitochondria number (Figure 4Ca). Reciprocally, the expression of *Cox2* was diminished in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} tumors compared to control specimen (Figure 4Cb).

Taken together, these data suggest that MMP11 overexpression confers an advantage for cancer cells to promote their growth through a metabolic reprogramming involving an increase in aerobic glycolysis, a decrease in mitochondrial respiration, and an increase in lipid turnover.

2.6. MMP11 Increases Endoplasmic Reticulum Stress Response and Alters Mitochondrial Unfolded Protein Response (UPR^{mt})

Protein homeostasis or proteostasis is supported by a coordinated regulation of polypeptide production, folding, trafficking, and degradation when unfolded or misfolded proteins accumulate within the cell. The endoplasmic reticulum (ER) ensures proper folding and processing of proteins that will be secreted and hence is a guarantor of proteostasis [27,28]. In immune and metabolic cells, but also following the exposure of cells to a variety of stressors, proteostasis is disrupted and an ER unfolded protein response (UPR^{ER}) is triggered off to restore protein homeostasis [28,29]. In our study, we studied the impact of MMP11 on ER stress and the UPR^{ER} in tumor samples from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice and their respective controls. Interestingly, PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} tumors have an increase in the phosphorylation of the α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α), a target of the protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK), and an important sensor of ER stress [28] (Figure 5Aa). Expression of UPR^{ER} driver genes such as X-box binding protein (*Xbp1*), activating transcription factor 4 (*Atf4*), and activating transcription factor 6 (*Atf6*) were increased in tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} controls (Figure 5Ba). Conversely, eIF2 α phosphorylation (Figure 5Ab) and expression of *Xbp1*, *Atf4*, and *Atf6* were decreased in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} tumors as compared to controls (Figure 5Bb).

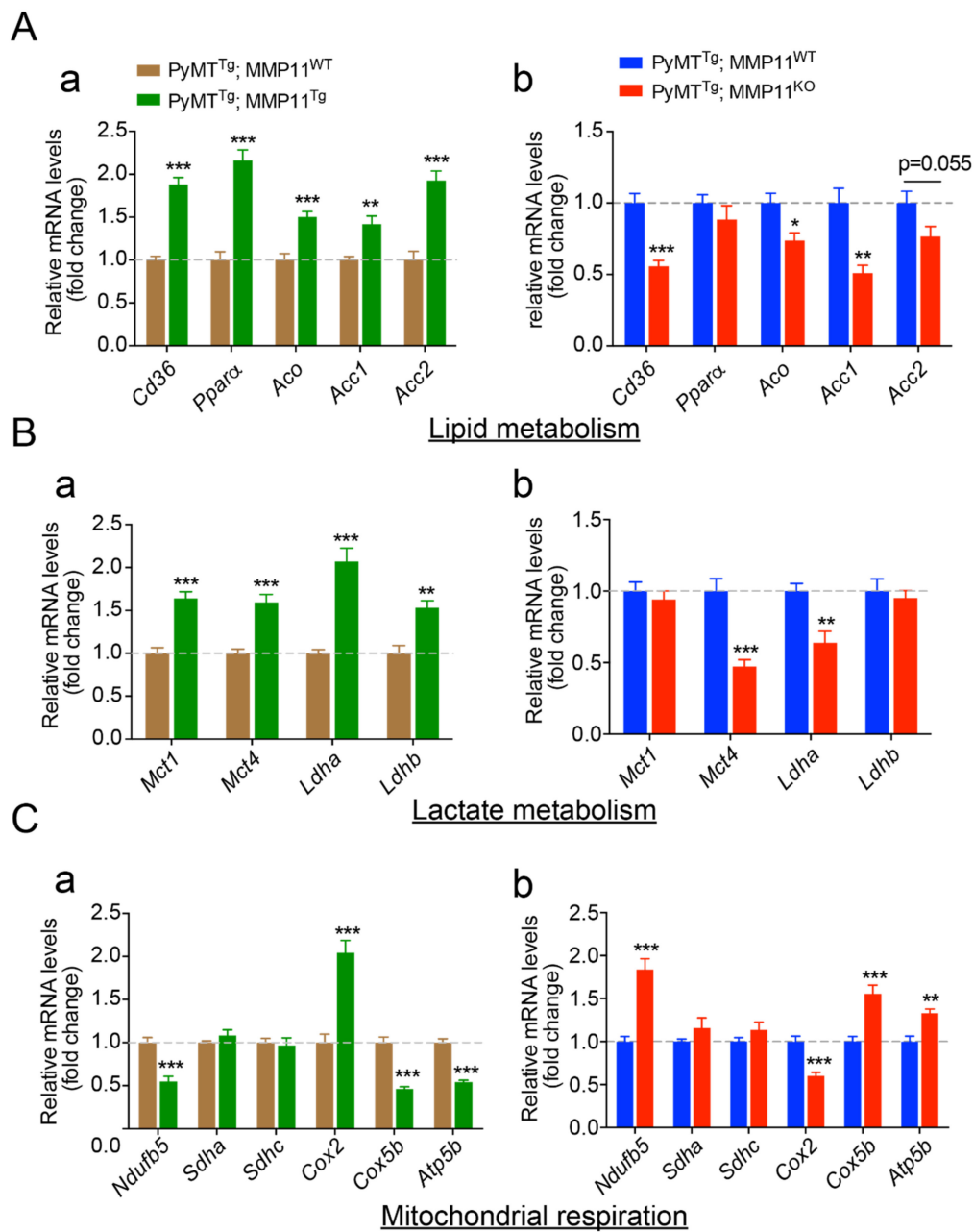


Figure 4. MMP11 promotes mammary gland tumor metabolic switch and lipid utilization. RT-qPCR transcripts of genes involved in (A) lipid metabolism, (B) lactate metabolism, and (C) mitochondrial respiration in tumor extracts from both gain-of-function (GOF) (PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg}, (a) left panels) mice and loss-of-function (LOF) (PyMT^{Tg}; MMP11^{KO}, (b) right panels) mice models. Data are presented as fold changes to control. N = 6–8 mice/group, data are presented as mean ± SEM, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001 (unpaired *t*-test).

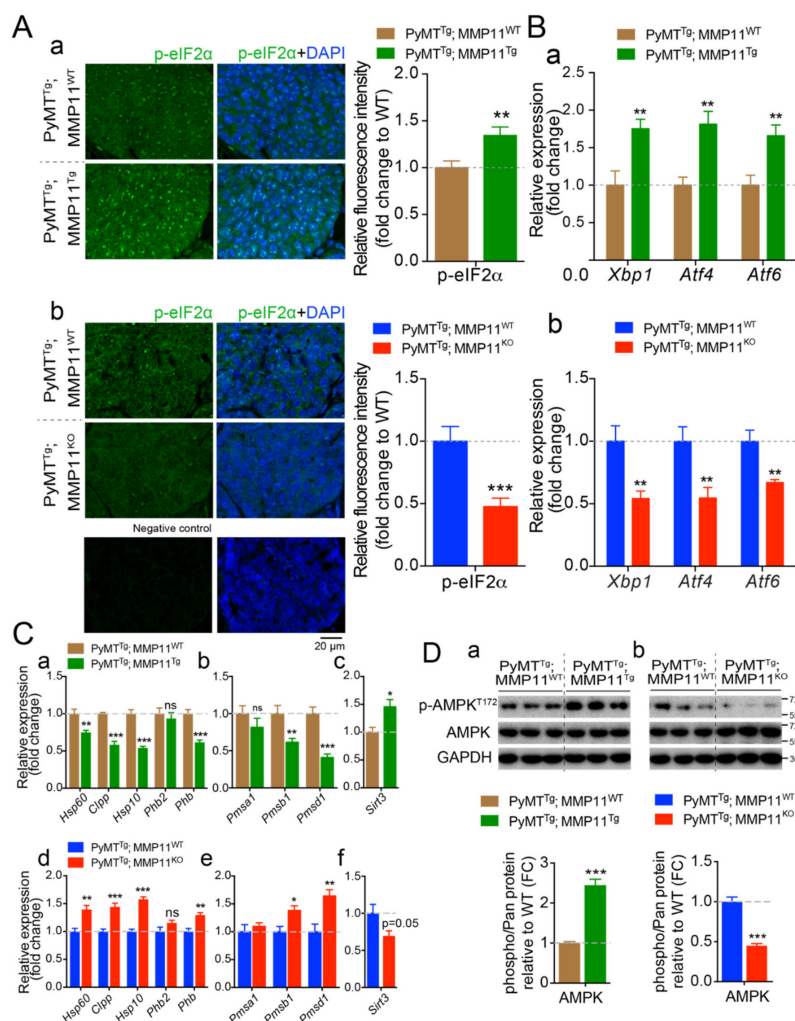


Figure 5. MMP11 promotes tumor cellular endoplasmic reticulum (ER) stress response (UPR^{ER}) and alters mitochondrial UPR (UPR^{mt}) in mammary gland tumors. (A) (a) Confocal images of tumor sections were stained using an anti-phosphorylated α subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) (p-eIF2 α) antibody, from 12-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and control age-matched mice; (b) Confocal images of tumor sections stained with anti-p-eIF2 α from 14-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} and control; a control staining without primary antibody is shown below; (a,b) relative image quantification are presented as histograms in the right; (B) (a) RT-qPCR analysis of genes implicated in UPR^{ER} in tumors from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice compared to tumors from control mice; (b) and in tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice compared to controls; (C) (a–c) Expression profile of genes implicated in the three arms of the UPR^{mt} in tumor samples from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice compared to controls; (d–f) Expression profile of genes implicated in the three arms of the UPR^{mt} in tumor samples from 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice compared to controls; (D) Western blot analysis of phosphorylated AMP-activated kinase (AMPK) (pAMPK^{T172}) in tumors from (a) 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and (b) 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice, respectively, as compared to their controls. Quantification of the ratios of pAMPK/AMPK is presented below the blots, normalized to GAPDH expression. Data are presented as fold changes. N = 6–8 mice/group, data are presented as mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired t -test).

Similarly to the ER, the mitochondrion is an organelle that possesses a unique protein folding quality control, named the mitochondrial unfolded protein response or UPR^{mt}, that in response to stress ensures, through mitochondrial-nuclear communication, proper folding of imported proteins from the cytosol [30]. Indeed, when misfolded proteins accumulate in mitochondria or in case of dysfunctional mitochondria, the UPR^{mt} is activated. Previous studies showed that in cancer,

the UPR^{mt} could play an important role to adapt to stress and maintain mitochondria integrity when oxidative stress rises (reviewed in Reference [31]). The three main branches/axes of the UPR^{mt} are the CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)/Heat Shock Protein (HSP)/protease caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit (ClpP), the ER α /NRF1/proteasome and the SIRT3/FoxO3a/superoxide dismutase 2 (SOD2) arms [31]. Here, an alteration of the CHOP/HSP/ClpP pathway was found in tumors from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} age-matched animals. Hence, expression levels of the genes in this pathway such as mitochondrial heat shock protein genes *Hsp60* and *Hsp10* were significantly decreased as well as those of the mitochondrial protease caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit (*Clpp*) and of the prohibitin (*Phb*), a sensor of mitochondria stress and a promoter of longevity [32] (Figure 5Ca). Since misfolded proteins are targeted for degradation by the ubiquitin-proteasome system (UPS), we studied whether the abnormal UPR^{mt} is accompanied by a normal elimination of misfolded proteins. Interestingly, MMP11 overexpression in the PyMT cancer model led to an abnormal proteasomal activity as shown by decreased expression of genes encoding the proteasomal subunits *Psmb1* and *Psmc1* in 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to control animals (Figure 5Cb), suggesting that an accumulation of misfolded proteins could be responsible for the impaired mitochondrial function. Given that transcripts of the CHOP and proteasome arms were decreased, we analyzed the expression of *Sirt3*, a gene encoding a NAD⁺-dependent deacetylase, representing the third arm of the UPR^{mt}. Interestingly, we noted an increase in the expression of *Sirt3* in tumors from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to controls (Figure 5Cc). Consistently, the opposite phenomenon was observed in tumors from 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice. They had an increased UPR^{mt} response with enhanced expression of *Hsp60*, *Hsp10*, and *Clpp* (Figure 5Cd), enhanced proteasomal activity with increased expression of *Psmb1* and *Psmc1* (Figure 5Ce), and decreased expression of *Sirt3* in comparison to control tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} animals (Figure 5Cf).

Previous reports demonstrated that mitochondrial dysfunction induced by electron transport chain (ETC) perturbations and reactive oxygen species (ROS) generation inhibits proteasomal activity through proteasome disassembly in different organisms including mammalian cells [33,34]. Since alterations in ETC leads to decreased ATP production [35] and that the UPS relies on ATP for its function, we tested whether MMP11-induced AMP-activated kinase (AMPK) activation was implicated in this process. Interestingly, we observed a significant increase in AMPK phosphorylation at threonine 172 residue in tumors from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to their controls (Figure 5Da and Figure S5). Consistently, tumors from 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice had a significant decrease in AMPK activity compared to control animals (Figure 5Db and Figure S5).

Overall, MMP11 exacerbates endoplasmic reticulum stress, alters the mitochondrial UPR, and impairs proteasome activity that might be caused by increased oxidative stress, contributing thereby in energy depletion and activation of AMPK. Reduction of AMPK activity agrees with the tumor phenotype and the high energy demand necessary for tumor growth.

2.7. MMP11 Induces a Change in Tumor Metabolomic Profile in Mice

To study the impact of MMP11 on tumor metabolism, we used high resonance magic angle spinning (HRMAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to assess the metabolomic profile of tumor samples from 6-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and 10-week-old PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice as compared to their respective controls. Network analysis of the metabolomic profile of tumors using the algorithm to determine the expected metabolite level alterations (ADEMA) showed differences between PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice compared with their respective controls. ADEMA allows the evaluation of changes in the concentration of an ensemble of metabolites between two experimental groups instead of analyzing the concentration of individual metabolites [36]. This analysis revealed that MMP11 overexpression in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} tumor samples is associated with a significant predicted decrease in ascorbate, glycerophosphocholine (GPcholine), phosphocholine (PCholine), and taurine with a predicted increase in lactate, glycine, glutamate, glutamine, creatine, and the

amino acids alanine, valine, phenylalanine, tyrosine, and isoleucine as well as acetate as compared to control samples (Figure 6A). MMP11 deficiency in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} tumors was accompanied by a predicted decrease in GPcholine, Pcholine, choline, ethanolamine, taurine, ascorbate, and acetate as well as lactate, creatine, glycine, alanine, valine, phenylalanine, tyrosine, and glutamate, while glutamine is predicted to increase in comparison to tumors from control animals (Figure 6B).

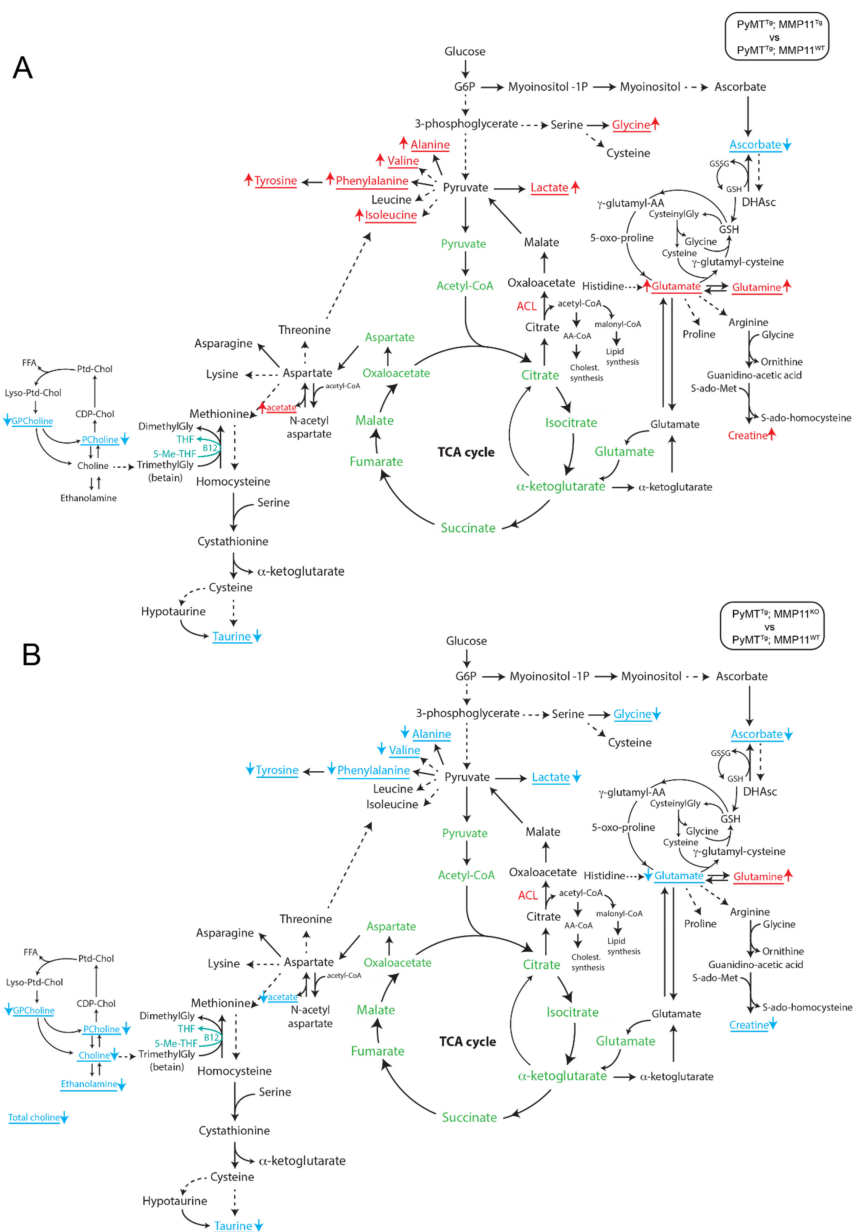


Figure 6. Results of the algorithm to determine the expected metabolite level alterations (ADEMA) network analysis of NMR high resonance magic angle spinning (HRMAS) metabolomics profile of mammary gland tumors in mice: (A) between PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} controls and (B) between PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} compared to PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} controls. The metabolites underlined and written with an arrow for each one indicate the metabolites that are predicted to increase and decrease in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} (A) or PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} (B). The metabolites in green are present in the mitochondria. GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; DHAsc: dehydroascorbate; g-glutamyl-AA: g-glutamyl-amino acid; Gly: glycine; ACL: ATP citrate lyase; AA-CoA: acetoacetyl-CoA.

The changes observed in the metabolomic profile of tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice evoke aggressiveness. Notably, lactate, a well-recognized feature of cancer cells as described by Warburg's work, is predicted to increase, so is glutamate suggestive of increased glutaminolysis, a feature of highly proliferative cancer cells [21]. In PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice, we observed a reciprocal phenomenon with a prediction to decrease in lactate levels suggestive of mitigation of aerobic glycolysis when MMP11 is absent. Another example is the MMP11-mediated prediction to increase in glycine, a metabolite produced from serine by a branch of aerobic glycolysis, which provides carbon units for one-carbon metabolism. Amplification of this pathway has been associated with increased tumorigenesis in breast cancer [37–39].

Altogether, these results show that the presence of MMP11 is associated with a metabolomic signature favoring tumor growth.

3. Discussion

We showed previously that MMP11 functions in the regulation of whole-body metabolism through activation of the IGF1/AKT/FoxO1 signaling cascade in a non-cancer context using gain- and loss-of-function genetic-engineered mice models [12]. In this study, we show that in the MMTV-PyMT model, early mammary gland tumor incidence and growth are accelerated and delayed in the presence and in the absence of MMP11, respectively. Given that MMP11 is implicated in normal post-natal development of the mammary gland through a paracrine mechanism [40] the observed phenotypes may be, at least in part, linked to this developmental function. Nevertheless, the present study brings new insights into the role of MMP11 during cancer development in the spontaneous genetic MMTV-PyMT breast cancer mouse model. Hence, we report that in the presence of MMP11 the IGF1/AKT signaling pathway that is achieved through a decrease of IGFBP1 protein levels. MMP11 promotes tumor cell survival and significantly increases cell proliferation in tumor samples from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to control PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} animals, thereby accelerating tumor growth. Reciprocally, MMP11 deficiency results in a mirror phenotype and delayed tumor growth. In the presence of MMP11, the Warburg-like effect is increased in tumor samples through a metabolic reprogramming. Oxidative phosphorylation and aerobic glycolysis are reduced and increased, respectively, most likely through the IGF1/AKT/FoxO1 cascade. Besides lactate utilization, in the presence of MMP11 lipid turnover is increased (e.g., synthesis, transport, and metabolism) to serve as an additional nutrient source to fulfill tumor energetic needs allowing new membrane formation and expansion [41]. Interestingly, the presence of MMP11 correlates with ER stress through the significant elevation in the expression of *Atf4*, *Atf6*, and *Xbp1*, key components of the UPR^{ER} [28]. The increase in the phosphorylation of eIF2 α , an upstream inducer of ATF4 and downstream effector of the ER stress-mediated kinase PERK [28], provides an additional evidence about the role of MMP11 in UPR^{ER}. There is compelling evidence that UPR^{ER} is involved in tumorigenesis, more specifically in HER2-positive breast cancer [42], and hence constitutes an attractive target for anticancer treatment [43]. Likewise, the hypoxic environment of the tumors has a dual supportive role in cancer. On one hand, it stimulates the inositol requiring enzyme 1 α (IRE1) and PERK branches of the UPR^{ER} to enhance the insensitivity of cancer cells to apoptosis [44]. On the other hand, hypoxic stress in cancer stimulates the inositol requiring enzyme 1 α (IRE1)/XBP1 arm of the UPR to blunt immune elimination of cancer cells, by decreasing the expression of major histocompatibility complex 1 (MHC1) molecules in antigen-presenting dendritic cells, thereby weakening the function of CD8⁺ lymphocytes to kill cancer cells [45]. Another aspect of MMP11 role in mediating cancer progression is the altered mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}) observed in tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as demonstrated by the decreased expression of important proteins of the UPR^{mt} such as the chaperone proteins HSP10 and HSP60 or the mitochondrial protease CLPP, which role is to eliminate misfolded or unfolded proteins in the mitochondrial matrix. This axis of the UPR^{mt} is referred as the CHOP pathway [46]. These results are surprising, in the sense that tumor aggressiveness is often associated with mitochondria fitness and adaptation to stress. One possibility is that other axes of the UPR^{mt} may be activated. We measured the transcripts of proteasome components

and *Sirt3*, the 2 other branches of the UPR^{mt} [31]. We found a decrease in *Pmsb1* and *Pmsd1* expression in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and an increase of their expression in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} as compared to their respective controls; however, *Sirt3* expression was significantly increased in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice as compared to controls and decreased *Sirt3* in PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} tumors. Interestingly, the SIRT3 axis of UPR^{mt} was shown to induce the antioxidant proteins superoxide dismutase 2 (SOD2) and catalase, and the subsequent elimination of irreversibly damaged mitochondria through mitophagy [47]. The SIRT3 arm molecular signature of the UPR^{mt} was recently shown to contribute to breast cancer invasiveness and may be an essential mechanism for cancer cells to adapt to proteotoxic and mitochondrial stress, a process called mitohormesis [48].

Another observation that we present is that the presence of MMP11 is associated with a decrease in the expression of the proteasome subunits *Psmb1* and *Psmd1* and may result in decreased proteasome activity. Mitochondrial dysfunction produced by impaired ETC and ROS generation was shown to inhibit proteasome activity [33,34] because of ATP depletion, ATP being crucial for proteasome assembly. Moreover, we observed a significant increase in AMPK phosphorylation, a kinase induced upon nutrient deprivation. It is tempting to speculate that non-degraded stressed mitochondria may amplify the proteotoxic and mitochondrial stress contributing further to ATP-depletion and increase in AMPK activation, a known activator of autophagy [49]. To give weight to this hypothesis, a recent report has shown that accumulation of ubiquitin-protein conjugates was correlated with decrease in cellular bioenergetics and increase in AMPK activation and autophagy [50]. Autophagy is the process by which the cell recycles the constituents of irreversibly damaged organelles to generate energy and recover precursors necessary for cell growth. This hypothesis and the occurrence of autophagy need to be verified in our model.

Finally, metabolomics analyses of tumor samples from our two mouse models (GOF and LOF) reveal a significant change in metabolite profile as compared to their respective controls. Hence, the increase in lactate production and glutamine metabolism are associated with increased tumorigenesis and tumor aggressiveness [21]. Lactate can be used as an extra nutrient to fuel cancer cells with a supplementary source of energy and glutamate formed from glutamine can be transformed to α -ketoglutarate that will feed the tricarboxylic cycle to generate energy in the mitochondria. Moreover, besides activation of lactate and glutamine metabolism in the tumors of PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice, we observe an increase in serine metabolism as shown by the predicted increase in glycine levels. This metabolism is a diverted branch of aerobic glycolysis, known as the phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) pathway, which aims to promote nucleotide synthesis. Interestingly, PHGDH overexpression is associated with certain breast subtypes, and reduction of PHGDH reduced breast tumors growth, while ectopic PHGDH expression in mammary epithelial cells induced phenotypic alterations that may predispose cells to transformation [37,38]. Thus, PHGDH could be a metabolic target of MMP11 in tumors. Finally, elevation of the non-essential amino acid alanine observed in PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} tumors has been recently associated with increased breast tumorigenesis through alanine aminotransferase (ALAT)-mediated transformation of pyruvate to α -ketoglutarate, which is important to shape metastatic niche in breast cancer [51]. Altogether, MMP11 stands as an important metabolic regulator both in physiological energy homeostasis and in the context of breast cancer (BC). In the PyMT model, MMP11 influences tumor growth and metabolism, whether its catalytic activity is required for these functions remains uncertain. The protein is predominantly present under its catalytically inactive pro-form in the skin of the GOF model. Therefore, one can hypothesize that MMP11 acts independently from its catalytic activity, for example, as a signaling molecule or by interfering with the protease/inhibitor network. Nevertheless, pharmacological targeting of this protein using either antisense oligonucleotides, CRISPR-Cas9 technology or monoclonal antibodies directed against MMP11 may prove efficient to impede rapid cancer progression by acting on multiple biological processes such as proliferation, apoptosis, metabolism, and organelle unfolded protein responses.

4. Material and Methods

4.1. Generation of Mice Cohorts

This study was approved by the Ethical Committee (IGBMC and ICS ComEth, 2014-0039 and 2014-0122). In the GOF model, MMTV-PyMT^{Tg} male mice (FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J) were obtained from The Jackson Laboratory and crossed with K14-MMP11^{Tg} female mice (FVB/N background). The first mice generation were genotyped. In the LOF model, MMTV-PyMT^{Tg} male mice (FVB/N background) were crossed with MMP11^{KO} female mice (129/SvJ background). The first mice generation was genotyped. Then, PyMT^{Tg}; MMP11 ^{-/+} male mice were crossed with PyMT^{WT}; MMP11 ^{-/+} females and their offspring mice generation were genotyped. Age-matched PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} and PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} female mice, on one hand, and age-matched PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} female mice were randomly divided and used for experiments. Each group in different experimental cohorts contains 6–8 mice.

4.2. Mice Genotyping

The genotyping of the PyMT transgene was performed by standard PCR as recommended by the Jackson Laboratory. In brief, PCR reaction from mouse tail DNA was carried out as follows: 94 °C for 30 s, 64 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, 35 cycles. Likewise, K14-MMP11 genotyping was done by standard PCR reaction using tail DNA: 94 °C for 1 min, 60 °C for 20 s, 72 °C for 1 min, 33 cycles; MMP11 KO/WT gene PCR reaction: 94 °C for 15 s, 62 °C for 15 s, 72 °C for 1 min, 33 cycles. Primers used for genotyping are listed in Table S1.

4.3. Mice Weight and Tumor Measurement

Mice weight was measured by electronic balance twice a week. Caliper was used to measure the tumor length, width, and height twice a week. Tumor volume was calculated following the formula $(4/3) \times 3.14159 \times (\text{length}/2) \times (\text{width}/2) \times (\text{height}/2)$.

4.4. Carmine-Alum Red Staining

The #4 mammary glands were spread onto glass slides and fixed in Carnoy's solution (75% glacial acetic acid, 25% absolute EtOH) overnight. A sequential rehydration in 2 steps (100% EtOH and 70% EtOH) of one hour each was followed by 30 min in distilled water. Then, carmine-alum (Sigma-Aldrich, C1022, St-Quentin Fallavier, France) staining solution was added overnight. Dehydration was done in a stepwise incubation in 70% EtOH, 95% EtOH, and 100% EtOH for 1 h each step. The slides were fixed in Histosol overnight and mounted with Permount.

4.5. HE Staining

Paraffin-embedded #4 mammary gland tumor tissue slides were immersed into 100% Histosol for 2 times, 5 min each. Then, slides were sequentially washed in 100%, 90%, 80% ethanol and H₂O for 5 min each before being placed in Harris Hematoxylin staining solution for 3 min. Slides were washed in acid alcohol for 2 s, in running tap water for 3 min. Next, they were stained for 30 s in 0.1% aqueous eosin Y, rinsed in tap water for 30 s, dehydrated in 80%, 90%, 100% ethanol for 5 min each, fixed by two washes of 100% histosol, 5 min each and mounted with Permount.

4.6. TUNEL Assay

For this assay, we used the TUNEL kit from Abcam company (#ab206386, 75010 Paris, France). Paraffin-embedded tumor tissue slides were treated as recommended by the user guide booklet. Slides were mounted using Histosol mounting media.

4.7. Immunofluorescent Staining

Paraffin-embedded #4 mammary gland tumor tissue slides were immersed into 100% HistoSol for 2 times, 5 min each, followed by 100%, 90%, 80% ethanol and H₂O for 5 min each. Tissue specimens were rinsed 1 time in phosphate-buffered saline (PBS) 1×. Antigen unmasking was performed by incubation at 95 °C in Tris-EDTA buffer for 20 min. Permeabilization was done in PBS 1× containing 0.1% Triton X-100 for 1 h. Blocking in bovine serum albumin (BSA) 5% for 1 h. The primary antibody (Rabbit anti-Ki67, Bethyl IHC-00375, 1:500; Rabbit anti-p-eIF2 α , #3597s, 1:500, CST) was incubated in BSA 5% at 4 °C for overnight. The slides were rinsed 3 times in PBS 1×, 5 min each and incubated with secondary antibodies in PBS 1× for 2 h. Nuclei were stained with Hoechst dye diluted in PBS 1× for 10 min, washed with PBS 1× for 2 times, 5 min each. Coverslip was mounted with Prolong Gold antifade. Images were taken using an inverted laser confocal fluorescence microscopy. Primary and secondary antibodies for immunofluorescence staining are listed in Table S2 in the supporting information file attached to the manuscript.

4.8. Western Blot

Mice tumor tissues were taken from #1 mammary gland and protein extracts were obtained by tissue grinding in RIPA lysis buffer. Protein concentrations were quantified by the BiCinchoninic acid Assay (BCA) method. Protein extracts were separated on a 12% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated with primary antibodies (Rabbit anti-Bcl2, 1:500, Abcam, ab59348; Rabbit anti-IGFBP1, 1:1000, Abcam, ab181141; Rabbit anti-GAPDH, 1: 5000, Sigma-Aldrich, G9545; Rabbit anti-pAKT, 1:1000, Cell Signaling Technology (CST), #4060; Rabbit anti-AKT, 1:1000, CST, #9272; Rabbit anti-pFoxO1, 1:1000, CST, #9461; Rabbit anti-FoxO1, 1:1000, CST, #2880; Rabbit anti-pAMPK, 1:1000, CST #2535; Rabbit anti-pAMPK, 1:1000, CST #2532; Rabbit monoclonal anti-MMP11, IGBMC#3143). Primary and secondary antibodies as well as the quantification method are detailed in the supporting information file attached to the manuscript (Table S3). Uncropped western blots are shown in supplementary Figures S3–S5.

4.9. RT-qPCR

Frozen mice tumor tissues from #1 mammary gland were homogenized in Trizol[®] reagent (Sigma-Aldrich, T9424, St-Quentin Fallavier, France) and total RNA were extracted and reverse transcribed using SuperScript[®] IV Reverse transcriptase kit (Invitrogen by Life technologies, kit #18090050, Paisley, UK) following the manufacturer's recommendations. Normalized gene expression levels were quantified by real-time quantitative RT-PCR using SYBR[®] Green JumpStart[™] Taq ReadyMix[™] (kit #S4438, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) and specific primers listed in Table S4.

4.10. HRMAS NMR Metabolomics Analysis

For all PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice and their respective PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} controls, the tumors were extracted, snap frozen, and stored at −80 °C until analysis. Tumor samples (mass between 12 and 20 mg) were prepared at −20 °C and introduced into a disposable 25 μ L Kelf insert. HRMAS NMR spectra were acquired on a Bruker (Karlsruhe, Germany) Avance III 500 spectrometer operating at a proton frequency of 500.13 MHz and equipped with a 4-mm triple-resonance gradient HRMAS probe (¹H, ¹³C, and ³¹P). The temperature was maintained at 4 °C throughout the acquisition time in order to reduce the effects of tissue degradation during the spectrum acquisition. A one-dimensional (1D) proton spectrum using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence was acquired with a 285- μ s inter-pulse delay and a 10-min acquisition time for each tissue sample. The number of loops was set at 328, giving the CPMG pulse train a total length of 93 ms. Spectra were normalized according to each sample weight and calibrated using the internal intensity of a reference solution containing a known amount of lactate. The peaks of interest were integrated using a routine

developed under MATLAB (MATLAB 7.0; Mathworks, Natick, MA, USA). Quantification results were expressed as nmol/mg of tissue.

The algorithm to determine the expected metabolite level alterations (ADEMA) network analyses using mutual information was applied to the metabolite quantification values [36]. ADEMA includes information on the metabolic pathway in a unidirectional or bidirectional manner. The network was constructed using Salway's work [52]. Using the metabolic network topology, the ADEMA algorithm evaluates the change in groups of metabolites between concentration data from two experimental groups instead of analyzing metabolite concentrations one by one. Based on mutual information, the algorithm determines whether some metabolites are biomarkers when considered together, and it can predict the direction of the expected change per metabolite depending on the metabolic network topology considered.

4.11. Data Analysis

The quantification of hyperplasia and neoplastic lesions area, tumor necrosis area, TUNEL staining cells, Ki-67 staining cells, *p*-eIF2 α relative intensity, and Western blot were performed by Image J 1.51n. Statistical analysis was performed by Graphpad Prism 6.

5. Conclusions

In conclusion, we report that MMP11 inhibits cell death and promotes tumor growth by activating the IGF1/AKT/FoxO1 pathway in the MMTV-PyMT mouse model of mammary gland tumor. Expression of MMP11 is regulating important metabolic pathways such as the metabolic reprogramming from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis, and adaptive organelle processes following proteotoxic stress such as the UPR^{ER} and UPR^{mt}. These pathways enable cancer cells to cope with nutrient availability, allowing them to survive in harsh conditions such as the presence of ROS.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/9/2357/s1>, Figure S1: Generation of PyMT^{Tg}; Mmp11^{Tg} and PyMT^{Tg}; Mmp11^{KO} animals and their respective controls., Tumor development in MG #4 and MG #5 and MMP11 expression in the skin of Mmp11^{Tg}, Figure S2: MMP11 expression in the skin of MMP11Tg and tumor development in MG #4 and MG #5, Figure S3: Uncropped blots from Figure 2C, Figure S4: Uncropped blots from Figure 3B, Figure S5: Uncropped blots from Figure 5D, Table S1: List of primers used to amplify genomic DNA extracted from tails of PyMT^{Tg}; Mmp11^{Tg} and PyMT^{Tg}; Mmp11^{KO} animals and their control littermates, Table S2: List of antibodies used for immunofluorescence on paraffin-embedded tumor tissue, Table S3: List of antibodies used for immunoblots, Table S4: List of primers used for qRT-PCR quantification of gene expression.

Author Contributions: Conceptualization, C.T. and N.D.-Y.; data curation, B.T., A.J., H.O., and C.W.; formal analysis, B.T., A.J., C.B., H.O., C.W., M.-P.C., F.A., A.E.C., I.J.N., C.T., and N.D.-Y.; funding acquisition, C.T.; investigation, B.T., A.J., C.B., H.O., A.E.C., I.J.N., C.T., and N.D.-Y.; methodology, B.T., A.J., F.A., A.E.C., C.T., and N.D.-Y.; project administration, C.T.; supervision, C.T. and N.D.-Y.; validation, I.J.N., C.T., and N.D.-Y.; writing—Original draft, N.D.-Y.; writing—Review and editing, C.T. and N.D.-Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ligue Contre le Cancer (Conférence de Coordination Interrégionale du Grand Est, 2017, 2018) and the Fonds Régional de Coopération pour la Recherche (Grand Est-Alsace Champagne-Ardenne Lorraine) project Pathological Obesity and Metabolic Aging (OMAGE, grant number: 18P09327). We also acknowledge funds from the Institut National de Santé et de Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université de Strasbourg, and French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche (grant numbers: ANR-10-LABX-0030-INRT and ANR-10-IDEX-0002-02).

Acknowledgments: We would like to thank Marie-Christine Rio, Carole Mathelin, and the members of the Molecular and Cellular Biology of Breast Cancer team (IGBMC) for helpful advice and discussions. We thank the IGBMC mouse facility and the imaging center for their excellent technical assistance. B.T. and A.J. were awarded scholarships from the China Research Council (CRC, China; www.chinesescholarshipcouncil.com/) and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France; www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/), respectively.

Conflicts of Interest: The authors have no competing financial interests to disclose.

References

1. Polyak, K.; Metzger Filho, O. SnapShot: Breast cancer. *Cancer Cell* **2012**, *22*, 562–562.e1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Martins, D.; Schmitt, F. Microenvironment in breast tumorigenesis: Friend or foe? *Histol. Histopathol.* **2019**, *34*, 13–24. [[PubMed](#)]
3. Rio, M.-C.; Dali-Youcef, N.; Tomasetto, C. Local adipocyte cancer cell paracrine loop: Can “sick fat” be more detrimental? *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *21*, 43–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lee, J.; Lee, J.; Kim, J.H. Identification of Matrix Metalloproteinase 11 as a Prognostic Biomarker in Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 5963–5971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chenard, M.P.; O’Siorain, L.; Shering, S.; Rouyer, N.; Lutz, Y.; Wolf, C.; Basset, P.; Bellocq, J.P.; Duffy, M.J. High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *Int. J. Cancer* **1996**, *69*, 448–451. [[CrossRef](#)]
6. Rouyer, N.; Wolf, C.; Chenard, M.P.; Rio, M.C.; Chambon, P.; Bellocq, J.P.; Basset, P. Stromelysin-3 gene expression in human cancer: An overview. *Invasion Metastasis* **1994**, *14*, 269–275.
7. Basset, P.; Bellocq, J.P.; Wolf, C.; Stoll, I.; Hutin, P.; Limacher, J.M.; Podhajcer, O.L.; Chenard, M.P.; Rio, M.C.; Chambon, P. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* **1990**, *348*, 699–704. [[CrossRef](#)]
8. Andarawewa, K.L.; Motrescu, E.R.; Chenard, M.P.; Gansmuller, A.; Stoll, I.; Tomasetto, C.; Rio, M.C. Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 10862–10871. [[CrossRef](#)]
9. Eiro, N.; Cid, S.; Fernández, B.; Fraile, M.; Cernea, A.; Sánchez, R.; Andicoechea, A.; DeAndrés Galiana, E.J.; González, L.O.; Fernández-Muñiz, Z.; et al. MMP11 expression in intratumoral inflammatory cells in breast cancer. *Histopathology* **2019**, *75*, 916–930. [[CrossRef](#)]
10. Lijnen, H.R.; Van, H.B.; Frederix, L.; Rio, M.C.; Collen, D. Adipocyte hypertrophy in stromelysin-3 deficient mice with nutritionally induced obesity. *Thromb. Haemost.* **2002**, *87*, 530–535.
11. Motrescu, E.R.; Blaise, S.; Etique, N.; Messaddeq, N.; Chenard, M.P.; Stoll, I.; Tomasetto, C.; Rio, M.C. Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* **2008**, *27*, 6347–6355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Dali-Youcef, N.; Hnia, K.; Blaise, S.; Messaddeq, N.; Blanc, S.; Postic, C.; Valet, P.; Tomasetto, C.; Rio, M.-C. Matrix metalloproteinase 11 protects from diabetes and promotes metabolic switch. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Guy, C.T.; Cardiff, R.D.; Muller, W.J. Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: A transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 954–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lin, E.Y.; Jones, J.G.; Li, P.; Zhu, L.; Whitney, K.D.; Muller, W.J.; Pollard, J.W. Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 2113–2126. [[CrossRef](#)]
15. Fluck, M.M.; Schaffhausen, B.S. Lessons in signaling and tumorigenesis from polyomavirus middle T antigen. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2009**, *73*, 542–563. [[CrossRef](#)]
16. Davie, S.A.; Maglione, J.E.; Manner, C.K.; Young, D.; Cardiff, R.D.; MacLeod, C.L.; Ellies, L.G. Effects of FVB/NJ and C57Bl/6J strain backgrounds on mammary tumor phenotype in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Transgenic Res.* **2007**, *16*, 193–201. [[CrossRef](#)]
17. Scholzen, T.; Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **2000**, *182*, 311–322. [[CrossRef](#)]
18. Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 915–928. [[CrossRef](#)]
19. Manes, S.; Mira, E.; Barbacid, M.D.M.; Cipres, A.; Fernández-Resa, P.; Buesa, J.M.; Merida, I.; Aracil, M.; Márquez, G.; Martínez-A, C. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25706–25712. [[CrossRef](#)]
20. Wheatcroft, S.B.; Kearney, M.T. IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: Implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 153–162. [[CrossRef](#)]
21. Lunt, S.Y.; Vander Heiden, M.G. Aerobic glycolysis: Meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2011**, *27*, 441–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Glatz, J.F.C.; Luiken, J.J.F.P. From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. *Biochimie* **2017**, *136*, 21–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wakil, S.J.; Abu-Elheiga, L.A. Fatty acid metabolism: Target for metabolic syndrome. *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S138–S143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Keller, H.; Mahfoudi, A.; Dreyer, C.; Hihi, A.K.; Medin, J.; Ozato, K.; Wahli, W. Peroxisome proliferator-activated receptors and lipid metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *684*, 157–173. [[CrossRef](#)]
25. Pinheiro, C.; Longatto-Filho, A.; Azevedo-Silva, J.; Casal, M.; Schmitt, F.C.; Baltazar, F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: State of the art. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2012**, *44*, 127–139. [[CrossRef](#)]
26. Kennedy, K.M.; Dewhirst, M.W. Tumor metabolism of lactate: The influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol.* **2009**, *6*, 127–148. [[CrossRef](#)]
27. Powers, E.T.; Morimoto, R.I.; Dillin, A.; Kelly, J.W.; Balch, W.E. Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 959–991. [[CrossRef](#)]
28. Frakes, A.E.; Dillin, A. The UPR^{ER}: Sensor and Coordinator of Organismal Homeostasis. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 761–771. [[CrossRef](#)]
29. Wang, M.; Kaufman, R.J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* **2016**, *529*, 326–335. [[CrossRef](#)]
30. Jovaisaite, V.; Mouchiroud, L.; Auwerx, J. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J. Exp. Biol.* **2014**, *217*, 137–143. [[CrossRef](#)]
31. Kenny, T.C.; Manfredi, G.; Germain, D. The Mitochondrial Unfolded Protein Response as a Non-Oncogene Addiction to Support Adaptation to Stress during Transformation in Cancer and Beyond. *Front. Oncol.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jovaisaite, V.; Auwerx, J. The mitochondrial unfolded protein response-synchronizing genomes. *Curr Opin Cell Biol* **2015**, *33*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Livnat-Levanon, N.; Kevei, É.; Kleifeld, O.; Krutauz, D.; Segref, A.; Rinaldi, T.; Erpapazoglou, Z.; Cohen, M.; Reis, N.; Hoppe, T.; et al. Reversible 26S proteasome disassembly upon mitochondrial stress. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1371–1380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Segref, A.; Kevei, É.; Pokrzywa, W.; Schmeisser, K.; Mansfeld, J.; Livnat-Levanon, N.; Ensenaer, R.; Glickman, M.H.; Ristow, M.; Hoppe, T. Pathogenesis of human mitochondrial diseases is modulated by reduced activity of the ubiquitin/proteasome system. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 642–652. [[CrossRef](#)]
35. Smeitink, J.A.; Zeviani, M.; Turnbull, D.M.; Jacobs, H.T. Mitochondrial medicine: A metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 9–13. [[CrossRef](#)]
36. Cicek, A.E.; Bederman, I.; Henderson, L.; Drumm, M.L.; Ozsoyoglu, G. ADEMA: An algorithm to determine expected metabolite level alterations using mutual information. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*, e1002859. [[CrossRef](#)]
37. Locasale, J.W.; Grassian, A.R.; Melman, T.; Lyssiotis, C.A.; Mattaini, K.R.; Bass, A.J.; Heffron, G.; Metallo, C.M.; Muranen, T.; Sharfi, H.; et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 869–874. [[CrossRef](#)]
38. Possemato, R.; Marks, K.M.; Shaul, Y.D.; Pacold, M.E.; Kim, D.; Birsoy, K.; Sethumadhavan, S.; Woo, H.-K.; Jang, H.G.; Jha, A.K.; et al. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* **2011**, *476*, 346–350. [[CrossRef](#)]
39. DeBerardinis, R.J. Serine Metabolism: Some Tumors Take the Road Less Traveled. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 285–286. [[CrossRef](#)]
40. Tan, J.; Buache, E.; Alpy, F.; Daguene, E.; Tomasetto, C.L.; Ren, G.S.; Rio, M.C. Stromal matrix metalloproteinase-11 is involved in the mammary gland postnatal development. *Oncogene* **2014**, *33*, 4050–4059. [[CrossRef](#)]
41. Currie, E.; Schulze, A.; Zechner, R.; Walther, T.C.; Farese, R.V. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 153–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kim, J.Y.; Heo, S.-H.; Song, I.H.; Park, I.A.; Kim, Y.-A.; Gong, G.; Lee, H.J. Activation of the PERK-eIF2 α Pathway Is Associated with Tumor-infiltrating Lymphocytes in HER2-Positive Breast Cancer. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 2705–2711. [[PubMed](#)]

43. Shen, K.; Johnson, D.W.; Vesey, D.A.; McGuckin, M.A.; Gobe, G.C. Role of the unfolded protein response in determining the fate of tumor cells and the promise of multi-targeted therapies. *Cell Stress Chaperones* **2018**, *23*, 317–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fels, D.R.; Koumenis, C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 723–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Cubillos-Ruiz, J.R.; Bettigole, S.E.; Glimcher, L.H. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell* **2017**, *168*, 692–706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhao, Q.; Wang, J.; Levichkin, I.V.; Stasinopoulos, S.; Ryan, M.T.; Hoogenraad, N.J. A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* **2002**, *21*, 4411–4419. [[CrossRef](#)]
47. Papa, L.; Germain, D. SirT3 regulates the mitochondrial unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 699–710. [[CrossRef](#)]
48. Kenny, T.C.; Craig, A.J.; Villanueva, A.; Germain, D. Mitohormesis Primes Tumor Invasion and Metastasis. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 2292–2303. [[CrossRef](#)]
49. Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 132–141. [[CrossRef](#)]
50. Jiang, S.; Park, D.W.; Gao, Y.; Ravi, S.; Darley-Usmar, V.; Abraham, E.; Zmijewski, J.W. Participation of proteasome-ubiquitin protein degradation in autophagy and the activation of AMP-activated protein kinase. *Cell. Signal.* **2015**, *27*, 1186–1197. [[CrossRef](#)]
51. Elia, I.; Rossi, M.; Stegen, S.; Broekaert, D.; Doglioni, G.; van Gorsel, M.; Boon, R.; Escalona-Noguero, C.; Torrekens, S.; Verfaillie, C.; et al. Breast cancer cells rely on environmental pyruvate to shape the metastatic niche. *Nature* **2019**, *568*, 117–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Salway, J.G. *Metabolism at a Glance*, 4th ed.; Wiley-Blackwell: Malden, MA, USA, 2016.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials:

Matrix Metalloproteinase-11 Promotes Early Mouse Mammary Gland Tumor Growth through Metabolic Reprogramming and Increased IGF1/AKT/FoxO1 Signaling Pathway, Enhanced ER Stress and Alteration in Mitochondrial UPR

Table S1. List of primers used to amplify genomic DNA extracted from tails of PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} animals and their control littermates.

	Forward	Reverse
PyMT	GGAAGCAAGTACTTCACAAGGG	GGAAAGTCACTAGGAGCAGGG
MMP11 ^{Tg}	CGGTTTCCACCATCCGAGGA	GTGGAAACGCCAATAGTCTCC
MMP11 ^{KO}	GTGGAAACGCCAATAGTCTCC	GCCGCTTTTCTGGATTTCATCG
MMP11 ^{WT}	GTGGAAACGCCAATAGTCTCC	TTCTAACATCCCTCTGGGCTC

Table S2. List of antibodies used for immunofluorescence on paraffin-embedded tumor tissue.

Primary Antibody			
Rabbit anti-Ki67	Bethyl IHC-00375	1:500	TBS 1X + 5% BSA
Rabbit anti-pelF2 α	CST #3597s	1:500	TBS 1x + 3% BSA
Hoescht	Sigma-Aldrich 33258	1:400	TBS 1X
Secondary Antibody			
AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific A21206	1:1000	TBS 1X

Table S3. List of antibodies used for immunoblots.

Primary Antibodies	Reference	dilution	
Rabbit anti-Bcl2	Abcam ab59348	1:500	TBS 1X-Tween 0.1% + 5% BSA
Rabbit anti-IGFBP1	Abcam ab181141	1:1000	
Rabbit anti-p-AKT	CST #4060	1:1000	
Rabbit anti-AKT	CST #9272	1:1000	
Rabbit anti-pFoxO1	CST #9461	1:1000	
Rabbit anti-FoxO1	CST #2880	1:1000	
Rabbit p-AMPK	CST #2535	1:1000	
Rabbit AMPK	CST #2532	1:1000	
Rabbit anti-MMP11	IGBMC N°3142 and 3143	1:500	TBS 1X-Tween 0.1% + 3% milk
Rabbit anti-GAPDH	Sigma G9545	1:5000	TBS 1X-Tween 0.1% + 5%BSA
Secondary Antibodies			
Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG		1:10000	TBST 1X

Western Blot, Detection Method and Quantification

Mice tumor tissues were taken from #1 mammary gland and protein extracts were obtained by tissue grinding in RIPA lysis buffer. Protein concentrations were quantified by the BCA method. Protein extracts were separated on a 12% SDS-PAGE gel and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in TBS 1X-Tween 0.1% and then

incubated with primary antibodies followed by secondary antibody. GAPDH was used as a loading control.

For MMP11 detection in the skin, about 200 mg of tissue sample was frozen in liquid nitrogen and directly ground in 2X Laemmli buffer. Samples were sonicated and centrifuged to eliminate debris. Protein concentration was estimated by western blot analysis and Ponceau S staining. Conditioned media containing active MMP11 was obtained by transfection of PQCXIP-hMMP11 plasmid in HeLa cells and incubating cells in serum-free medium containing 0.05% BSA for 48 hours.

To generate the anti-MMP11 rabbit polyclonal antibodies, a peptide was synthesized (PK78: FYTFRYPLSLSPDDC). Its sequence corresponds to residues 240-253 and to 236-249 for the mouse and human MMP11 protein sequences, respectively. Human and mouse protein sequences are identical in this region. The PK78 peptide was coupled to ovalbumin through an additional cysteine residue at the carboxy-terminal end and injected into two New Zealand rabbits. Two immunoreactive sera (# 3142 and # 3143) were obtained. To gain into specificity, both sera were affinity-purified against the synthetic peptide coupled to Sulfolink coupling gel (Pierce, Rockford, IL) using conditions described by the manufacturer.

Membranes were revealed with the Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare, Life sciences) using Amersham™ ECL™ Start Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Life Sciences, RPN3244).

The quantification of western blot images is performed by Image J 1.51n. Western blot images (.tif file) are converted to 16-bit format. Each band (and background) is circumscribed with rectangular ROIs of the same size, and signal intensity is measured in each ROI. Background values are subtracted to other values. For each specific protein, quantifications were performed on 2 independent western blot images.

Table S4. List of primers used for qRT-PCR quantification of gene expression.

	Forward	Reverse
<i>Cd36</i>	GATGTGGAACCCATAACTGGATTAC	GGTCCCAGTCTCATTTAGCCACAGTA
<i>Ppara</i>	AGGAAGCCGTCTGTGACAT	TTGAAGGAGCTTTGGGAAGA
<i>Aco</i>	CCCAACTGTGACTTCCATT	GGCATGTAACCCGTAGCACT
<i>Acc1</i>	GACAGACTGATCGCAGAGAAAG	TGGAGAGCCCCACACACA
<i>Acc2</i>	CCCAGCCGAGTTTGTCCT	GGCGATGAGCACCTTCTCTA
<i>Ndufb5</i>	CTTCGAACCTCCTGCTCCTT	GGCCTGAAAAGAACTACG
<i>Sdha</i>	GGAACACTCCAAAAACAGACCT	CCACCACTGGGTATTGAGTAGAA
<i>Sdhc</i>	GCTGCGTCTTGCTGAGACA	ATCTCCTCCTTAGCTGTGGTT
<i>Cox2</i>	AATTAGCTCCTTAGTCCTCT	CTTGGTCGGTTTGATGTTAC
<i>Cox5b</i>	AAGTGCATCTGCTTGCTCG	GTCTTCCTTGGTGCCTGAAG
<i>Atp5b</i>	GGTTCATCCTGCCAGAGACTA	AATCCCTCATCGAACTGGACG
<i>Hsp10</i>	CTGACAGGTTCAATCTCTCCAC	AGGTGGCATTATGCTTCCAG
<i>Hsp60</i>	ACAGTCCTTCGCCAGATGAGAC	TGGATTAGCCCCCTTTGCTGA
<i>Clpp</i>	CACACCAAGCAGAGCCTACA	TCCAAGATGCCAAACTCTTG
<i>Phb</i>	TCGGGAAGGAGTTCACAGAG	CAGCCTTTTCCACCACAAAT
<i>Phb2</i>	CAAGGACTTCAGCCTCATCC	GCCACTTGCTTGGCTTCTAC
<i>Mct1</i>	GCATTTCCTCAATCCATCAC	CGGCTGCCGTATTTATTCAC
<i>Mct4</i>	GGTCAGCGTCTTTTCAAGG	CCGTGGTGAGGTAGATCTGG
<i>Ldha</i>	AGACAACTCAAGGGCGAGA	CAGCTTGCACTGTGGACTGT
<i>Ldhb</i>	TAAGCACCGTGTGATTGGAA	AGACTCCTGCCACATTCACC
<i>Xbp1</i>	GGTCTGCTGAGTCCGCAGCAGG	AGGCTTGGTGTATACATGG
<i>Atf4</i>	CCTTCGACCAGTCGGGTTTG	CTGTCCCGGAAAAGGCATCC
<i>Atf6</i>	CTGTGCTGAGGAGACAGCAG	CTTGGGACTTTGAGCCTCTG
<i>Psm1</i>	TGCGTGCGTTTTTGATTTAGAC	CCCTCAGGGCAGGATTCATC
<i>Psm1b</i>	CGTTGAAGGCATAAGGCGAAAA	TTCCACTGCTGCTTACCGAG
<i>Psm1d</i>	GTGATAAAACACTTTCGAGGCCA	TGAATGCAGTCGTGAATGACTT
<i>Sirt3</i>	ACAGTACATGCACGGTCTG	GGGAGGTCCCAAGAATGAGT
<i>Mmp11</i>	ATGTACTGAATGCCCGGAAC	TCGTGCACCTCAGTGAAAGT
<i>Gapdh</i>	ACTGGCATGGCCTTCCGTGTTT	TCTTGCTCAGTGTCTTGCTGG
<i>36b4</i>	AGATTCCGGGATATGCTGTTGG	AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC

A

pBluescript KR MMTV-LTR PyMT cDNA Sv40 polyA

Sal I Spe I

Cross

8.2kb

B

6.3kb

0.7kb

C

2.4kb

D

+/+ +/- -/-

8.2

2.4

1 2 3

β -globulin intron

K14 promoter

Mmp11

hGH poly A

5 kb

B

MMP11^{KO} mice
Masson et al., 1998
(with permission from JCB)

PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} / PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}

a

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}
PyMT^{Tg}; MMP11^{KO}
Negative control

PyMT^{Tg} (556 bp)
MMP11^{WT} (332 bp)
MMP11^{KO} (230 bp)

b

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} PyMT^{Tg}; MMP11^{KO}

13 Weeks

c

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}
PyMT^{Tg}; MMP11^{KO}

Relative mRNA levels in tumors (fold change)

Mmp11

B'

MMP11^{Tg} mice
Dali-Youcef et al., 2016
(with permission from Sci. Rep)

PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} / PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}

a'

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}
PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg}
Negative control

PyMT^{Tg} (556 bp)
MMP11^{Tg} (338 bp)

c'

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}
PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg}

Relative mRNA levels in the skin (fold change)

Mmp11

**

b'

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT} PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg}

#1 #2 & #3 #4 #5

12 Weeks

C

Normal control 14 Weeks

Early stage hyperplasia

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}

PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg}

PyMT^{Tg}; MMP11^{WT}

PyMT^{Tg}; MMP11^{KO}

14 Weeks 17 Weeks

2 mm

Figure S1. Generation of PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} animals and their respective controls. **A.** Constructs used to generate double transgenic animals from PyMT^{Tg} mice and either gain- or loss-of-function MMP11^{Tg} and MMP11^{KO} mice. Single transgenic models have already been published

as mentioned in the figure; **B.** Identification of PyMT^{Tg} and MMP11^{KO} double transgenic genotypes **(a)** and PyMT^{Tg} and MMP11^{Tg} genotypes **(a')** from genomic DNA obtained from the tails. **(b)** Representative mice displaying mammary gland tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice and their controls; **(b')** Representative mice displaying mammary gland tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice and their controls and the mammary glands identification number are shown; **(c)** *Mmp11* gene expression levels in tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice and their controls. As expected, *Mmp11* expression is barely detected in tumors from PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice; **(c')** *Mmp11* expression in the skin from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} mice and their controls; **C.** Carmine-alum red staining of mammary glands from PyMT^{Tg}; MMP11^{Tg} and PyMT^{Tg}; MMP11^{KO} mice and their controls. Early stage hyperplasia in control mice is shown as well as tumors from double transgenic mice and their respective controls.

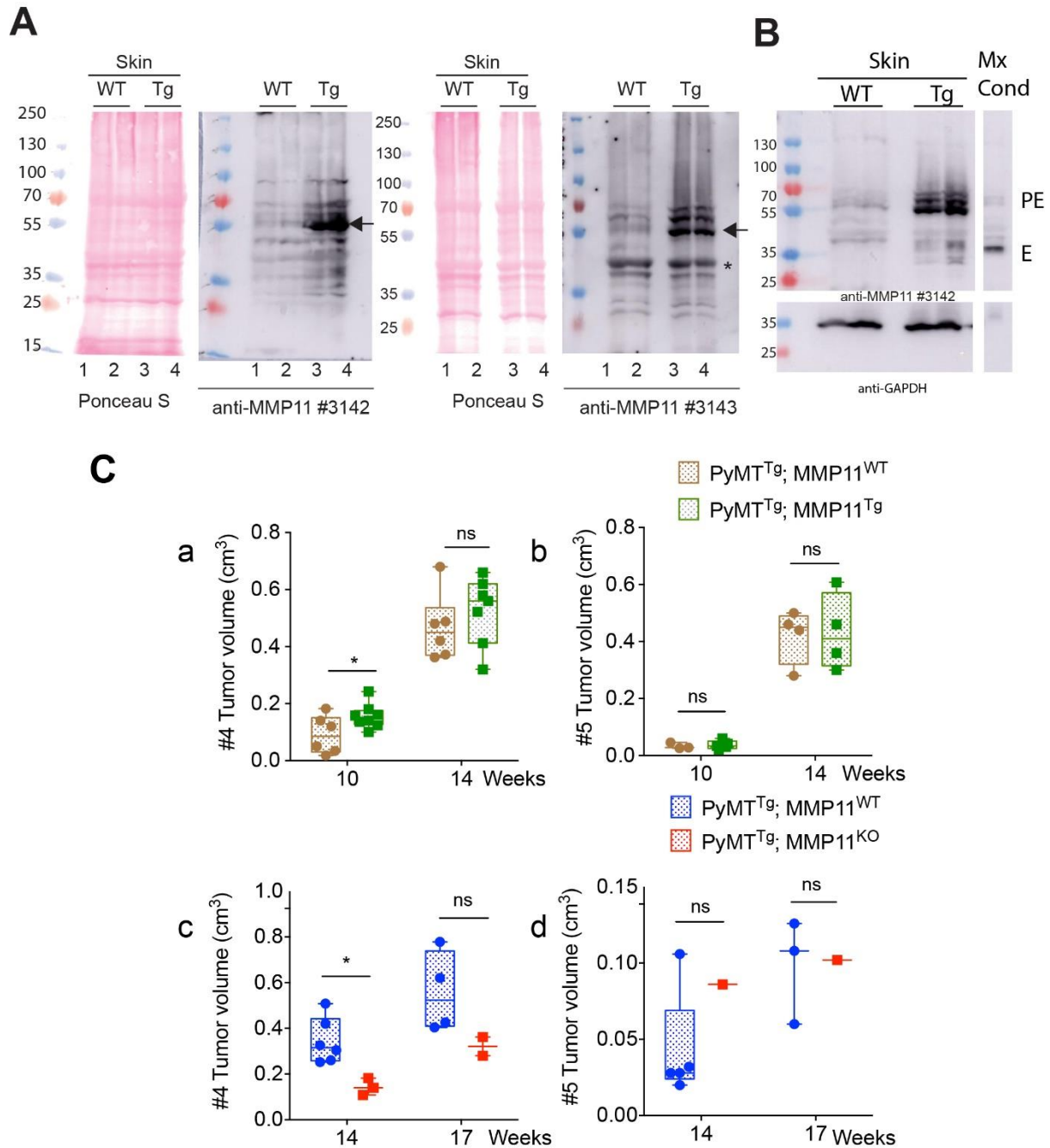


Figure S2. MMP11 expression in the skin of MMP11^{Tg} and tumor development in MG #4 and MG #5. **(A)** MMP11 expression in the skin of MMP11^{Tg} (Tg) and control (WT) mice ($n = 2$). Two polyclonal sera against MMP11 were utilized: #3142 and # 3143; on duplicate blots. On the left, total transferred proteins were visualized using Ponceau S staining, on the right, western blot analysis. Arrows show the presence of MMP11 at the size of the inactive pro-enzyme (55 kDa); **(B)** Analysis of the MMP11 molecular forms present in the skin of MMP11^{Tg}. Skin samples (~20µg) from control and Tg mice ($n = 2$) were loaded and analyzed using anti-MMP11 and anti-GAPDH rabbit antibodies. Conditioned medium (Mx Cond) of HeLa cells transfected with a MMP11 expression vector was loaded to show the size of the secreted and active form (45 KDa). Note that in the skin of transgenic mice the pro-form (PE) is predominantly expressed, only a small amount the active form (E) is detected. *: non-specific signal; **(C)** Tumor volume in MG # 4 and # 5 double transgenic animals from PyMT^{Tg} mice and either gain- or loss-of-function MMP11^{Tg} and MMP11^{KO} mice as in Figure 1.

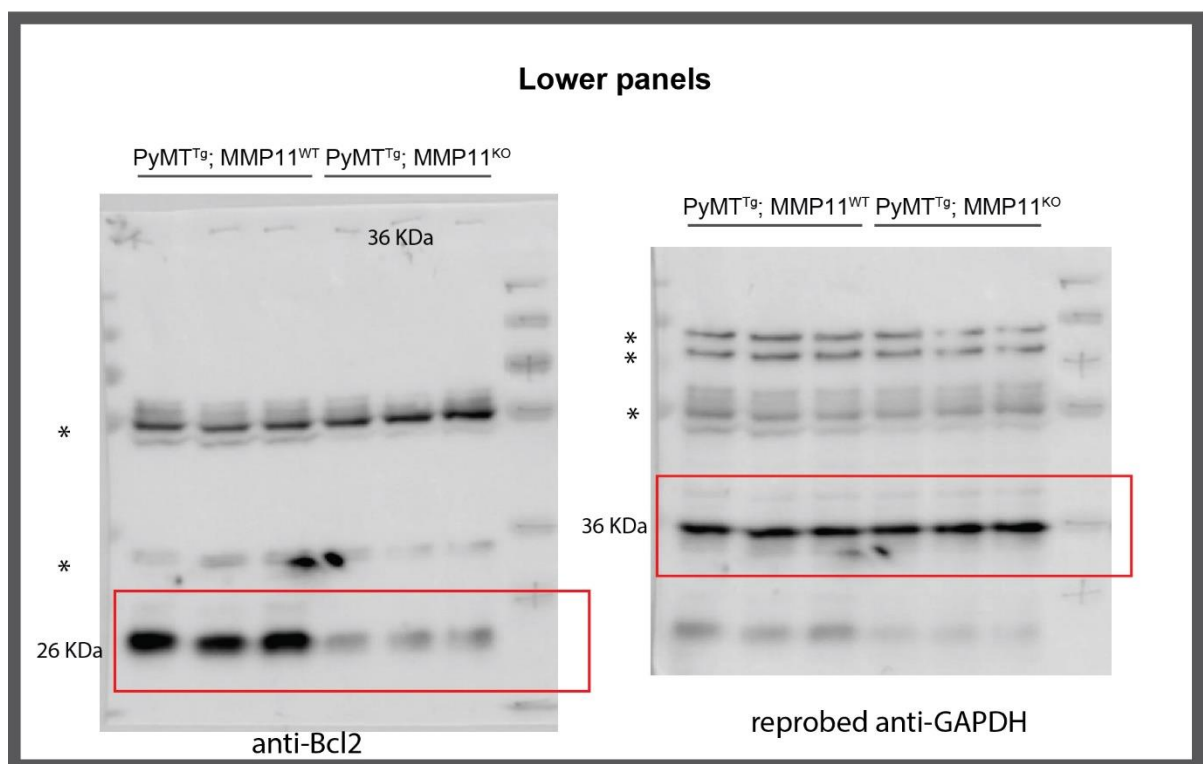
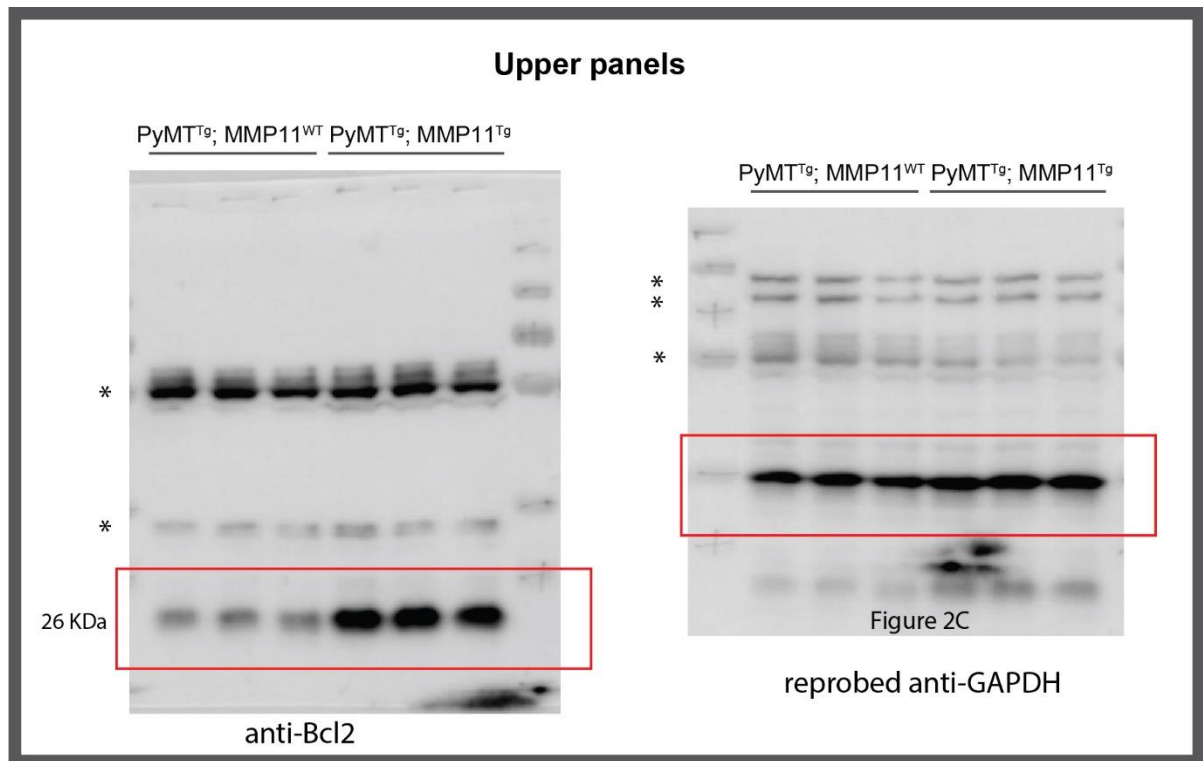


Figure S3. Uncropped blots from Figure 2C.

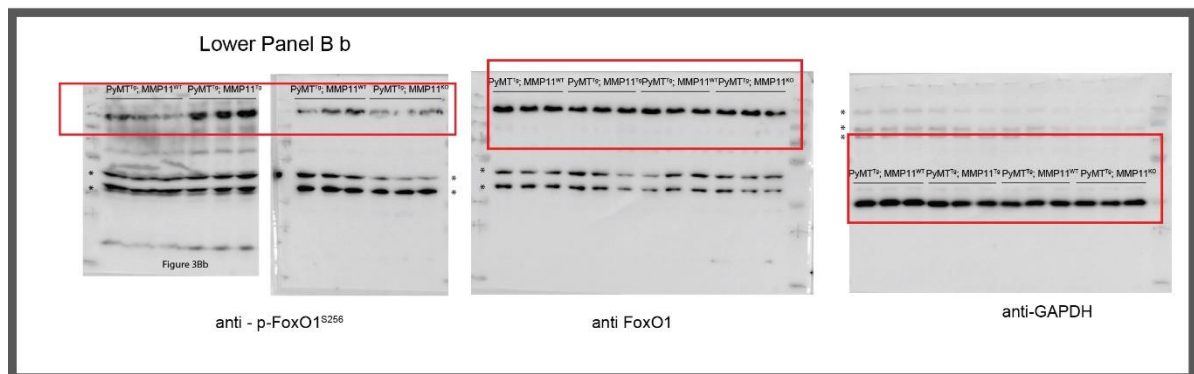
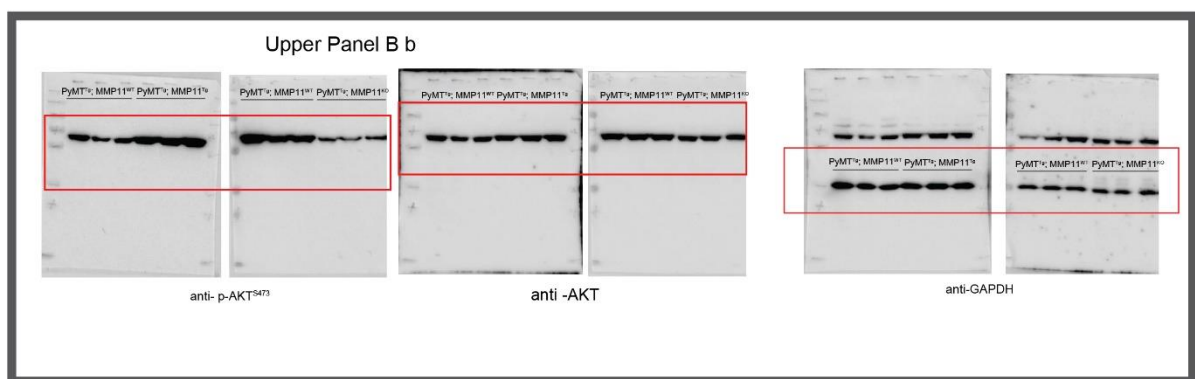
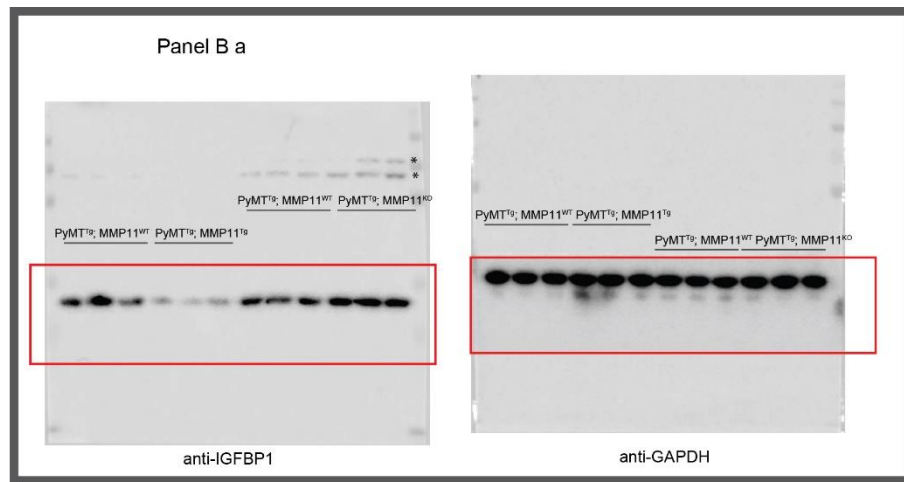


Figure S4. Uncropped blots from Figure 3B.

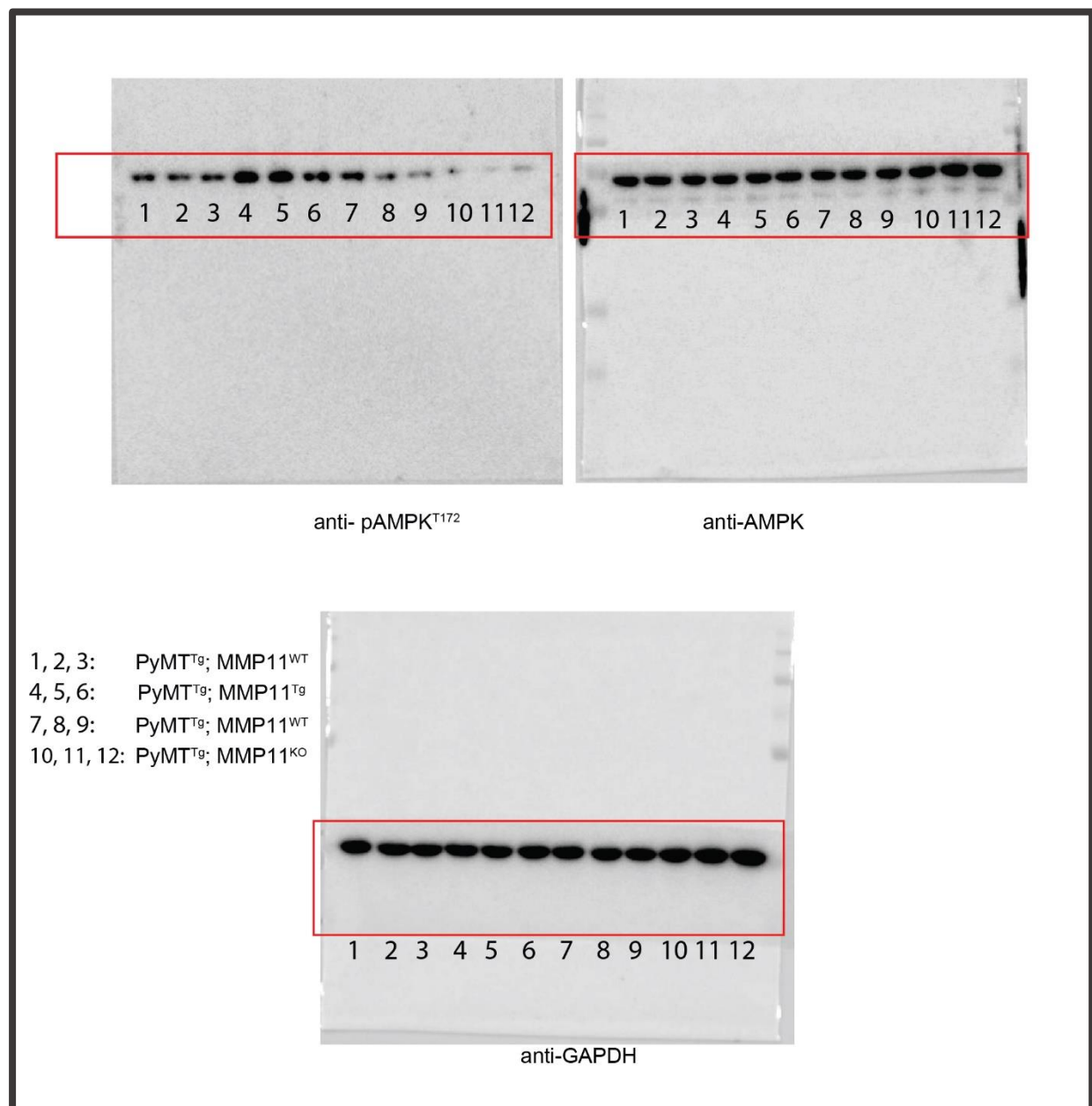


Figure S5. Uncropped blots from Figure 5D.

CONCLUSION, DISCUSSION, PERSPECTIVES

CONCLUSION, DISCUSSION, PERSPECTIVES

En France, le cancer du sein est le cancer le plus répandu chez la femme. Parmi les multiples mécanismes moléculaires acteurs de ce cancer, on retrouve les métalloprotéases matricielles et leurs substrats. Les MMP forment la plus importante famille de protéases impliquées dans la tumorigenèse. Parmi elles, la métalloprotéase matricielle 11 (MMP11) est une protéase impliquée dans plusieurs processus physiopathologiques dont la tumorigenèse.

Mes travaux de thèse portent sur la caractérisation de la MMP11 dont le mécanisme moléculaire d'action est encore mal compris.

Premièrement, l'étude ciblée du mécanisme moléculaire d'action de l'interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP2, par deux tests *in vitro*, a révélé que la MMP11 semble avoir une action protéolytique sur la MMP2 ce qui l'intègre encore plus dans un réseau de MMP incluant MMP14, MMP2 et MMP11 (Figure D1).

Deuxièmement, l'étude fonctionnelle de la MMP11 dans le cancer a été réalisée sur différents modèles précliniques de cancérogenèse. Des modèles de perte (MMP11-KO) et de gain (K14-MMP11) de MMP11 constitutifs ont été croisés avec un modèle de cancer du sein (MMTV-PyMT) qui développe spontanément des tumeurs mammaires. L'analyse des tumeurs a montré que la MMP11 favorise la progression tumorale en intervenant sur plusieurs voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, leur donnant ainsi un avantage de survie et des propriétés prolifératives (Figure D2A).

Pour finir, nous nous sommes donc tournés vers un modèle plus ciblé de tumorigenèse, basé sur l'injection de cellules cancéreuses mammaires syngéniques (E0771, CH3Biosys C57BL/6), dans le coussin adipeux de la glande mammaire de souris transgéniques ap2-MMP11. Ce modèle gain de fonction exprime la MMP11 uniquement dans le tissu adipeux. La MMP11 sécrétée par les adipocytes de la glande mammaire a une action autocrine sur les adipocytes et favoriserait la croissance tumorale en remodelant le microenvironnement tumoral (Figure D2B).

A plus long terme, la compréhension détaillée du mécanisme d'action moléculaire de la MMP11 permettra la mise au point d'une thérapie ciblée sur la MMP11.

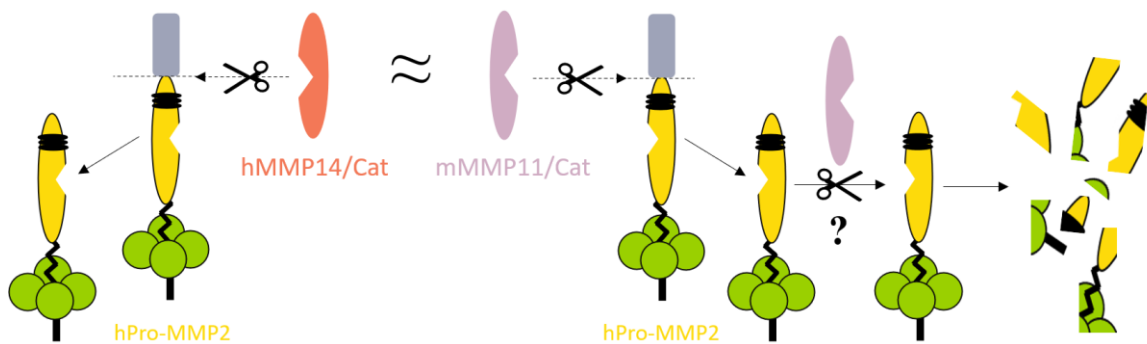


Figure D1 : Etude *in vitro* du mécanisme moléculaire d'action de la MMP11

L'étude ciblée du mécanisme d'action moléculaire de l'interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP2, par deux tests *in vitro*, a révélé que la MMP11 semble avoir une action protéolytique sur la MMP2. Cependant, le profil de clivage de la pro-MMP2 par la MMP11 n'est pas clair, il est possible que la MMP11 agisse comme la MMP14 en activant la pro-MMP2 et que celle-ci soit ensuite clivée par la MMP11 et/ou une autre protéase présente dans le milieu comme cela a été montré pour la plasmine (Monea et al., 2002).

I. La MMP11 semble impliquée dans une interaction fonctionnelle avec la MMP2

Grâce à deux tests *in vitro*, j'ai pu démontrer que la MMP11 semble avoir une action protéolytique sur la pro-MMP2.

Dans un premier temps, l'activité catalytique de la MMP2 a été analysée par zymographie après avoir été mise en contact avec la MMP11. Ce test indique que la MMP11 a une activité similaire à celle de la MMP14, autrement dit, elle permet l'activation de la MMP2 en éliminant son pro-domaine (Figure D1) (Deryugina et al., 2001).

Dans un deuxième temps, la zymographie est très sensible, mais ne permet pas forcément de voir les possibles produits de clivage secondaires de la MMP2 générés par la MMP11. C'est pour cette raison qu'ils ont été analysés sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes coloré au bleu de Coomassie. Cette expérience a révélé que la MMP11 inactiverait la MMP2 en la clivant sur au moins deux sites (Figure D1).

L'étude de l'interaction fonctionnelle entre la MMP2 et la MMP11 se heurte à plusieurs difficultés expérimentales que j'ai tenté de résoudre.

A. La production de la MMP11 humaine active est un enjeu majeur

Notre stratégie initiale était de tester l'activité protéolytique de la MMP11 sur la pro-MMP2 à l'aide d'enzymes recombinantes pour s'affranchir des autres facteurs présents dans le milieu de culture tels que d'autres protéases et des inhibiteurs. Seul le domaine catalytique isolé de la MMP11 de souris était disponible sous forme active. On ne peut donc conclure sur l'activité de la MMP11 humaine.

La deuxième stratégie était de produire de la MMP11 humaine active. Comme la MMP11 humaine, entière ou site catalytique isolé, recombinante produite au laboratoire dans *E. Coli* n'était pas active, j'ai essayé de produire la protéine entière par transfection dans différentes cellules mammifères en culture (COS, CHO, HeLa), en concentrant les milieux de culture conditionnés au PEG ou au sulfate d'ammonium. Aucune de ces cellules et aucune de ces méthodes de concentration n'ont permis de produire une MMP11 humaine active. En réalité, la MMP11 sauvage sécrétée dans le milieu est instable et rapidement dégradée, les étapes de concentration n'ont pas permis d'en obtenir en quantité suffisante pour faire des tests de clivage.

Nous avons observé que la mutation du site de reconnaissance par la furine, entraînant la sécrétion de la MMP11 sous sa pro-forme, permettait d'obtenir des quantités correctes de protéine dans le milieu. La troisième stratégie a donc été de muter le site furine en un site de clivage spécifique d'une autre protéase afin d'isoler la pro-MMP11 du milieu et de l'activer

extemporanément. Cette stratégie n'a pas fonctionné car la pro-MMP11 est sécrétée à un poids moléculaire plus élevé, signe d'une modification post-traductionnelle de type glycosylation, et cette protéine glycosylée n'est pas reconnue par la protéase 3C. Pour pallier ses difficultés, il est prévu de retenter la production de MMP11 en utilisant les HEK-293T en présence de BB-94 et de dialyser la protéine dans un tampon dépourvu de zinc pour éviter l'auto-dégradation. En cas de résultats non concluants, on pourrait également essayer la production de la MMP11 humaine active grâce au système d'expression en baculovirus.

Les données actuelles suggèrent qu'il y a une interaction entre la MMP11 et la MMP2 mais les résultats reposent sur l'utilisation du domaine catalytique isolé, or la MMP11 mature est normalement constituée du domaine catalytique associé au domaine de l'hémopexine. Le domaine de l'hémopexine donne la spécificité de substrat aux MMP et possède plusieurs rôles. Il est notamment essentiel à la migration et à l'invasion cellulaire indépendamment de l'activité protéolytique des MMP (Alford et al., 2017; Correia et al., 2013; Dufour et al., 2008). Par exemple, le domaine hémopexine de la MMP9 améliore la migration des cellules cancéreuses par le biais d'interactions avec les protéines de surface des cellules (les intégrines $\alpha4\beta1$ et l'EGFR) pour activer leurs voies de signalisation associées (Alford et al., 2017). Le domaine hémopexine est également impliqué dans la régulation des processus d'activation et d'inhibition des MMP afin de réguler leur activité. L'un des exemples les plus connus concerne d'ailleurs la MMP2 et la MMP14. La MMP14 a la capacité de former des dimères ou des multimères à la surface des cellules grâce à l'interaction des domaines hémopexines. Cette dimérisation lui permet de se lier à TIMP-2 et à la pro-MMP2. Ces derniers interagissent également ensemble grâce au domaine hémopexine de la pro-MMP2 qui se lie au domaine C-terminal de TIMP-2. La formation du complexe MMP14/TIMP-2/pro-MMP2 entraîne l'activation partielle de la pro-MMP2 par une des MMP14 du dimère puis son activation totale dans l'espace extracellulaire. Cette activation à la surface cellulaire lui permet de s'accumuler au niveau péricellulaire où elle pourrait exercer son activité collagénolytique localement dans l'espace extracellulaire (Butler et al., 1998; Lehti et al., 1998; Visse and Nagase, 2003). A l'inverse, en absence de MMP14, le complexe formé entre le domaine C-terminal de TIMP2 et le domaine hémopexine de la MMP2 donne lieu à un complexe inhibiteur de la MMP2 (Cui et al., 2017; Fridman et al., 1993; Kolkenbrock et al., 1991; Morgunova et al., 2002). Le domaine hémopexine pourrait ainsi moduler l'action du domaine catalytique de la MMP11 en faveur de l'activation et/ou de l'inactivation de la MMP2. Les expériences *in vitro* sont donc à reproduire après avoir produits des MMP11 recombinantes matures constituées de leur domaine catalytique et de leur domaine

hémopexine. Le ciblage du domaine hémopexine pourrait être une approche puissante pour le développement de médicaments antitumoraux et antimétastatiques.

B. La pro-MMP2 possède un profil de clivage complexe

Le profil de clivage de la pro-MMP2 par la MMP11 n'est pas clair, il est possible que la MMP11 agisse comme la MMP14 en activant la pro-MMP2 et que celle-ci soit ensuite clivée par la MMP11 et/ou une autre protéase présente dans le milieu comme cela a été montré pour la plasmine (Figure D1) (Monea et al., 2002). Par la suite, il faudrait donc réaliser un séquençage des peptides par spectrométrie de masse pour identifier les sites de clivage de la MMP2. Pour avoir une étude complète de l'interaction fonctionnelle entre la MMP11 et la MMP2, il sera essentiel de mesurer la cinétique d'activation/de dégradation de la MMP2 par la MMP11 par immunoblot, puis valider le mécanisme d'action de la MMP11 sur la MMP2 par mutagenèse dirigée, et enfin, étudier la spécificité d'action de la MMP11 sur la MMP2.

L'élucidation de cette interaction fonctionnelle permettra d'élargir les connaissances sur les réseaux complexes d'interactions entre protéases et d'envisager d'autres procédures expérimentales. A l'heure actuelle, les connaissances font de la MMP14 un acteur central de ce réseau d'interactions. De manière intéressante, plusieurs parallèles peuvent être faits entre la MMP11 et la MMP14. Malgré le fait que ces deux MMP possèdent une activité auto-catalytique menant à leur inactivation (Lehti et al., 1998; Noël et al., 1995; Toth et al., 2002), elles possèdent des localisations et des fonctions opposées. En effet, premièrement, la MMP14 est une protéine transmembranaire alors que la MMP11 est une protéine soluble sécrétée. Ainsi, l'inactivation de la MMP11 par la MMP14 aurait pour but de restreindre spatialement son activité et protéger localement la matrice extracellulaire et les cellules péricellulaires. La MMP11 pourrait agir de la même manière sur la MMP2 après l'avoir activée ou après qu'elle ait été activée par une autre protéase telle que la MMP14. Deuxièmement, la MMP11 est connue pour induire la différenciation adipocytaire et agir comme un régulateur négatif de l'adipogenèse (Andarawewa and Rio, 2008; Andarawewa et al., 2005; Motrescu and Rio, 2008b) alors que la MMP14 induit la différenciation adipocytaire et agit comme un régulateur positif de l'adipogenèse (Chun et al., 2006). Il est donc possible que la MMP14 équilibre la fonction de la MMP11 et qu'une compétition s'instaure entre les deux. Dans ce cas précis, la MMP11 pourrait donc activer la MMP2 pour l'aider dans le processus de différenciation adipocytaire en dégradant le collagène de la lame basale adipocytaire et de la matrice extracellulaire entourant les adipocytes. Au vu de ces données, il est également possible qu'il y

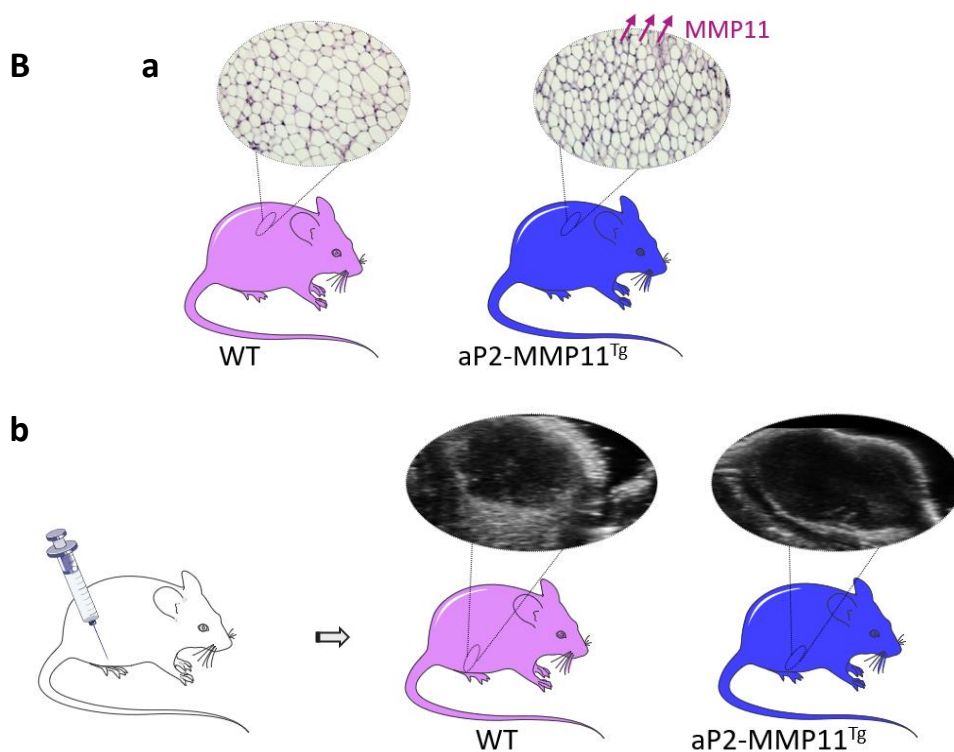
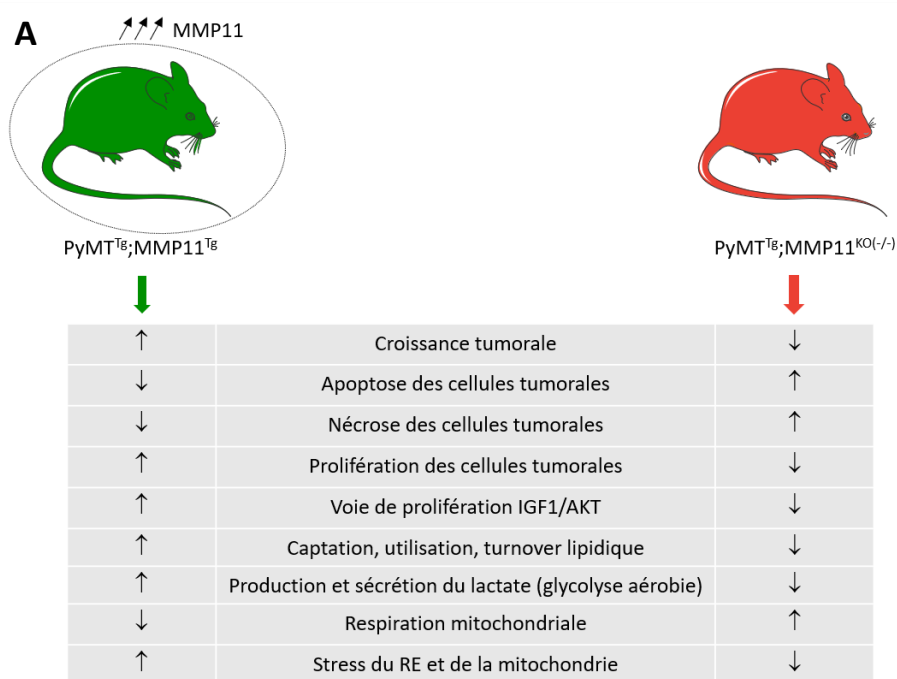


Figure D2 : Etude *in vivo* de l'impact de la MMP11 sur le cancer du sein

A. L'analyse tumorale des modèles de perte (MMP11-KO) et de gain (K14-MMP11) de MMP11 constitutifs croisés avec un modèle de cancer du sein (MMTV-PyMT) a montré que la MMP11 favorise la progression tumorale en intervenant sur plusieurs voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, leur donnant ainsi un avantage de survie et des propriétés prolifératives.

B. L'analyse du modèle de gain de MMP11 dans le tissu adipeux (aP2-MMP11) a montré que la MMP11 sécrétée par les adipocytes de la glande mammaire a une action autocrine sur les adipocytes (a) et favoriserait la croissance tumorale en remodelant le microenvironnement tumoral (b).

ait la mise en place d'une boucle de régulation complexe entre la MMP11, la MMP14 et la MMP2.

II. La MMP11 joue un rôle dans le développement du cancer du sein

Grâce aux modèles de perte (MMP11-KO) et de gain (K14-MMP11) de MMP11 croisés avec des souris MMTV-PyMT, nous avons confirmé que la MMP11 favorise la progression en intervenant dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, leur donnant ainsi un avantage de survie et des propriétés prolifératives (**Figure D2A**). Les résultats obtenus ont été regroupés et discutés dans un manuscrit publié dans *Cancers* (Tan, Jaulin et al., 2020). L'expression de la MMP11 étant induite dans les adipocytes au front d'invasion au contact des cellules cancéreuses (Andarawewa et al., 2005), nous avons ciblé notre étude sur un modèle basé sur l'injection de cellules cancéreuses mammaires syngéniques (E0771, CH3Biosys C57BL/6), dans le coussin adipeux de la glande mammaire de souris transgéniques ap2-MMP11. Grâce à ce modèle de gain de MMP11 uniquement dans le tissu adipeux, bien que j'aie obtenu des résultats différents entre les deux cohortes étudiées, j'ai observé que la MMP11 adipocytaire remodèle le tissu adipeux et favorise la croissance tumorale avec la première cohorte (**Figure D2B**). Au cours de cette étude fonctionnelle, je me suis heurtée à de nombreux problèmes expérimentaux.

A. L'impact direct de la MMP11 sur IGFBP1 reste à confirmer *in vivo*

Grâce aux modèles K14-MMP11 et MMP11-KO croisés avec des souris MMTV-PyMT, nous avons pu montrer qu'en présence de MMP11, la voie de signalisation IGF1/Akt est activée, ce qui se traduit par une augmentation de la biodisponibilité d'IGF1 et une diminution des niveaux de la protéine IGFBP1 (Dali-Youcef et al., 2016; Tan, Jaulin et al., 2020). Comme l'IGFBP1 est l'un des rares substrats identifiés de la MMP11 (Mañes et al., 1997), cette dernière pourrait réguler les niveaux d'IGF1 libre *in vivo* par le biais du clivage d'IGFBP1. En effet, en 1997, Mañes et al. ont démontré *in vitro* que le clivage de l'IGFBP1 humaine par la MMP11 conduit à la libération d'IGF1. Aucun autre papier n'ayant confirmé ces observations, j'ai décidé de reproduire la même expérience *in vitro* que Mañes et al.. Pour cela, la MMP11 recombinante murine active (mMMP11/Cat) a été mise en présence du milieu conditionné par les cellules HEK293T transfectées avec un plasmide d'expression de l'IGFBP1 de souris, en y ajoutant ou non le BB-94, un inhibiteur de la MMP11. Suite à l'analyse sur gel SDS-Page coloré au bleu de Coomassie, j'ai remarqué que la mMMP11/Cat semble cliver IGFBP1 sur plusieurs

sites et non sur un seul site comme cela a été montré par Mañes et al., en 1997. L'ensemble des observations faites *in vitro* et *in vitro*, nous amènent à des hypothèses intéressantes.

Premièrement, IGFBP1 aurait des fonctions inhibitrices dans le développement du cancer (Hoeflich and Russo, 2015), mais également des effets positifs sur la prolifération, l'invasion et la migration des cellules tumorales via différents modes d'action canoniques et non canoniques (Allard and Duan, 2018; Bach, 2018; Baxter, 2014; Lin et al., 2021). En effet, IGFBP1 peut agir dépendamment et indépendamment d'IGF1. *In vitro*, l'IGFBP1 phosphorylée a une affinité plus élevée pour IGF1 (Jones et al., 1991), par conséquent, IGFBP1 forme un complexe avec IGF1 pour augmenter sa demi-vie et empêcher IGF1 d'interagir avec son récepteur de manière à inhiber les signaux mitogènes au sein des tumeurs par exemple. Cette inhibition d'IGF1 peut être levée par le clivage protéolytique d'IGFBP1 entraînant la libération d'IGF1 du complexe IGFBP/IGF1 (Allard and Duan, 2018). Au sein de nos modèles précliniques de cancer du sein, ce clivage protéolytique pourrait être assuré par la MMP11. Sous certaines conditions, le motif Arg-Gly-Asp (RGD) d'IGFBP1 peut également interagir avec les récepteurs de l'intégrine $\alpha 5/\beta 1$ à la surface des cellules afin d'améliorer la migration cellulaire (Allard and Duan, 2018; Russo et al., 2005). De plus, le signal émis lors de la liaison de l'IGFBP1 à l'intégrine $\alpha 5/\beta 1$ pourrait interagir avec des éléments des voies de signalisation de l'IGF1R et, finalement, stimuler les effets médiés par l'IGF1 (Lin et al., 2021). Cependant, d'après la littérature, IGF1 est associé à un haut risque de cancer du sein en agissant sur le développement et la progression du cancer (Bach, 2018; Fürstenberger and Senn, 2002; Fürstenberger et al., 2003) alors qu'un rôle causal de l'IGFBP1 dans le cancer du sein est peu probable (Schernhammer et al., 2005). Il est donc essentiel de déterminer *in vivo* si la MMP11 clive IGFBP1 dans le cadre du cancer du sein et de quelle manière. Cela risque d'être compliqué à réaliser car la MMP11 est principalement détectée sous sa pro-forme catalytiquement inactive dans les différents tissus des modèles précliniques de cancérogenèse mammaire utilisés au cours de ma thèse. De plus, il faudra prendre en compte le fait que je travaille avec l'IGFBP1 de souris, alors que Mañes et al. ont travaillé avec de l'IGFBP1 recombinante humaine. Ces deux IGFBP1 d'espèces différentes n'ont pas forcément le même mode d'action.

Deuxièmement, le site de clivage d'IGFBP1 reconnu par la MMP11 se situe dans la région médiane reliant les domaines N-terminale et C-terminale. De manière intéressante, les séquences N-terminale et C-terminale des IGFBP sont hautement conservées alors que la région médiane, reliant ces deux domaines n'est pas conservée parmi les IGFBP (Hoeflich and Russo, 2015; Mañes et al., 1997). La MMP11 pourrait donc cliver d'autres IGFBP, IGFBP2 étant un candidat potentiel très intéressant. En effet, contrairement à IGFBP1, IGFBP2 est

abondamment exprimée dans le cancer du sein et est liée à la voie de signalisation PTEN/PI3K dans le cancer du sein (Hoeflich and Russo, 2015; Schernhammer et al., 2005; Wang et al., 2008). De plus, outre IGFBP1, IGFBP2 est la seule autre IGFBP à posséder un site RGD qui permet la liaison aux intégrines. Après avoir étudié la voie IGF1/Akt, connue pour jouer un rôle important dans la survie et la prolifération cellulaire, dans nos modèles MMTV-PyMTxK14-MMP11 et MMTV-PyMTxMMP11-KO, il faudrait désormais se focaliser sur la voie PTEN/PI3K (Dali-Youcef et al., 2016; Tan, Jaulin et al., 2020). Il faudrait également étudier l'impact de la MMP11 sur IGFBP2 dans nos différents modèles murins.

B. La lignée cancéreuse mammaire E0771 est controversée

La stratégie expérimentale repose sur l'étude des souris ap2-MMP11. Ces souris sont sur le fond C57Bl/6N, qui est l'une des souches les plus utilisées. Cependant, il existe seulement 10 lignées cancéreuses mammaires dérivées des souris de ce même fond, et sur ces 10 lignées, seule la lignée E0771 provient de tumeurs spontanées, non induites par l'ajout d'un transgène ou d'un agent chimique (Le Naour et al., 2020). La lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire médullaire E0771 est dérivée d'une tumeur spontanée de souris C57BL/6 (Sugiura and Stock, 1952) et adaptée pour les tests de médicaments anticancéreux (Sirotnak et al., 1984). La classification de cette lignée reste controversée, certaines publications disent qu'elle présente un phénotype de type triple-négatif (Bernard et al., 2017; Contreras-Zárata et al., 2019; Johnstone et al., 2015) et les autres parlent de phénotype de type luminal B (Battle et al., 2014; Fuentes-Mattei et al., 2014; Hiraga and Ninomiya, 2019). Cette lignée cellulaire syngénique présente en plus un avantage pour l'étude de la réponse immunitaire. Ainsi, l'injection de ces cellules en orthotopique, dans le tissu adipeux de la glande mammaire des souris ap2-MMP11, fournit un modèle néoplasique de cancer du sein dans lequel les rôles de l'immunité, de la tumeur, et du microenvironnement tumoral avec le dialogue intercellulaire, peuvent être étudiés. Ce modèle permet donc de mimer la situation observée dans les tumeurs primaires du sein où l'expression de la MMP11 est induite dans les adipocytes présents au front d'invasion (Andarawewa et al., 2005). Bien que ce modèle semble être en faveur de notre étude, j'ai obtenu des résultats différents entre la première et la deuxième cohorte. D'après la littérature, bien que la prolifération tumorale des cellules E0771 semble être similaire à celle d'autres tumeurs murines et humaines transplantables, beaucoup d'autres facteurs peuvent impacter la prolifération des cellules E0771 dont le poids des souris (Le Naour et al., 2020). Dans une étude similaire à la nôtre, chez les animaux ayant un poids corporel élevé, les tumeurs E0771 se sont développées avec un taux de croissance initial plus élevé, puis avec un ralentissement de la

croissance plus rapide que chez les animaux ayant un poids corporel plus faible (Bassukas and Maurer-Schultze, 1992). Les explications physiologiques à ceci sont inconnues. Dans mon cas, l'âge des souris était plus hétérogène avec la deuxième cohorte qu'avec la première, ce qui a pu amplifier les variations de poids entre les souris du même âge et donc entraîner une croissance très hétérogène des tumeurs. Cet effet a pu être accentué par le fait que les cellules E0771 sont assez agressives et que l'expression de la MMP11 était très variable dans les souris de la deuxième cohorte. Tous ces éléments pourraient expliquer le fait que je n'ai pas pu observer l'effet de la MMP11 sur la progression tumorale avec la deuxième cohorte. Il faudrait donc refaire l'expérience avec des souris qui ont exactement le même âge, un poids très similaire et une expression très homogène de la MMP11. Ce dernier point est très compliqué à mettre en place car la MMP11 est exprimée uniquement dans le tissu adipeux ce qui nécessite de réaliser au préalable une procédure invasive sur les souris afin de prélever un morceau de tissu adipeux pour analyser par immunoblot et RT-qPCR l'expression des protéines et ARNm de la MMP11 extraits.

C. Le mode de suivi des tumeurs n'est pas assez précis et/ou biaisé

Lors du suivi des tumeurs, j'ai utilisé différentes techniques pour la première et la deuxième cohorte. Avec la première cohorte, le suivi des tumeurs a été réalisé avec un pied à coulisse ce qui permettait d'obtenir uniquement la longueur et la largeur de la tumeur de manière non précise. Avec la deuxième cohorte, les tumeurs ont été suivies avec un échographe (Vevo 3100 ultra high-frequency ultrasound system) permettant notamment d'avoir des mesures plus précises et une mesure supplémentaire très importante, la profondeur des tumeurs. Ces différences de précision dans la méthode de suivi des tumeurs a peut-être joué un rôle important dans la véracité des résultats. Lorsque l'expérience sera refaite, il faudra donc utiliser un échographe et compléter l'analyse avec l'imagerie par bioluminescence. Les souris seront donc injectées avec des cellules E0771 génétiquement modifiées en ajoutant le gène rapporteur luciférase luc2 pour permettre un suivi de la cinétique de développement des tumeurs mammaires par imagerie *in vivo* en enregistrant la bioluminescence avec l'appareil IVIS Lumina XRMS, en parallèle de la prise des mesures avec l'échographe. Avec l'échographe et l'IVIS (Lim et al., 2009), la croissance tumorale peut être suivie pendant plusieurs jours avant que la taille de la tumeur ne devienne palpable ou mesurable par le pied à coulisse. Cette surveillance rapide peut donner un aperçu des événements précoces du développement tumoral en présence de la MMP11. Grâce à l'imagerie en bioluminescence, la mort et la nécrose des cellules tumorales dues à l'hypoxie sont indiquées précocement par une réduction du signal

bioluminescent. Cette mort cellulaire peut ne pas s'accompagner d'une réduction de la taille de la tumeur mesurée par le pied à coulisse et l'échographe. Ces données sont très importantes car avec les modèles de gain (K14-MMP11) et de perte de MMP11 (MMP11-KO) constitutifs, nous avons déjà montré que la MMP11 impacte l'apoptose et la nécrose des cellules cancéreuses (Tan, Jaulin et al., 2020).

D. L'injection des cellules cancéreuses dans le tissu adipeux n'est pas adaptée

La stratégie expérimentale repose sur l'injection des cellules E0771 dans le tissu adipeux de la glande mammaire #4 des souris. En temps normal, l'utilisation des cellules E0771 dans des modèles murins présente l'avantage d'avoir une absorption tumorale proche de 100 %, en particulier lorsqu'une implantation mammaire orthotopique est utilisée et le nombre de cellules est élevé ($\geq 10^5$) (Hoover et al., 2012; Le Naour et al., 2020). Dans mon cas, j'ai injecté 2×10^5 cellules. Cependant, l'injection et la prise de greffe des cellules cancéreuses dans le tissu adipeux des glandes mammaires est aléatoire, les cinétiques de croissance tumorale peuvent être variables d'un individu à l'autre et cette variabilité peut donc masquer un effet biologique de la MMP11. Récemment, il a été montré que les xénogreffes de cellules cancéreuses luminales directement dans les canaux lactifères via le mamelon, et non dans le tissu adipeux, se développent comme leurs homologues cliniques, tant sur le plan histopathologique et moléculaire que sur le plan de la cinétique tumorale, ce qui améliore la pertinence des résultats (Sflomos et al., 2016). De manière très intéressante, les tumeurs grossissent beaucoup moins vite lorsque les cellules sont injectées dans les canaux lactifères comparées aux tumeurs formées suite à l'injection des cellules directement dans le tissu adipeux, ce qui nous laisserait le temps de voir l'effet de la MMP11 adipocytaire sur le développement tumoral et pouvoir faire des analyses moléculaires détaillées sur les adipocytes associés aux cellules cancéreuses. Les adipocytes libèrent divers facteurs solubles, dont des cytokines, des facteurs de croissance, des adipokines et des acides gras libres. Ces facteurs favorisent la survie et la croissance des cellules cancéreuses épithéliales environnantes (Andarawewa et al., 2005; Carter and Church, 2012; Dirat et al., 2011; Nieman et al., 2011; Tan et al., 2011). Par exemple, la leptine semble contrôler la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales et malignes (Hu et al., 2002). L'adiponectine régule le développement des tumeurs mammaires et l'angiogenèse (Hebbard et al., 2008). Il serait alors intéressant de voir si la MMP11 favorise la sécrétion des différents facteurs par les adipocytes associés au cancer.

En conclusion, les études *in vitro* ont révélé que la MMP11 agissait sur la MMP2 par son activité protéolytique et les études *in vivo* supposent que la MMP11 influence la croissance et le métabolisme énergétique de la tumeur. La perspective majeure de ces études est de pouvoir contrer l'action de la MMP11 dans les tumeurs mammaires. La MMP11 étant importante dans les processus physiologiques, cibler directement la MMP11 ou un de ses domaines (ex : le domaine hémapexine) n'est sans doute pas envisageable d'où l'importance de connaître le mécanisme d'action moléculaire précis de la MMP11 en poursuivant nos études *in vitro* et *in vivo*.

MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

Les cellules CHO (Wojtanik and Liscum, 2003) ont été maintenues dans un milieu DMEM/F12, avec 20 mM de HEPES, contenant 5 % de NCS et 40 µg/mL de gentamycine. Les cellules COS-1 (ATCC CRL-1650) ont été maintenues dans un milieu DMEM avec 10 % de FCS et 40 µg/mL de gentamycine. Les cellules HeLa (ATCC CCL-2) ont été maintenues dans un milieu DMEM avec 5 % de FCS et 40 µg/mL de gentamycine. Les cellules U2OS (ATCC HTB-96) ont été maintenues dans un milieu DMEM (1 g/L de glucose) contenant 10 % de FCS et 40 µg/mL de gentamycine. Les cellules HT-1080 (DSMZ Cat n° ACC 315) ont été maintenues dans un milieu EAGLE contenant 10 % de FCS inactivé par la chaleur et 40 µg/ml de gentamycine. Les cellules U87MG (ATCC HTB-14) ont été maintenues dans un milieu MEM contenant 10 % de FCS, 0,1 mM d'acides aminés non essentiels, 1 mM de pyruvate de sodium et 40 µg/mL de gentamycine. Les cellules HEK293T (ATCC CRL-3216) ont été maintenues dans un milieu DMEM (1 g/L de glucose) contenant 10 % de FCS et 40 µg/mL de gentamycine. Les cellules 3T3-L1 (ATCC CL-173) ont été maintenues dans un milieu DMEM (4,5 g/L de glucose) avec 10 % de FCS et 40 µg/mL de gentamycine. Les cellules E0771 (CH3 BioSystems cat n° #940001) ont été maintenues dans un milieu RPMI, avec 10 mM de HEPES, contenant 10 % de FCS et 40 µg/mL de gentamycine. Elles ont ensuite été analysées sanitaires avant d'être injectées dans les souris. Toutes les cellules ont été maintenues en culture dans des incubateurs à 37°C avec 95 % d'oxygène et 5 % CO₂.

II. SDS-Page et analyse par immunoblot ou coloration au bleu de Coomassie

Les protéines, chargées négativement par le bleu/SDS6X (Tris HCl 150 mM pH 6.8, glycérol 6 %, SDS 20 %, bleu de bromophénol) ont été déposées et séparées par électrophorèse sur un gel à 10 % de polyacrylamide dénaturant (SDS-Page). Le gel se compose d'un gel de séparation (Acrylamide/bisacrylamide 40/1 10 %, Tris HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1 %, APS 0.05 %, TEMED 0.1%) au-dessus duquel est déposé un gel de concentration (Acrylamide/bisacrylamide 40/1 4.5 %, Tris HCl 0.375 M pH 6.8, SDS 0.1 %, APS 0.05 %, TEMED 0.1 %). Un marqueur de poids moléculaire (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific™) est déposé dans un des puits. Les échantillons protéiques ont migré dans du tampon d'électrophorèse (Tris Base 0.02 M, glycine 0.2 M, SDS 0.1 %) pendant 1 heure et demi à 100 volts jusqu'à la sortie du front de migration hors du gel. Après l'électrophorèse, le gel a été coloré au bleu de Coomassie (PageBlue Protein Staining Solution, Thermo Scientific) ou analysé par immunoblot. Dans le dernier cas, les protéines ont été transférées et immobilisées par électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 heure et 10 minutes à 240 mA

en présence de tampon de transfert (Tris Base 0.02M, glycine 0.1M, éthanol 20 %, SDS 0.1 %). L'efficacité du transfert a été vérifiée par révélation des protéines présentes sur la membrane au rouge Ponceau [Ponceau S 0.1 % (Sigma), acide acétique 5 %]. Les protéines ont ensuite été révélées avec des anticorps spécifiques : anti-MMP11 de souris (1:1000) : 5ST4A9 (IGBMC) ; anti-MMP11 de lapin (1:500) : #3143 (IGBMC) ; anti-MMP2 de souris (1:1000) : MAB 41FRLb 5C3-2-2 (IGBMC) ; anti-MMP9 de souris : 4D2 (IGBMC) ; anti-αP2/Fabp4 B-4 de souris (1:500) : sc-271529 (biotechnology) ; anti-actine de souris (1:5000) : ACT-2D7 (Euromedex) ; anti-GAPDH de lapin (1:10000) : G9545 (Sigma-Aldrich). Au préalable, les sites d'interactions aspécifiques entre la membrane et les anticorps ont été saturés par incubation de la membrane dans du PBS 1X-Tween 0,1 % contenant 3 % de lait écrémé, pendant 40 minutes sous agitation à température ambiante. Puis la membrane a été incubée en présence de l'anticorps primaire, dilué au 1/1 000ème dans du PBS 1X-Tween 0,1 %, toute la nuit à 4°C sous agitation. Trois lavages de chacun 5 minutes ont ensuite été réalisés avant ajout de l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris ou anti-lapin couplé à la peroxydase, dilué au 1/10 000ème dans du PBS 1X-Tween 0,1 %, pendant 2h. Après trois lavages au PBS 1X-Tween 0,1 %, la révélation des complexes anticorps-protéine a été permise par l'ajout du substrat de la peroxydase (kit Amersham ECL Start Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) sur la membrane. Les protéines ont été détectées par l'acquisition de signaux de chimioluminescence par le système de détection Amersham™ Imager 600 (GE Healthcare) suite à la réaction du luminol et de l'eau oxygénée catalysée par la peroxydase. L'intensité de chaque bande a été calculée avec le logiciel Fiji®. Les images acquises (fichier .tif) ont été converties au format 16 bits. Chaque bande (et fond) a été circonscrite avec la sélection rectangulaire ROI et les mesures liées à l'intensité du signal ont été mesurées dans cette sélection. Toutes les données obtenues correspondent à des valeurs arbitraires.

III. Mesure de l'activité catalytique de la MMP11 recombinante murine sur la pro-MMP2 recombinante humaine

A. Etablissement des protéines recombinantes

Nous disposons de différentes protéines recombinantes : la MMP11 humaine mature (hMMP11/FL), la MMP11 murine sauvage active (mMMP11/Cat), la MMP11 murine inactive dont l'acide glutamique de la position 220 du site catalytique a été substitué par une alanine (mMMP11/Cat E220A), la pro-MMP2 humaine sauvage (hPro-MMP2), la MMP14 humaine sauvage (hMMP14/Cat) (Noël et al., 2000). Les deux types de MMP11 murines recombinantes,

la MMP11 humaine recombinante, et la MMP14 humaine recombinante ont été produites au laboratoire en utilisant *E. Coli*. La MMP2 humaine recombinante est commerciale (PF037, Merck).

B. Analyse de l'activité gélatinolytique de la MMP2 par SDS-Page en présence de gélatine

Différents mélanges enzymatiques ont été réalisés à partir des protéines recombinantes en présence d'un tampon enzymatique (Tris 50 mM pH7.5, NaCl 100mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 µM) puis ont été incubés à 37°C pendant 18 heures. Les réactions enzymatiques ont ensuite été stoppées par ajout de bleu/SDS6X (Tris HCl 150 mM pH 6.8, glycérol 6 %, SDS 20 %, bleu de bromophénol) puis déposées et séparées par électrophorèse sur un gel à 10 % de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) dans lequel est emprisonné 0,1 % de gélatine (gélatinographe). Le gel se compose d'un gel de concentration (Acrylamide/bisacrylamide 4.5 % 40/1, Tris HCl 0.375 M pH 6.8, SDS 0.1 %, APS 0.05 %, TEMED 0.1 %) et d'un gel de séparation (Acrylamide/bisacrylamide 10 % 40/1, Tris HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1 %, APS 0.05 %, TEMED 0.1 %, gélatine 0.1 %). Les échantillons ont migré dans du tampon d'électrophorèse (Tris Base 0.02 M, glycine 0.2 M, SDS 0.1 %) à 100 volts. Après l'électrophorèse, le SDS présent dans le gel a été éliminé par deux lavages de 30 minutes avec du Triton X-100 2,5 %. Le gel a ensuite été incubé pendant 20 heures à 37°C dans du tampon d'incubation (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, 5 mM CaCl₂ et 200 mM NaCl) afin de renaturer les protéines présentes dans le gel et donc de rétablir l'activité gélatinolytique de la MMP2. Le gel a ensuite été incubé dans une solution de bleu de Coomassie G250 (bleu de Coomassie G250 0,2 %, éthanol 40 %, acide acétique 10 %) pendant 2 heures et demi à température ambiante puis décoloré par une solution de décoloration (Ethanol 20 %, acide acétique 10 %) pendant 2 heures. Les zones où la gélatine a été dégradée se traduisent par la présence de bandes claires contre un fond bleu sombre. Par la suite, trois lavages de 2 minutes ont été réalisés dans l'eau avant de tremper le gel dans une solution de séchage (Ethanol 30 %, glycérol 15 %) durant 15 minutes. Le gel a été séché et conservé entre deux films de cellophane.

C. Analyse de l'activité protéolytique de la MMP11 sur la MMP2 et sur IGFBP1 par SDS-Page coloré au bleu de Coomassie

Les cellules HEK293T ont été transfectées avec le plasmide pCMV-MMP2 et pCMV/IGFBP1-myc. Puis les milieux de culture conditionnés des cellules ont été récupérés et concentrés par filtration sur un tube Amicon 30kDa. Le surnageant contenant la MMP2 ou IGFBP1 a été

concentré 10 fois et 10 µL ont été répartis dans des tubes en présence de tampon enzymatique (Tris 50 mM pH7.5, NaCl 100mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1µM). Dans les tubes souhaités, 1 µL de mMMP11/Cat (soit environ 200ng) a été ajouté avec ou sans BB-94. Les mélanges enzymatiques ont été incubés toute la nuit à 37°C puis les réactions enzymatiques ont été stoppées par ajout de bleu/SDS6X (Tris HCl 150 mM pH 6.8, glycérol 6 %, SDS 20 %, bleu de bromophénol). Les échantillons ont été mis à bouillir 1 minute puis déposés sur gel SDS-page. Après migration des échantillons, le gel a été coloré au bleu de Coomassie.

IV. Production de la MMP11 humaine recombinante dans un système de mammifère

A. Transfections transitoires des cellules de mammifère

Les cellules COS-1/CHO/HeLa ont été comptées et 250 000 cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm² en présence de 10 mL classique. A 70-80 % de confluence, les cellules ont été transfectées de manière transitoire en duplicata avec différents vecteurs pQCXIP en utilisant le réactif X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent (Roche). Les cellules ont été transfectées avec le vecteur pQCXIP, pQCXIP/mMMP11, pQCXIP/hMMP11, et pQCXIP/hMMP11 E216A. Le jour suivant la transfection, le milieu de culture avec sérum a été remplacé par du milieu sans sérum additionné de BSA à une concentration finale de 0,05 %.

B. Concentration du milieu conditionné au PEG ou au sulfate d'ammonium

1. Concentration au PEG

Deux jours après la transfection, pour les protéines sécrétées, les milieux de culture sans sérum ont été prélevés et centrifugés à 2 000 rpm durant 5 minutes pour éliminer les cellules mortes. Sur les 5 mL de surnageant, 150 µL ont été gardés tels quels et le reste a été concentré au PEG. Ainsi, le milieu a été déposé dans une membrane poreuse (1kDa) préalablement équilibrée dans de l'eau ultra-pure pendant 30 minutes. La membrane a été fermée puis déposée sur du polyéthylène glycol (PEG) et recouverte avec du PEG à nouveau. L'ensemble a été mis à agiter à 4°C pendant 1 heure. L'extérieur des membranes a été rincé dans de l'eau ultra-pure et le milieu concentré présent dans les membranes poreuses a été repris dans du tampon Triton (Tris 50 mM pH 6.8, 200 mM NaCl, 0.1 % Triton X100) puis récupéré. Les volumes des milieux concentrés ont ensuite été ajustés avec du tampon Triton.

2. Concentration au sulfate d'ammonium

Deux jours après la transfection, pour les protéines sécrétées, les milieux de culture sans sérum ont été prélevés et centrifugés à 2 000 rpm durant 5 minutes pour éliminer les cellules mortes. Sur les 20 mL de surnageant, 200 µL de milieu ont été gardés tels quels et le reste a été concentré par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium (Buache et al., 2014). Ainsi, 11,22 g de sulfate d'ammonium ont été ajoutés dans le milieu de manière à ce qu'il soit saturé à 40 % en sulfate d'ammonium. Le sulfate d'ammonium a ensuite été dissout par agitation à température ambiante puis le mélange a été placé 2 heures dans la glace. Après centrifugation à 6000 rpm pendant 1 heure et demi à 4°C, le culot protéique a été repris dans 2 mL de tampon enzymatique (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 µM, ZnCl₂ 1 µM) puis déposé dans une membrane de dialyse (Spectra/Por® Dialysis Membrane, Spectrum Laboratories). Le tout a ensuite été mis en suspension dans un bécher contenant 200 mL de tampon de dialyse (Tris 1 M, NaCl 100 mM, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 1 µM), sous agitation, pendant 18 heures à 4°C, afin d'éliminer les résidus de sulfate d'ammonium et de préserver l'activité enzymatique de la MMP11.

Quelle que soit la méthode de concentration, pour les protéines intracellulaires, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS1X puis grattées dans 500 µL de tampon de lyse (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1 %), dans lequel a été ajouté un inhibiteur de protéases (cOmplete™, Roche). Le lysat cellulaire a été laissé 10 minutes dans la glace avant d'être centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Le surnageant (extrait protéique cytoplasmique) a été quantifié par la méthode BCA puis 10 µg de protéines ont été ensuite mis en présence de bleu/SDS 6X additionné de 8,4 M de β-mercaptoéthanol et dénaturés par incubation au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes avant d'être déposés et séparés sur gel SDS-Page afin d'analyser l'expression de la MMP11 par immunoblot.

C. Test indirect de clivage de l'α1-PI (α1-proteinase inhibitor)

Dans une plaque 96 puits, 10 µL d'α1-PI à 1 mg/mL (Sigma A-9024) dilué au 1/10^{ème} dans du tampon Triton (Tris 50 mM pH 6.8, 200 mM NaCl, 0.1 % Triton X100) ont été mélangés à 1, 10 ou 20 µL des différents milieux concentrés au sulfate d'ammonium ou au PEG contenant chacun les protéines suivantes : mMMP11, hMMP11 ou hMMP11 E216. Le volume a été ajusté à 33 µL dans les différents puits avec le tampon Triton. La plaque a été incubée 1 heure à température ambiante sous agitation puis 2 µL de phénantroline à 100 mM ont été ajoutés, pour

stopper la digestion de l' α 1-PI par la MMP11, ainsi que 27 μ L d' α -Chymotrypsine (α CT) à 1 mg/mL (Sigma C-7762) diluée au 1/300^{ème} dans du tampon Triton. La plaque a été incubée 20 minutes à température ambiante avant l'ajout de 7 μ L du substrat de synthèse de l' α CT N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide) (Sigma S-7388) à l'abri de la lumière. Ce substrat a été préalablement préparé à 2 mg/mL dans du DMSO. La plaque a été à nouveau mise à incuber sous agitation légère à température ambiante et à l'abri de la lumière en attendant que la coloration jaune apparaisse. Cette coloration a été dosée par mesure de l'absorbance à 405 nm avec le lecteur de microplaques multi-mode SynergyTM HTX (BioTek). Deux contrôles ne comportant pas de milieu ont également été effectués pour valider le test. Dans le contrôle positif, l' α 1-PI est absent, l' α CT clive donc son substrat donnant une coloration jaune. Dans le contrôle négatif, l' α 1-PI est présent, l' α CT ne peut donc pas cliver son substrat, il n'y a pas de coloration. Ces deux contrôles permettent de valider le bon fonctionnement du test.

V. Etude de la migration cellulaire dépendante de la MMP2 chez les U87MG

A. Etablissement des lignées stables U87MG

Afin d'obtenir des lignées stables U87MG/shctrl et U87MG/shMMP2, des infections lentivirales ont été réalisées. Des plasmides pLenti shMMP2 humain et shctrl ont été cotransfectés avec trois plasmides de conditionnement pLP1, pLP2 et pLP/VSVF (Invitrogen) dans des cellules 293T pendant 48 heures en utilisant le réactif X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent (Roche). Les particules virales supplémentées avec 8 μ g/mL de polybrene ont ensuite été incubées avec les cellules U87MG pendant 24 heures. Les cellules U87MG ont été sélectionnées en utilisant 1 μ g/mL de puromycine. Puis, des extraits cellulaires ont été réalisés pour analyser l'expression de la MMP2, MMP11 et MMP9 par immunoblot. L'absence de MMP2 dans les cellules U87MG/shMMP2 et l'absence d'expression de la MMP11 et de la MMP9 endogène dans les cellules U87MG ont été vérifiées.

B. Test de migration par blessure

Les cellules U87MG ont été comptées puis 400 000 cellules par puits ont étéensemencées dans une plaque 6 puits. Après avoir attendu 3-4 jours, pour que les cellules atteignent une confluence de 70-80 %, une blessure manuelle a été réalisée sur le tapis cellulaire avec la partie la plus fine d'un cône de pipette. Chaque puits a été pris en photo chaque jour et l'aire de fermeture de la blessure a été mesurée grâce à une macro établie sur le logiciel Fiji®.

I. Etude de l'impact de la MMP11 sur le métabolisme tumoral

Le « Matériels et Méthodes » relatif à cette partie est décrit dans mon manuscrit « Matrix Metalloproteinase-11 Promotes Early Mouse Mammary Gland Tumor Growth through Metabolic Reprogramming and Increased IGF1/AKT/FoxO1 Signaling Pathway, Enhanced ER Stress and Alteration in Mitochondrial UPR » publié dans Cancers.

VI. Caractérisation du modèle aP2-MMP11 et étude de l'impact de la MMP11 adipocytaire sur la croissance tumorale

A. Génération et génotypage des souris

Les souris aP2-MMP11 ont été produites à l'IGBMC sur fond génétique C57BNL/6N à partir d'une construction de transgénèse où l'expression de la MMP11 est sous le contrôle du promoteur spécifique du tissu aP2/Fabp4. Le génotypage des souris aP2-MMP11 a été effectué grâce à différentes amorces :

Amorces Allèles	Sens	Anti-sens
aP2	5' GCTTGATATCGAATTCCCAGCAGG 3'	5' CACAGAAAGGGAGCCATAGAAGTC 3'
Sauvage	5' CAAATGTTGCTTGTCTGGTG 3'	5' GTCAGTCGAGTGCACAGTTT 3'
MMP11	5' CGGTTTCCACCATCCGAGGA 3'	5' GTGGAAACGCCAATAGTCTCC 3'
Sauvage	5' AGATGGCCCTACGCTTCTCCAGAGG 3'	5' GCTTGGGGATCCCAGAACCTACAAG 3'

Les souris ont été génotypées une semaine après leur naissance à partir des prélèvements issus de la phalangectomie distale utilisée pour l'identification, puis elles ont été sevrées 3 à 4 semaines après leur naissance. Les prélèvements ont été mis au contact de 100 µL de tampon direct PCR et de Proteinase K (20 mg/mL) à 55°C pendant 24 heures. Puis le mélange réactionnel de 25 µL pour réaliser une PCR a été effectué à partir de : 2,5 µL Tampon PCR 10X (670 mM Tris HCl pH8.8, 67 mM MgCL₂, 1.7 mg/mL BSA, 166 mM (NH₄)₂SO₄), 1 µL dNTP 10 mM, 0,125 µL par amorce 10 µM, 0,5 µL Taq polymérase ou Phusion, 1µL ADN génomique, eau ultra-pure qsp 25 µL

La PCR a été réalisée grâce aux programmes suivants :

Gènes	Programmes
aP2	2 min 95°C, 35 cycles (1 min 94°C, 20 sec 60°C, 1 min 72°C), 10 min 72°C
MMP11	5 min 94°C, 34-35 cycles (20 sec 94°C, 20 sec 62°C, 1 min 72°C), 10 min 72°C

Les produits PCR ont ensuite été séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2,7 %.

B. Transfection transitoire de la construction aP2-MMP11 et différenciation des cellules 3T3-L1

Les cellules HeLa et 3T3-L1 ont été comptées puisensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm² en présence de milieu classique. A environ 70-80 % de confluence, les cellules ont été transfectées de manière transitoire en duplicata avec le vecteur pQCXIP, pQCXIP/mMMP11, pBS/aP2-polyA et pBS/aP2-MMP11-polyA en utilisant le réactif X-tremeGENE9 DNA Transfection Reagent (Roche). Les cellules 3T3-L1 ont ensuite été menées à confluence pour atteindre le stade de préadipocyte puis une série de boîtes a été maintenue en milieu classique et l'autre série a été différenciée en ajoutant le mix de différenciation (10 µg/mL insuline, 0.5 mol/L dexaméthasone, 0.5 mmol/L methylisobutylxanthine) durant 2 jours. Pour finir, des extraits cellulaires ont été réalisés pour analyser l'expression de la MMP11 dans les cellules HeLa et 3T3-L1 différenciées ou non par immunoblot.

C. Analyse de la structure des adipocytes par coloration à l'hématoxyline-éosine des sections histologiques de tissus adipeux blancs de la glande mammaire

Le tissu adipeux blanc de la glande mammaire (mgWAT) a été prélevé puis inclus dans de la paraffine afin de réaliser des coupes histologiques. Les lames histologiques de tissus adipeux blancs de la glande mammaire #4 ont été immergées deux fois 5 minutes dans 100 % d'Histosol, puis 5 minutes dans 100 % éthanol, 5 minutes dans 90 % éthanol, 5 minutes dans 80 % d'éthanol, et 5 minutes dans l'eau ultra-pure. Les lames ont ensuite été immergées pendant 3 minutes dans l'hématoxyline de Harris, puis décolorées dans l'acide-alcool pendant 2 secondes avant d'être lavées et bleuies à l'eau courante du robinet pendant 3 minutes. Les sections histologiques ont ensuite été colorées pendant 30 secondes dans l'éosine-Y en solution aqueuse 0,1 %, rincées à l'eau du robinet pendant 30 secondes, et déshydratées dans l'éthanol 80 % pendant 5 minutes, dans l'éthanol 90 % pendant 5 minutes et dans l'éthanol 100 % pendant 5 minutes. Les lames ont finalement été « clarifiées » deux fois 5 minutes dans l'Histosol 100 % et montées sur lame avec du Permount (Pertex).

D. Suivi cinétique de la croissance tumorale

Mon protocole d'expérimentation animale relié aux souris aP2-MMP11 a été validé par le Com'Eth (comité d'éthique de l'IGBMC) puis autorisé par le ministère de l'Enseignement

Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI). Le projet est référencé sous le numéro APAFIS #2017030811336376_v5.

Les souris utilisées pour ce projet sont des femelles sauvages et aP2-MMP11, sur fond génétique C57BL/6N, âgées de 15 à 20 semaines.

Pour générer des tumeurs, les cellules E0771 ont été comptées, puis 200 000 cellules cancéreuses (dans 50 µl de milieu de culture classique) ont été injectées avec une seringue à insuline en regard du mamelon de la glande mammaire numéro 4 des souris sous anesthésie gazeuse (isoflurane). L'aiguille de la seringue a été enfoncée de 5-10 mm de manière parallèle à la peau et perpendiculaire à l'axe longitudinal de l'animal.

Deux à trois fois par semaine, les souris ont été pesées avec une balance électronique et le volume de tumeur primaire a été mesuré en utilisant un pied à coulisse ou un échographe Vevo 3100, Fujifilm, VisualSonics). Avec le pied à coulisse, le plus grand diamètre longitudinal (longueur) et le plus grand diamètre transversal (largeur) de la tumeur ont été mesurés. Avec l'échographe, la profondeur de la tumeur a également pu être mesurée. Les volumes tumoraux ont été estimés par la formule ellipsoïdale modifiée :

Volume (pied à coulisse) = $(4/3) \times \pi \times (\text{longueur}/2) \times (\text{largeur}/2)^2$

Volume (échographe) = $(4/3) \times \pi \times (\text{longueur}/2) \times (\text{largeur}/2) \times (\text{longueur}/2)$

E. Extraction protéique dans les tissus adipeux de souris

Des morceaux de tissus adipeux d'environ 3 mm ont directement été broyés dans 250 µL de bleu/ SDS 2X (Tris-HCl 150 mM pH6.8, SDS 6 %, glycérol 30 %, H₂O, bleu de bromophénol) additionné de 8,4 M de β-mercaptoéthanol. Le lysat tissulaire est laissé 30 minutes dans la glace avant d'être soniqué 2 fois 15 minutes, brièvement centrifugé à 4°C, puis aliquoté. Les échantillons sont mis à bouillir 5 minutes avant d'être déposé sur gel SDS-Page pour analyser l'expression de la MMP11 et aP2/Fabp4 par immunoblot.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S., and Kvåle, G. (2005). Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer* 92, 167–175. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602302>.
- Alford, V.M., Kamath, A., Ren, X., Kumar, K., Gan, Q., Awwa, M., Tong, M., Seeliger, M.A., Cao, J., Ojima, I., et al. (2017). Targeting the Hemopexin-like Domain of Latent Matrix Metalloproteinase-9 (proMMP-9) with a Small Molecule Inhibitor Prevents the Formation of Focal Adhesion Junctions. *ACS Chem Biol* 12, 2788–2803. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00758>.
- Allard, J.B., and Duan, C. (2018). IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Frontiers in Endocrinology* 9. .
- Andarawewa, K., and Rio, M. (2008). New Insights into MMP function in Adipogenesis. p.
- Andarawewa, K.L., Boulay, A., Masson, R., Mathelin, C., Stoll, I., Tomasetto, C., Chenard, M.-P., Gintz, M., Bellocq, J.-P., and Rio, M.-C. (2003). Dual Stromelysin-3 Function during Natural Mouse Mammary Tumor Virus-ras Tumor Progression. *Cancer Res* 63, 5844–5849. .
- Andarawewa, K.L., Motrescu, E.R., Chenard, M.-P., Gansmuller, A., Stoll, I., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2005). Stromelysin-3 Is a Potent Negative Regulator of Adipogenesis Participating to Cancer Cell-Adipocyte Interaction/Crosstalk at the Tumor Invasive Front. *Cancer Res* 65, 10862–10871. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1231>.
- Anglard, P., Melot, T., Guérin, E., Thomas, G., and Basset, P. (1995). Structure and Promoter Characterization of the Human Stromelysin-3 Gene (*). *Journal of Biological Chemistry* 270, 20337–20344. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.35.20337>.
- Apostolou, P., and Fostira, F. (2013). Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *Biomed Res Int* 2013, 747318. <https://doi.org/10.1155/2013/747318>.
- Aras, A.B., Guven, M., Balak, N., Ayan, E., Uyar, S.B., and Elmaci, I. (2016). Evaluation of the Association Between Matrix Metalloproteinase 11 and Intervertebral Disc Disease. *Turk Neurosurg* 26, 274–279. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.12762-14.0>.
- Asano, T., Tada, M., Cheng, S., Takemoto, N., Kuramae, T., Abe, M., Takahashi, O., Miyamoto, M., Hamada, J.-I., Moriuchi, T., et al. (2008). Prognostic Values of Matrix Metalloproteinase Family Expression in Human Colorectal Carcinoma. *Journal of Surgical Research* 146, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.02.011>.

- Atashzar, M.R., Baharlou, R., Karami, J., Abdollahi, H., Rezaei, R., Pourramezan, F., and Zoljalali Moghaddam, S.H. (2020). Cancer stem cells: A review from origin to therapeutic implications. *J Cell Physiol* 235, 790–803. <https://doi.org/10.1002/jcp.29044>.
- Bach, L.A. (2018). IGF-binding proteins. *J Mol Endocrinol* 61, T11–T28. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0254>.
- Barrasa, J.I., Olmo, N., Santiago-Gómez, A., Lecona, E., Anglard, P., Turnay, J., and Lizarbe, M.A. (2012). Histone deacetylase inhibitors upregulate MMP11 gene expression through Sp1/Smad complexes in human colon adenocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 570–581. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.12.010>.
- Basset, P., Bellocq, J.P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J.M., Podhajcer, O.L., Chenard, M.P., Rio, M.C., and Chambon, P. (1990). A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 348, 699–704. <https://doi.org/10.1038/348699a0>.
- Basset, P., Wolf, C., and Chambon, P. (1993). Expression of the stromelysin-3 gene in fibroblastic cells of invasive carcinomas of the breast and other human tissues: a review. *Breast Cancer Res Tr* 24, 185–193. <https://doi.org/10.1007/BF01833259>.
- Bassiouni, W., Ali, M.A.M., and Schulz, R. (2021). Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *The FEBS Journal* 288, 7162–7182. <https://doi.org/10.1111/febs.15701>.
- Bassukas, I.D., and Maurer-Schultze, B. (1992). Relationship between preimplantation host weight and growth of the mouse adenocarcinoma EO 771. *In Vivo* 6, 93–96. .
- Battle, M., Gillespie, C., Quarshie, A., Lanier, V., Harmon, T., Wilson, K., Torroella-Kouri, M., and Gonzalez-Perez, R.R. (2014). Obesity induced a leptin-Notch signaling axis in breast cancer. *Int J Cancer* 134, 1605–1616. <https://doi.org/10.1002/ijc.28496>.
- Baxter, R.C. (2014). IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insights. *Nat Rev Cancer* 14, 329–341. <https://doi.org/10.1038/nrc3720>.
- Bernard, M.M., McConnery, J.R., and Hoskin, D.W. (2017). [10]-Gingerol, a major phenolic constituent of ginger root, induces cell cycle arrest and apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Exp Mol Pathol* 102, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.03.006>.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 17, 320–329. <https://doi.org/10.1038/nm.2328>.

- Bode, W., and Maskos, K. (2005). Structural Basis of the Matrix Metalloproteinases and Their Physiological Inhibitors, the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Biological Chemistry* 384, 863–872. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.097>.
- Boulay, A., Masson, R., Chenard, M.-P., Fahime, M.E., Cassard, L., Bellocq, J.-P., Sautès-Fridman, C., Basset, P., and Rio, M.-C. (2001). High Cancer Cell Death in Syngeneic Tumors Developed in Host Mice Deficient for the Stromelysin-3 Matrix Metalloproteinase. *Cancer Res* 61, 2189–2193. .
- Bourboulia, D., and Stetler-Stevenson, W.G. (2010). Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 20, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.05.002>.
- Bournet, B., Pointreau, A., Souque, A., Oumouhou, N., Muscari, F., Lepage, B., Senesse, P., Barthet, M., Lesavre, N., Hammel, P., et al. (2012). Gene expression signature of advanced pancreatic ductal adenocarcinoma using low density array on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *Pancreatology* 12, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2011.12.003>.
- van den Brandt, P.A., Spiegelman, D., Yaun, S.-S., Adami, H.-O., Beeson, L., Folsom, A.R., Fraser, G., Goldbohm, R.A., Graham, S., Kushi, L., et al. (2000). Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. *American Journal of Epidemiology* 152, 514–527. <https://doi.org/10.1093/aje/152.6.514>.
- Brinckerhoff, C.E., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 207–214. <https://doi.org/10.1038/nrm763>.
- Brody, J.G., Moysich, K.B., Humblet, O., Attfield, K.R., Beehler, G.P., and Rudel, R.A. (2007). Environmental pollutants and breast cancer. *Cancer* 109, 2667–2711. <https://doi.org/10.1002/cncr.22655>.
- Buache, E., Thai, R., Wendling, C., Alpy, F., Page, A., Chenard, M.-P., Dive, V., Ruff, M., Dejaegere, A., Tomasetto, C., et al. (2014). Functional relationship between matrix metalloproteinase-11 and matrix metalloproteinase-14. *Cancer Med* 3, 1197–1210. <https://doi.org/10.1002/cam4.290>.
- Buja, A., Mastrangelo, G., Perissinotto, E., Grigoletto, F., Frigo, A.C., Rausa, G., Marin, V., Canova, C., and Dominici, F. (2006). Cancer incidence among female flight attendants: a meta-analysis of published data. *J Womens Health (Larchmt)* 15, 98–105. <https://doi.org/10.1089/jwh.2006.15.98>.

- Bukowski, R., Chlebowski, R.T., Thune, I., Furberg, A.-S., Hankins, G.D.V., Malone, F.D., and D'Alton, M.E. (2012). Birth weight, breast cancer and the potential mediating hormonal environment. *PLoS One* 7, e40199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040199>.
- Butler, G.S., Butler, M.J., Atkinson, S.J., Will, H., Tamura, T., Westrum, S.S. van, Crabbe, T., Clements, J., d'Ortho, M.-P., and Murphy, G. (1998). The TIMP2 Membrane Type 1 Metalloproteinase "Receptor" Regulates the Concentration and Efficient Activation of Progelatinase A: A KINETIC STUDY *. *Journal of Biological Chemistry* 273, 871–880. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.871>.
- Carter, J.C., and Church, F.C. (2012). Mature breast adipocytes promote breast cancer cell motility. *Exp Mol Pathol* 92, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.03.005>.
- Chenard, M.-P., O'Siorain, L., Shering, S., Rouyer, N., Lutz, Y., Wolf, C., Basset, P., Bellocq, J.-P., and Duffy, M.J. (1996). High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma. *Int. J. Cancer* 69, 448–451. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19961220\)69:6<448::AID-IJC5>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19961220)69:6<448::AID-IJC5>3.0.CO;2-4).
- Chenard, M.-P., Lutz, Y., Mechine-Neuville, A., Stoll, I., Bellocq, J.-P., Rio, M.-C., and Basset, P. (1999). Presence of high levels of MT1-MMP protein in fibroblastic cells of human invasive carcinomas. *Int. J. Cancer* 82, 208–212. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990719\)82:2<208::AID-IJC10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990719)82:2<208::AID-IJC10>3.0.CO;2-9).
- Chun, T.-H., Hotary, K.B., Sabeh, F., Saltiel, A.R., Allen, E.D., and Weiss, S.J. (2006). A Pericellular Collagenase Directs the 3-Dimensional Development of White Adipose Tissue. *Cell* 125, 577–591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.050>.
- Cole, S.E., Wiltshire, T., and Reeves, R.H. (1998). Physical Mapping of the Evolutionary Boundary between Human Chromosomes 21 and 22 on Mouse Chromosome 10. *Genomics* 50, 109–111. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5312>.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *The Lancet* 347, 1713–1727. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)90806-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)90806-5).
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *The Lancet* 350, 1047–1059. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)08233-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)08233-0).

- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, and al. (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *The Lancet* 360, 187–195. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09454-0).
- Collins, A., and Politopoulos, I. (2011). The genetics of breast cancer: risk factors for disease. *Appl Clin Genet* 4, 11–19. <https://doi.org/10.2147/TACG.S13139>.
- Contreras-Zárate, M.J., Day, N.L., Ormond, D.R., Borges, V.F., Tobet, S., Gril, B., Steeg, P.S., and Cittelly, D.M. (2019). Estradiol induces BDNF/TrkB signaling in triple-negative breast cancer to promote brain metastases. *Oncogene* 38, 4685–4699. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0756-z>.
- Correia, A.L., Mori, H., Chen, E.I., Schmitt, F.C., and Bissell, M.J. (2013). The hemopexin domain of MMP3 is responsible for mammary epithelial invasion and morphogenesis through extracellular interaction with HSP90 β . *Genes Dev* 27, 805–817. <https://doi.org/10.1101/gad.211383.112>.
- Cowell, C.F., Weigelt, B., Sakr, R.A., Ng, C.K.Y., Hicks, J., King, T.A., and Reis-Filho, J.S. (2013). Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. *Molecular Oncology* 7, 859–869. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.07.005>.
- Cowppli-Bony, A., Uhry, Z., Remontet, L., Voirin, N., Guizard, A.-V., Trétarre, B., Bouvier, A.-M., Colonna, M., Bossard, N., Woronoff, A.-S., et al. (2017). Survival of solid cancer patients in France, 1989-2013: a population-based study. *Eur J Cancer Prev* 26, 461–468. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000372>.
- Cristancho, A.G., and Lazar, M.A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 722–734. <https://doi.org/10.1038/nrm3198>.
- Cronin, K.A., Lake, A.J., Scott, S., Sherman, R.L., Noone, A., Howlader, N., Henley, S.J., Anderson, R.N., Firth, A.U., Ma, J., et al. (2018). Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer* 124, 2785–2800. <https://doi.org/10.1002/cncr.31551>.
- Cui, N., Hu, M., and Khalil, R.A. (2017). Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 147, 1–73. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., and Shi, B. (2015). Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res* 5, 2929–2943. .

- Dali-Youcef, N., Hnia, K., Blaise, S., Messaddeq, N., Blanc, S., Postic, C., Valet, P., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2016). Matrix metalloproteinase 11 protects from diabetes and promotes metabolic switch. *Sci Rep* 6, 25140. <https://doi.org/10.1038/srep25140>.
- Daly, M.B., Pal, T., Berry, M.P., Buys, S.S., Dickson, P., Domchek, S.M., Elkhanany, A., Friedman, S., Goggins, M., Hutton, M.L., et al. (2021). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 19, 77–102. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.0001>.
- Damjanovski, S., Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (1999). Spatial and temporal regulation of collagenases-3, -4, and stromelysin -3 implicates distinct functions in apoptosis and tissue remodeling during frog metamorphosis. *Cell Res* 9, 91–105. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290009>.
- Daubisse-Marliac, L., Delafosse, P., Boitard, J.B., Poncet, F., Grosclaude, P., and Colonna, M. (2011). Breast cancer incidence and time trend in France from 1990 to 2007: a population-based study from two French cancer registries. *Ann Oncol* 22, 329–334. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq396>.
- Deng, H., Guo, R.-F., Li, W.-M., Zhao, M., and Lu, Y.-Y. (2005). Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.027>.
- Deryugina, E.I., Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T.I., DiScipio, R., Smith, J.W., and Strongin, A.Y. (2001). MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin α v β 3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 263, 209–223. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5118>.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Gonidec, S.L., et al. (2011). Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Res* 71, 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>.
- Drooger, J.C., Hooning, M.J., Seynaeve, C.M., Baaijens, M.H.A., Obdeijn, I.M., Sleijfer, S., and Jager, A. (2015). Diagnostic and therapeutic ionizing radiation and the risk of a first and second primary breast cancer, with special attention for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a critical review of the literature. *Cancer Treat Rev* 41, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2014.12.002>.

- Dufour, A., Sampson, N.S., Zucker, S., and Cao, J. (2008). Role of the hemopexin domain of matrix metalloproteinases in cell migration. *J Cell Physiol* 217, 643–651. <https://doi.org/10.1002/jcp.21535>.
- Dupé, V., Ghyselinck, N.B., Thomazy, V., Nagy, L., Davies, P.J., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Essential roles of retinoic acid signaling in interdigital apoptosis and control of BMP-7 expression in mouse autopods. *Dev Biol* 208, 30–43. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9176>.
- Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* 18, 884–901. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.012>.
- Eiro, N., Fernandez-Gomez, J., Sacristán, R., Fernandez-Garcia, B., Lobo, B., Gonzalez-Suarez, J., Quintas, A., Escaf, S., and Vizoso, F.J. (2017). Stromal factors involved in human prostate cancer development, progression and castration resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* 143, 351–359. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2284-3>.
- Eiro, N., González, L., Martínez-Ordoñez, A., Fernandez-Garcia, B., González, L.O., Cid, S., Dominguez, F., Perez-Fernandez, R., and Vizoso, F.J. (2018). Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. *Cell Oncol* 41, 369–378. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0371-y>.
- Ewertz, M., Duffy, S.W., Adami, H.-O., Kvåle, G., Lund, E., Meirik, O., Møller, A., Soini, I., and Tulinus, H. (1990). Age at first birth, parity and risk of breast cancer: A meta-analysis of 8 studies from the nordic countries. *International Journal of Cancer* 46, 597–603. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910460408>.
- Eyre, R., Alférez, D.G., Spence, K., Kamal, M., Shaw, F.L., Simões, B.M., Santiago-Gómez, A., Sarmiento-Castro, A., Bramley, M., Absar, M., et al. (2016). Patient-derived Mammosphere and Xenograft Tumour Initiation Correlates with Progression to Metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 21, 99–109. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9361-8>.
- Fahad Ullah, M. (2019). Breast Cancer: Current Perspectives on the Disease Status. *Adv Exp Med Biol* 1152, 51–64. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_4.
- Farmer, S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism* 4, 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.001>.
- Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>.

- Ford, D., Easton, D.F., Bishop, D.T., Narod, S.A., and Goldgar, D.E. (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *The Lancet* 343, 692–695. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91578-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91578-4).
- Fortelny, N., Cox, J.H., Kappelhoff, R., Starr, A.E., Lange, P.F., Pavlidis, P., and Overall, C.M. (2014). Network Analyses Reveal Pervasive Functional Regulation Between Proteases in the Human Protease Web. *PLoS Biol* 12, e1001869. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001869>.
- Fridman, R., Bird, R.E., Hoyhtya, M., Oelkuct, M., Komarek, D., Liang, C.M., Berman, M.L., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G., and Fuerst, T.R. (1993). Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem J* 289 (Pt 2), 411–416. <https://doi.org/10.1042/bj2890411>.
- Friedenreich, C.M. (2010). The Role of Physical Activity in Breast Cancer Etiology. *Seminars in Oncology* 37, 297–302. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.05.008>.
- Friedenson, B. (2000). Is mammography indicated for women with defective BRCA genes? Implications of recent scientific advances for the diagnosis, treatment, and prevention of hereditary breast cancer. *MedGenMed* 2, E9. .
- Fuentes-Mattei, E., Velazquez-Torres, G., Phan, L., Zhang, F., Chou, P.-C., Shin, J.-H., Choi, H.H., Chen, J.-S., Zhao, R., Chen, J., et al. (2014). Effects of obesity on transcriptomic changes and cancer hallmarks in estrogen receptor-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 106, dju158. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju158>.
- Fürstenberger, G., and Senn, H.-J. (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 3, 298–302. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(02\)00731-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(02)00731-3).
- Fürstenberger, G., Morant, R., and Senn, H.J. (2003). Insulin-like growth factors and breast cancer. *Onkologie* 26, 290–294. <https://doi.org/10.1159/000071627>.
- Furuhashi, M., Saitoh, S., Shimamoto, K., and Miura, T. (2015). Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol* 8, 23–33. <https://doi.org/10.4137/CMC.S17067>.
- Gage, M., Wattendorf, D., and Henry, L.R. (2012). Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. *J Surg Oncol* 105, 444–451. <https://doi.org/10.1002/jso.21856>.
- Gall, A.-L., Ruff, M., Kannan, R., Cuniasse, P., Yiotakis, A., Dive, V., Rio, M.-C., Basset, P., and Moras, D. (2001). Crystal structure of the stromelysin-3 (MMP-11) catalytic domain complexed with a phosphinic inhibitor mimicking the transition-state¹¹Edited by R.

- Huber. *Journal of Molecular Biology* 307, 577–586. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4493>.
- Gandini, S., Merzenich, H., Robertson, C., and Boyle, P. (2000). Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *European Journal of Cancer* 36, 636–646. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00022-8).
- Gassmann, A.-S., Gonzalez, M., and Mathelin, C. (2015). [Have female flight attendants an over-risk of breast cancer?]. *Gynecol Obstet Fertil* 43, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2014.09.008>.
- Giorello, M.B., Borzone, F.R., Labovsky, V., Piccioni, F.V., and Chasseing, N.A. (2021). Cancer-Associated Fibroblasts in the Breast Tumor Microenvironment. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 26, 135–155. <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09475-y>.
- Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., and Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736–1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>.
- Gómez-Macías, G.S., Garza-Rodríguez, M.L., Garza-Guajardo, R., Monsiváis-Ovalle, D., Ancer-Rodríguez, J., Barrera-Saldaña, H.A., and Barboza-Quintana, O. (2018). Overexpression of the matrix metalloproteinase 11 gene is a potential biomarker for type 1 endometrial cancer. *Oncol Lett* 16, 1073–1078. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8714>.
- Graeser, M.K., Engel, C., Rhiem, K., Gadzicki, D., Bick, U., Kast, K., Froster, U.G., Schlehe, B., Bechtold, A., Arnold, N., et al. (2009). Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 27, 5887–5892. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.9430>.
- van der Groep, P., van der Wall, E., and van Diest, P.J. (2011). Pathology of hereditary breast cancer. *Cell Oncol (Dordr)* 34, 71–88. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0010-3>.
- Gucalp, A., Traina, T.A., Eisner, J.R., Parker, J.S., Selitsky, S.R., Park, B.H., Elias, A.D., Baskin-Bey, E.S., and Cardoso, F. (2019). Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 173, 37–48. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4921-9>.
- Guérin, E., Ludwig, M.G., Basset, P., and Anglard, P. (1997). Stromelysin-3 induction and interstitial collagenase repression by retinoic acid. Therapeutical implication of receptor-selective retinoids dissociating transactivation and AP-1-mediated transrepression. *J Biol Chem* 272, 11088–11095. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.17.11088>.

- Guha, T., and Malkin, D. (2017). Inherited TP53 Mutations and the Li–Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, a026187. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026187>.
- Guy, C.T., Cardiff, R.D., and Muller, W.J. (1992). Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Molecular and Cellular Biology* 12, 954–961. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.3.954>.
- Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L.A., Huey, B., and King, M.C. (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684–1689. <https://doi.org/10.1126/science.2270482>.
- Han, H.-J., Russo, J., Kohwi, Y., and Kohwi-Shigematsu, T. (2008). SATB1 reprogrammes gene expression to promote breast tumour growth and metastasis. *Nature* 452, 187–193. <https://doi.org/10.1038/nature06781>.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Hannemann, J., Velds, A., Halfwerk, J.B., Kreike, B., Peterse, J.L., and van de Vijver, M.J. (2006). Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Res* 8, R61. <https://doi.org/10.1186/bcr1613>.
- Harbeck, N., and Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet* 389, 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8).
- Harrison, B.T., and Dillon, D.A. (2018). An Update of Mucinous Lesions of the Breast. *Surg Pathol Clin* 11, 61–90. <https://doi.org/10.1016/j.path.2017.09.002>.
- Hassiotou, F., and Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26, 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>.
- Hebbard, Lionel.W., Garlatti, M., Young, L.J.T., Cardiff, R.D., Oshima, R.G., and Ranscht, B. (2008). T-cadherin Supports Angiogenesis and Adiponectin Association with the Vasculature in a Mouse Mammary Tumor Model. *Cancer Res* 68, 1407–1416. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2953>.
- Heesch, A., Maurer, J., Stickeler, E., Beheshti, M., Mottaghy, F.M., and Morgenroth, A. (2020). Development of Radiotracers for Breast Cancer—The Tumor Microenvironment as an Emerging Target. *Cells* 9, 2334. <https://doi.org/10.3390/cells9102334>.

- Hendrick, R.E. (2010). Radiation Doses and Cancer Risks from Breast Imaging Studies. *Radiology* 257, 246–253. <https://doi.org/10.1148/radiol.10100570>.
- Hiraga, T., and Ninomiya, T. (2019). Establishment and characterization of a C57BL/6 mouse model of bone metastasis of breast cancer. *J Bone Miner Metab* 37, 235–242. <https://doi.org/10.1007/s00774-018-0927-y>.
- Hoeflich, A., and Russo, V.C. (2015). Physiology and pathophysiology of IGFBP-1 and IGFBP-2 – Consensus and dissent on metabolic control and malignant potential. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29, 685–700. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.07.002>.
- Hollern, D.P., and Andrechek, E.R. (2014). A genomic analysis of mouse models of breast cancer reveals molecular features of mouse models and relationships to human breast cancer. *Breast Cancer Res* 16, R59. <https://doi.org/10.1186/bcr3672>.
- Hoover, R.G., Gullickson, G., and Kornbluth, J. (2012). Natural killer lytic-associated molecule plays a role in controlling tumor dissemination and metastasis. *Front Immunol* 3, 393. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00393>.
- Hossain, S., Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., Chen, X., Zonderman, A.B., and Wood, R.J. (2019). Vitamin D and breast cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Clin Nutr ESPEN* 30, 170–184. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.12.085>.
- Howard, B.A., and Gusterson, B.A. (2000). Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 119–137. <https://doi.org/10.1023/a:1026487120779>.
- Howell, A., Anderson, A.S., Clarke, R.B., Duffy, S.W., Evans, D.G., Garcia-Closas, M., Gescher, A.J., Key, T.J., Saxton, J.M., and Harvie, M.N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res* 16, 446. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0446-2>.
- Hu, X., Juneja, S.C., Maihle, N.J., and Cleary, M.P. (2002). Leptin--a growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst* 94, 1704–1711. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.22.1704>.
- Hunter, D.J., and Willett, W.C. (1993). Diet, Body Size, and Breast Cancer. *Epidemiologic Reviews* 15, 110–132. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036096>.
- Hunter, D.J., Spiegelman, D., Adami, H.-O., Beeson, L., van den Brandt, P.A., Folsom, A.R., Fraser, G.E., Goldbohm, R.A., Graham, S., Howe, G.R., et al. (1996). Cohort Studies of Fat Intake and the Risk of Breast Cancer — A Pooled Analysis. *New England Journal of Medicine* 334, 356–361. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602083340603>.

- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., Kiyota, N., Takao, S., Kono, S., Nakatsura, T., et al. (2015). Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep* 33, 1837–1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>.
- Inman, J.L., Robertson, C., Mott, J.D., and Bissell, M.J. (2015). Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142, 1028–1042. <https://doi.org/10.1242/dev.087643>.
- Ishizuya-Oka, A., Ueda, S., and Shi, Y.-B. (1996). Transient expression of stromelysin-3 mRNA in the amphibian small intestine during metamorphosis. *Cell Tissue Res* 283, 325–329. <https://doi.org/10.1007/s004410050542>.
- Ishizuya-Oka, A., Li, Q., Amano, T., Damjanovski, S., Ueda, S., and Shi, Y.-B. (2000). Requirement for Matrix Metalloproteinase Stromelysin-3 in Cell Migration and Apoptosis during Tissue Remodeling in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 150, 1177–1188. .
- Jang, H.S., Lal, S., and Greenwood, J.A. (2010). Calpain 2 is Required for Glioblastoma Cell Invasion: Regulation of Matrix Metalloproteinase 2. *Neurochem Res* 35, 1796–1804. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0246-8>.
- Jang, M., Kim, S.S., and Lee, J. (2013). Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp. Mol. Med.* 45, e45. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.85>.
- Javed, A., and Lteif, A. (2013). Development of the Human Breast. *Semin Plast Surg* 27, 5–12. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343989>.
- Jesinger, R.A. (2014). Breast anatomy for the interventionalist. *Tech Vasc Interv Radiol* 17, 3–9. <https://doi.org/10.1053/j.tvir.2013.12.002>.
- Jezierska, A., and Motyl, T. (2009). Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. *Med. Sci. Monit.* 15, 32–40. .
- Johnson, K.C. (2005). Accumulating evidence on passive and active smoking and breast cancer risk. *International Journal of Cancer* 117, 619–628. <https://doi.org/10.1002/ijc.21150>.
- Johnstone, C.N., Smith, Y.E., Cao, Y., Burrows, A.D., Cross, R.S.N., Ling, X., Redvers, R.P., Doherty, J.P., Eckhardt, B.L., Natoli, A.L., et al. (2015). Functional and molecular characterisation of EO771.LMB tumours, a new C57BL/6-mouse-derived model of spontaneously metastatic mammary cancer. *Dis Model Mech* 8, 237–251. <https://doi.org/10.1242/dmm.017830>.
- Jones, G.E. (2020). 1 Anatomy, Physiology, and Aesthetics (Thieme Verlag).

- Jones, J.I., D'Ercole, A.J., Camacho-Hubner, C., and Clemmons, D.R. (1991). Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7481–7485. .
- de Jong, M.M., Nolte, I.M., te Meerman, G.J., van der Graaf, W.T.A., Oosterwijk, J.C., Kleibeuker, J.H., Schaapveld, M., and de Vries, E.G.E. (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 39, 225–242. <https://doi.org/10.1136/jmg.39.4.225>.
- Kannan, R., Ruff, M., Kochins, J.G., Manly, S.P., Stoll, I., El Fahime, M., Noël, A., Foidart, J.M., Rio, M.C., Dive, V., et al. (1999). Purification of active matrix metalloproteinase catalytic domains and its use for screening of specific stromelysin-3 inhibitors. *Protein Expr Purif* 16, 76–83. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1068>.
- Kasper, G., Reule, M., Tschirschmann, M., Dankert, N., Stout-Weider, K., Lauster, R., Schrock, E., Mennerich, D., Duda, G.N., and Lehmann, K.E. (2007). Stromelysin-3 over-expression enhances tumourigenesis in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines: involvement of the IGF-1 signalling pathway. *BMC Cancer* 7, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-12>.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>.
- Key, T.J., Verkasalo, P.K., and Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *The Lancet Oncology* 2, 133–140. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00254-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00254-0).
- Kittaneh, M., Montero, A.J., and Glück, S. (2013). Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark Cancer* 5, 61–70. <https://doi.org/10.4137/BIC.S9455>.
- Klarmann, G.J., Decker, A., and Farrar, W.L. (2008). Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer. *Epigenetics* 3, 59–63. <https://doi.org/10.4161/epi.3.2.5899>.
- Knight, C.H., and Peaker, M. (1982). Development of the mammary gland. *J Reprod Fertil* 65, 521–536. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0650521>.
- Kolkenbrock, H., Orgel, D., Hecker-Kia, A., Noack, W., and Ulbrich, N. (1991). The complex between a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2) and 72-kDa progelatinase is a metalloproteinase inhibitor. *Eur J Biochem* 198, 775–781. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16080.x>.
- Kontomanolis, E.N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., et al. (2020). Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res* 40, 6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>.

- Korkola, J., and Gray, J.W. (2010). Breast cancer genomes — form and function. *Curr Opin Genet Dev* 20, 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.11.005>.
- Kou, Y.-B., Zhang, S.-Y., Zhao, B.-L., Ding, R., Liu, H., and Li, S. (2013). Knockdown of MMP11 Inhibits Proliferation and Invasion of Gastric Cancer Cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 26, 361–370. <https://doi.org/10.1177/039463201302600209>.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel. *Cancer Cell* 13, 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.05.005>.
- Kuchenbaecker, K.B., Hopper, J.L., Barnes, D.R., Phillips, K.-A., Mooij, T.M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., van Leeuwen, F.E., Milne, R.L., Andrieu, N., et al. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* 317, 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>.
- de La Puente-Yagüe, M., Cuadrado-Cenzual, M.A., Ciudad-Cabañas, M.J., Hernández-Cabria, M., and Collado-Yurrita, L. (2018). Vitamin D: And its role in breast cancer. *Kaohsiung J Med Sci* 34, 423–427. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2018.03.004>.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16. <https://doi.org/10.1038/358015a0>.
- Layde, P.M., Webster, L.A., Baughman, A.L., Wingo, P.A., Rubin, G.L., and Ory, H.W. (1989). The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. *Journal of Clinical Epidemiology* 42, 963–973. [https://doi.org/10.1016/0895-4356\(89\)90161-3](https://doi.org/10.1016/0895-4356(89)90161-3).
- Le Naour, A., Rossary, A., and Vasson, M. (2020). EO771, is it a well- characterized cell line for mouse mammary cancer model? Limit and uncertainty. *Cancer Med* 9, 8074–8085. <https://doi.org/10.1002/cam4.3295>.
- Lee, E.Y.H.P., and Muller, W.J. (2010). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>.
- Lefebvre, O., Wolf, C., Limacher, J.M., Hutin, P., Wendling, C., LeMeur, M., Basset, P., and Rio, M.C. (1992). The breast cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed during mouse mammary gland apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 119, 997–1002. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.4.997>.
- Lefebvre, O., Regnier, C., Chenard, M.P., Wendling, C., Chambon, P., Basset, P., and Rio, M.C. (1995). Developmental expression of mouse stromelysin-3 mRNA. *Development* 121, 947–955. .

- Lehti, K., Lohi, J., Valtanen, H., and Keski-Oja, J. (1998). Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface. *Biochem J* 334 (Pt 2), 345–353. <https://doi.org/10.1042/bj3340345>.
- Leonardi, G.C., Rapisarda, V., Marconi, A., Scalisi, A., Catalano, F., Proietti, L., Travali, S., Libra, M., and Fenga, C. (2012). Correlation of the risk of breast cancer and disruption of the circadian rhythm (Review). *Oncol Rep* 28, 418–428. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1839>.
- Levine, A.J. (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* 88, 323–331. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81871-1).
- Levy, A., Zucman, J., Delattre, O., Mattei, M.-G., Rio, M.-C., and Basset, P. (1992). Assignment of the human stromelysin 3 (STMY3) gene to the q11.2 region of chromosome 22. *Genomics* 13, 881–883. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90175-R](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90175-R).
- Li, W.-M., Wei, Y.-C., Huang, C.-N., Ke, H.-L., Li, C.-C., Yeh, H.-C., Chang, L.-L., Huang, C.-H., Li, C.-F., and Wu, W.-J. (2016). Matrix metalloproteinase-11 as a marker of metastasis and predictor of poor survival in urothelial carcinomas. *J Surg Oncol* 113, 700–707. <https://doi.org/10.1002/jso.24195>.
- Lijnen, H.R., Van Hoef, B., Vanlinthout, I., Verstreken, M., Rio, M.-C., and Collen, D. (1999). Accelerated Neointima Formation After Vascular Injury in Mice With Stromelysin-3 (MMP-11) Gene Inactivation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19, 2863–2870. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.12.2863>.
- Lijnen, H.R., Van, H.B., Frederix, L., Rio, M.C., and Collen, D. (2002). Adipocyte hypertrophy in stromelysin-3 deficient mice with nutritionally induced obesity. *Thrombosis and Haemostasis* 87, 530–535. .
- Lim, E., Modi, K.D., and Kim, J. (2009). In vivo Bioluminescent Imaging of Mammary Tumors Using IVIS Spectrum. *J Vis Exp* 1210. <https://doi.org/10.3791/1210>.
- Lin, E.Y., Jones, J.G., Li, P., Zhu, L., Whitney, K.D., Muller, W.J., and Pollard, J.W. (2003). Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am. J. Pathol.* 163, 2113–2126. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63568-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63568-7).
- Lin, Y.-W., Weng, X.-F., Huang, B.-L., Guo, H.-P., Xu, Y.-W., and Peng, Y.-H. (2021). IGFBP-1 in cancer: expression, molecular mechanisms, and potential clinical implications. *Am J Transl Res* 13, 813–832. .

- Lipworth, L., Bailey, L.R., and Trichopoulos, D. (2000). History of Breast-Feeding in Relation to Breast Cancer Risk: a Review of the Epidemiologic Literature. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 92, 302–312. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.4.302>.
- Liu, X., Taftaf, R., Kawaguchi, M., Chang, Y.-F., Chen, W., Entenberg, D., Zhang, Y., Gerratana, L., Huang, S., Patel, D.B., et al. (2019). Homophilic CD44 interactions mediate tumor cell aggregation and polyclonal metastasis in patient-derived breast cancer models. *Cancer Discov* 9, 96–113. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0065>.
- Löffek, S., Schilling, O., and Franzke, C.-W. (2011). Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European Respiratory Journal* 38, 191–208. <https://doi.org/10.1183/09031936.00146510>.
- López-Otín, C., and Bond, J.S. (2008). Proteases: Multifunctional Enzymes in Life and Disease. *J Biol Chem* 283, 30433–30437. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800035200>.
- Ludwig, M.G., Basset, P., and Anglard, P. (2000). Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors. *J Biol Chem* 275, 39981–39990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007529200>.
- Luo, D., Guérin, E., Ludwig, M.G., Stoll, I., Basset, P., and Anglard, P. (1999). Transcriptional induction of stromelysin-3 in mesodermal cells is mediated by an upstream CCAAT/enhancer-binding protein element associated with a DNase I-hypersensitive site. *J Biol Chem* 274, 37177–37185. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.37177>.
- Ma, X.-J., Dahiya, S., Richardson, E., Erlander, M., and Sgroi, D.C. (2009). Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 11, R7. <https://doi.org/10.1186/bcr2222>.
- Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 533–557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>.
- MacMahon, B. (2006). Epidemiology and the causes of breast cancer. *International Journal of Cancer* 118, 2373–2378. <https://doi.org/10.1002/ijc.21404>.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1999). PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends in Cell Biology* 9, 125–128. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(99\)01519-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(99)01519-6).
- Magnusson, C., Baron, J.A., Correia, N., Bergström, R., Adami, H.-O., and Persson, I. (1999). Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy. *International Journal of Cancer* 81, 339–344. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19990505\)81:3<339::AID-IJC5>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19990505)81:3<339::AID-IJC5>3.0.CO;2-6).

- Mai, P.L., Best, A.F., Peters, J.A., DeCastro, R.M., Khincha, P.P., Loud, J.T., Bremer, R.C., Rosenberg, P.S., and Savage, S.A. (2016). Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer* 122, 3673–3681. <https://doi.org/10.1002/cncr.30248>.
- Malone, K.E. (1993). Diethylstilbestrol (DES) and Breast Cancer. *Epidemiologic Reviews* 15, 108–109. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036095>.
- Mañes, S., Mira, E., Barbacid, M. del M., Ciprés, A., Fernández-Resa, P., Buesa, J.M., Mérida, I., Aracil, M., Márquez, G., and Martínez-A, C. (1997). Identification of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1 as a Potential Physiological Substrate for Human Stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* 272, 25706–25712. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25706>.
- Maquoi, E., Polette, M., Nawrocki, B., Bischof, P., Noël, A., Pintiaux, A., Santavicca, M., Schaaps, J.-P., Pijnenborg, R., Birembaut, P., et al. (1997). Expression of stromelysin-3 in the human placenta and placental bed. *Placenta* 18, 277–285. [https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(97\)80062-8](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(97)80062-8).
- Maquoi, E., Noël, A., Frankenhe, F., Angliker, H., Murphy, G., and Foidart, J.-M. (1998). Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Letters* 424, 262–266. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00187-2).
- von Marschall, Z., Riecken, E.O., and Rosewicz, S. (1998). Stromelysin 3 is overexpressed in human pancreatic carcinoma and regulated by retinoic acid in pancreatic carcinoma cell lines. *Gut* 43, 692–698. <https://doi.org/10.1136/gut.43.5.692>.
- Masson, R., Lefebvre, O., Noël, A., Fahime, M.E., Chenard, M.-P., Wendling, C., Kebers, F., LeMeur, M., Dierich, A., Foidart, J.-M., et al. (1998). In Vivo Evidence That the Stromelysin-3 Metalloproteinase Contributes in a Paracrine Manner to Epithelial Cell Malignancy. *The Journal of Cell Biology* 140, 1535–1541. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.6.1535>.
- Mathew, S., Fu, L., Hasebe, T., Ishizuya-Oka, A., and Shi, Y.-B. (2010). Tissue-dependent induction of apoptosis by matrix metalloproteinase stromelysin-3 during amphibian metamorphosis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 90, 55–66. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20170>.
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., Evans, D.G., Izatt, L., Eeles, R.A., Adlard, J., et al. (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation

- carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst* 105, 812–822. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt095>.
- McCuaig, R., Wu, F., Dunn, J., Rao, S., and Dahlstrom, J.E. (2017). The biological and clinical significance of stromal-epithelial interactions in breast cancer. *Pathology* 49, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2016.10.009>.
- McNally, S., and Stein, T. (2017). Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. *Methods Mol Biol* 1501, 1–17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6475-8_1.
- McTiernan, A., Kooperberg, C., White, E., Wilcox, S., Coates, R., Adams-Campbell, L.L., Woods, N., and Ockene, J. (2003). Recreational Physical Activity and the Risk of Breast Cancer in Postmenopausal WomenThe Women’s Health Initiative Cohort Study. *JAMA* 290, 1331–1336. <https://doi.org/10.1001/jama.290.10.1331>.
- Mehraj, U., Dar, A.H., Wani, N.A., and Mir, M.A. (2021). Tumor microenvironment promotes breast cancer chemoresistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 87, 147–158. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04222-w>.
- Menezes, M.E., Das, S.K., Emdad, L., Windle, J.J., Wang, X.-Y., Sarkar, D., and Fisher, P.B. (2014). Genetically Engineered Mice as Experimental Tools to Dissect the Critical Events in Breast Cancer. *Adv Cancer Res* 121, 331–382. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800249-0.00008-1>.
- Mester, J., and Eng, C. (2015). Cowden syndrome: recognizing and managing a not-so-rare hereditary cancer syndrome. *J Surg Oncol* 111, 125–130. <https://doi.org/10.1002/jso.23735>.
- Metcalfe, K., Gershman, S., Lynch, H.T., Ghadirian, P., Tung, N., Kim-Sing, C., Olopade, O.I., Domchek, S., McLennan, J., Eisen, A., et al. (2011). Predictors of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer* 104, 1384–1392. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.120>.
- Min, K.-W., Kim, D.-H., Do, S.-I., Pyo, J.-S., Kim, K., Chae, S.W., Sohn, J.H., Oh, Y.-H., Kim, H.J., Choi, S.H., et al. (2013a). Diagnostic and Prognostic Relevance of MMP-11 Expression in the Stromal Fibroblast-Like Cells Adjacent to Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Ann Surg Oncol* 20, 433–442. <https://doi.org/10.1245/s10434-012-2734-3>.
- Min, Y., Bae, S.Y., Lee, H.-C., Lee, J.H., Kim, M., Kim, J., Lee, S.K., Kil, W.H., Kim, S.W., Lee, J.E., et al. (2013b). Tubular Carcinoma of the Breast: Clinicopathologic Features and Survival Outcome Compared with Ductal Carcinoma In Situ. *J Breast Cancer* 16, 404–409. <https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.4.404>.

- Mittal, S., Brown, N.J., and Holen, I. (2018). The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 18, 227–243. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1439382>.
- Molière, S., and Mathelin, C. (2020). The Cowden Syndrome. *N Engl J Med* 382, e29. <https://doi.org/10.1056/NEJMicm1910478>.
- Monea, S., Lehti, K., Keski-Oja, J., and Mignatti, P. (2002). Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 192, 160–170. <https://doi.org/10.1002/jcp.10126>.
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., and Tryggvason, K. (2002). Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7414–7419. <https://doi.org/10.1073/pnas.102185399>.
- Motrescu, E.R., and Rio, M.-C. (2008a). Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biological Chemistry* 389, 1037–1041. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.110>.
- Motrescu, E.R., and Rio, M.-C. (2008b). Cancer cells, adipocytes and matrix metalloproteinase 11: a vicious tumor progression cycle. *Biological Chemistry* 389, 1037–1041. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.110>.
- Motrescu, E.R., Blaise, S., Etique, N., Messaddeq, N., Chenard, M.-P., Stoll, I., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2008). Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* 27, 6347–6355. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.218>.
- Murayama, T., and Gotoh, N. (2019). Patient-Derived Xenograft Models of Breast Cancer and Their Application. *Cells* 8, 621. <https://doi.org/10.3390/cells8060621>.
- Murphy, G., Segain, J.P., O'Shea, M., Cockett, M., Ioannou, C., Lefebvre, O., Chambon, P., and Basset, P. (1993). The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem* 268, 15435–15441. .
- Nagy, J.A., Chang, S.-H., Shih, S.-C., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the Tumor Vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36, 321–331. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1253454>.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.-P., Tong, F., et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>.

- Newman, B., Austin, M.A., Lee, M., and King, M.C. (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3044–3048. .
- Nieman, K.M., Kenny, H.A., Penicka, C.V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M.R., Romero, I.L., Carey, M.S., Mills, G.B., Hotamisligil, G.S., et al. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature Medicine* 17, 1498–1503. <https://doi.org/10.1038/nm.2492>.
- Noël, A., Santavicca, M., Stoll, I., L'Hoir, C., Staub, A., Murphy, G., Rio, M.-C., and Basset, P. (1995). Identification of Structural Determinants Controlling Human and Mouse Stromelysin-3 Proteolytic Activities. *J. Biol. Chem.* 270, 22866–22872. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.39.22866>.
- Noël, A., Boulay, A., Kebers, F., Kannan, R., Hajitou, A., Calberg-Bacq, C.-M., Basset, P., Rio, M.-C., and Foidart (2000). Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity. *Oncogene* 19, 1605–1612. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203465>.
- Overall, C.M., and Blobel, C.P. (2007). In search of partners: linking extracellular proteases to substrates. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 245–257. <https://doi.org/10.1038/nrm2120>.
- Overall, C.M., and Dean, R.A. (2006). Degradomics: Systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25, 69–75. <https://doi.org/10.1007/s10555-006-7890-0>.
- Paine, I.S., and Lewis, M.T. (2017). The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 22, 93–108. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9372-0>.
- Pal, S.K., Lau, S.K., Kruper, L., Nwoye, U., Garberoglio, C., Gupta, R.K., Paz, B., Vora, L., Guzman, E., Artinyan, A., et al. (2010). Papillary Carcinoma of the Breast: An Overview. *Breast Cancer Res Treat* 122, 637–645. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0961-5>.
- Pandya, S., and Moore, R.G. (2011). Breast Development and Anatomy. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 54, 91–95. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318207ffe9>.
- Pang, L., Wang, D.-W., Zhang, N., Xu, D.-H., and Meng, X.-W. (2016). Elevated serum levels of MMP-11 correlate with poor prognosis in colon cancer patients. *Cancer Biomarkers* 16, 599–607. <https://doi.org/10.3233/CBM-160601>.
- Panth, K.M., van den Beucken, T., Biemans, R., Liewes, N.G., Weber, M., Losen, M., Yaromina, A., Dubois, L.J., and Lambin, P. (2016). In vivo optical imaging of MMP2

- immuno protein antibody: tumor uptake is associated with MMP2 activity. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep22198>.
- Park, I., Kim, J., Kim, M., Bae, S.Y., Lee, S.K., Kil, W.H., Lee, J.E., and Nam, S.J. (2013). Comparison of the characteristics of medullary breast carcinoma and invasive ductal carcinoma. *J Breast Cancer* 16, 417–425. <https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.4.417>.
- Pathak, D.R., Speizer, F.E., Willett, W.C., Rosner, B., and Lipnick, R.J. (1986). Parity and breast cancer risk: Possible effect on age at diagnosis. *International Journal of Cancer* 37, 21–25. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910370105>.
- Patterton, D., Hayes, W.P., and Shi, Y.-B. (1995). Transcriptional Activation of the Matrix Metalloproteinase Gene stromelysin-3 Coincides with Thyroid Hormone-Induced Cell Death during Frog Metamorphosis. *Developmental Biology* 167, 252–262. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.1021>.
- Pei, D., and Weiss, S.J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, 244–247. <https://doi.org/10.1038/375244a0>.
- Pei, D., Majmudar, G., and Weiss, S.J. (1994). Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J. Biol. Chem.* 269, 25849–25855. .
- Pharoah, P.D.P., Day, N.E., Duffy, S., Easton, D.F., and Ponder, B.A.J. (1997). Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* 71, 800–809. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970529\)71:5<800::AID-IJC18>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970529)71:5<800::AID-IJC18>3.0.CO;2-B).
- Pilarski, R., Burt, R., Kohlman, W., Pho, L., Shannon, K.M., and Swisher, E. (2013). Cowden Syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: Systematic Review and Revised Diagnostic Criteria. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 105, 1607–1616. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt277>.
- Pillay, J., and Davis, T.J. (2022). Physiology, Lactation. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Pollak, M. (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 8, 915–928. <https://doi.org/10.1038/nrc2536>.
- Polyak, K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest* 117, 3155–3163. <https://doi.org/10.1172/JCI33295>.
- Poudel, B., Kim, D.-K., Ki, H.-H., Kwon, Y.-B., Lee, Y.-M., and Kim, D.-K. (2014). Downregulation of ERK signaling impairs U2OS osteosarcoma cell migration in collagen matrix by suppressing MMP9 production. *Oncology Letters* 7, 215–218. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1655>.

- Provenzano, E., Ulaner, G.A., and Chin, S.-F. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin* 13, 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>.
- Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>.
- Quesada, V., Ordóñez, G.R., Sánchez, L.M., Puente, X.S., and López-Otín, C. (2009). The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res* 37, 239–243. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn570>.
- Ra, H.-J., and Parks, W.C. (2007). Control of Matrix Metalloproteinase Catalytic Activity. *Matrix Biol* 26, 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.07.001>.
- Rakashanda, S., Rana, F., Rafiq, S., Masood, A., and Amin, S. (2012). Role of proteases in cancer: A review. *BMBR* 7, 90–101. <https://doi.org/10.5897/BMBR11.027>.
- Reynolds, P. (2013). Smoking and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 18, 15–23. <https://doi.org/10.1007/s10911-012-9269-x>.
- Rio, M.-C. (2002). Stromelysin-3, a Particular Member of the Matrix Metalloproteinase Family. In *Proteases and Their Inhibitors in Cancer Metastasis*, J.-M. Foidart, and R.J. Muschel, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 81–107.
- Rio, M.C. (2005). From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation. *Biochimie* 87, 299–306. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.016>.
- Rio, M.-C. (2011). The Role of Cancer-Associated Adipocytes (CAA) in the Dynamic Interaction Between the Tumor and the Host. In *Tumor-Associated Fibroblasts and Their Matrix: Tumor Stroma*, M.M. Mueller, and N.E. Fusenig, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 111–123.
- Rio, M.C., Lefebvre, O., Santavicca, M., Noël, A., Chenard, M.P., Anglard, P., Byrne, J.A., Okada, A., Régnier, C.H., Masson, R., et al. (1996). Stromelysin-3 in the biology of the normal and neoplastic mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1, 231–240. <https://doi.org/10.1007/BF02013646>.
- Ronckers, C.M., Erdmann, C.A., and Land, C.E. (2004). Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res* 7, 21. <https://doi.org/10.1186/bcr970>.
- Rossi, M.L., Rehman, A.A., and Gondi, C.S. (2014). Therapeutic options for the management of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 20, 11142–11159. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i32.11142>.
- Rouyer, N., Wolf, C., Chenard, M.P., Rio, M.C., Chambon, P., Bellocq, J.P., and Basset, P. (1994). Stromelysin-3 gene expression in human cancer: an overview. *Invasion Metastasis* 14, 269–275. .

- Russo, J., and Russo, I.H. (2004). Development of the human breast. *Maturitas* 49, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2004.04.011>.
- Russo, V.C., Gluckman, P.D., Feldman, E.L., and Werther, G.A. (2005). The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* 26, 916–943. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0024>.
- Sancho-Garnier, H., and Colonna, M. (2019). Épidémiologie des cancers du sein. *La Presse Médicale* 48, 1076–1084. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.09.022>.
- Santavicca, M., Noel, A., Angliker, H., Stoll, I., Segain, J.P., Anglard, P., Chretien, M., Seidah, N., and Basset, P. (1996). Characterization of structural determinants and molecular mechanisms involved in pro-stromelysin-3 activation by 4-aminophenylmercuric acetate and furin-type convertases. *Biochem J* 315, 953–958. .
- Schernhammer, E.S., Holly, J.M., Pollak, M.N., and Hankinson, S.E. (2005). Circulating levels of insulin-like growth factors, their binding proteins, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 699–704. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0561>.
- Schönbeck, U., Mach, F., Sukhova, G.K., Atkinson, E., Levesque, E., Herman, M., Graber, P., Basset, P., and Libby, P. (1999). Expression of Stromelysin-3 in Atherosclerotic Lesions: Regulation via CD40–CD40 Ligand Signaling In Vitro and In Vivo. *J Exp Med* 189, 843–853. .
- Sflomos, G., Dormoy, V., Metsalu, T., Jeitziner, R., Battista, L., Scabia, V., Raffoul, W., Delaloye, J.-F., Treboux, A., Fiche, M., et al. (2016). A Preclinical Model for ER α -Positive Breast Cancer Points to the Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response. *Cancer Cell* 29, 407–422. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.002>.
- Shannon, K.M., and Chittenden, A. (2012). Genetic Testing by Cancer Site: Breast. *The Cancer Journal* 18, 310–319. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318260946f>.
- Shapiro, S., Rosenberg, L., Hoffman, M., Truter, H., Cooper, D., Rao, S., Dent, D., Gudgeon, A., Zyl, J. van, Katzenellenbogen, J., et al. (2000). Risk of Breast Cancer in Relation to the Use of Injectable Progestogen Contraceptives and Combined Estrogen/Progestogen Contraceptives. *American Journal of Epidemiology* 151, 396–403. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a010219>.
- Shi, Y.-B., Fu, L., Hasebe, T., and Ishizuya-Oka, A. (2007). Regulation of ECM remodeling and cell fate determination by matrix metalloproteinase strmoelysin-3 during thyroid

- hormone-dependent postembryonic development. *Pharmacol Ther* 116, 391–400. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.07.005>.
- Shibata, H., Komura, S., Yamada, Y., Sankoda, N., Tanaka, A., Ukai, T., Kabata, M., Sakurai, S., Kuze, B., Woltjen, K., et al. (2018). In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development. *Nat Commun* 9, 2081. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04449-5>.
- Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., and Takeyama, H. (2015). Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers (Basel)* 7, 2443–2458. <https://doi.org/10.3390/cancers7040902>.
- Shoshani, O., and Zipori, D. (2011). Mammalian cell dedifferentiation as a possible outcome of stress. *Stem Cell Rev* 7, 488–493. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9231-0>.
- Shum, B.O.V., Mackay, C.R., Gorgun, C.Z., Frost, M.J., Kumar, R.K., Hotamisligil, G.S., and Rolph, M.S. (2006). The adipocyte fatty acid-binding protein aP2 is required in allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 116, 2183–2192. <https://doi.org/10.1172/JCI24767>.
- Sirotnak, F.M., DeGraw, J.I., Schmid, F.A., Goutas, L.J., and Moccio, D.M. (1984). New folate analogs of the 10-deaza-aminopterin series. Further evidence for markedly increased antitumor efficacy compared with methotrexate in ascitic and solid murine tumor models. *Cancer Chemother Pharmacol* 12, 26–30. .
- Skoglund, J., Emterling, A., Arbman, G., Anglard, P., and Sun, X.-F. (2004). Clinicopathological Significance of Stromelysin-3 Expression in Colorectal Cancer. *OCL* 67, 67–72. <https://doi.org/10.1159/000080288>.
- Smathers, R.L., and Petersen, D.R. (2011). The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics* 5, 170–191. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-3-170>.
- Smith-Warner, S.A., Spiegelman, D., Yaun, S.-S., van den Brandt, P.A., Folsom, A.R., Goldbohm, R.A., Graham, S., Holmberg, L., Howe, G.R., Marshall, J.R., et al. (1998). Alcohol and Breast Cancer in Women A Pooled Analysis of Cohort Studies. *JAMA* 279, 535–540. <https://doi.org/10.1001/jama.279.7.535>.
- Soysal, S.D., Tzankov, A., and Muenst, S.E. (2015). Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *PAT* 82, 142–152. <https://doi.org/10.1159/000430499>.
- Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>.
- Stines, J., and Tristant, H. (2005). The normal breast and its variations in mammography. *Eur J Radiol* 54, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2004.11.017>.

- Sugiura, K., and Stock, C.C. (1952). Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis (2-chloroethyl)amine and 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl -5-hydroxy-6-methylpyridine on the growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer* 5, 382–402. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195203\)5:2<382::aid-cncr2820050229>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195203)5:2<382::aid-cncr2820050229>3.0.co;2-3).
- Sundel, R.P. (2015). Kawasaki disease. *Rheum Dis Clin North Am* 41, 63–73, viii. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2014.09.010>.
- Tan, B., Jaulin, A., Bund, C., Outilaft, H., Wendling, C., Chenard, M.-P., Alpy, F., Cicek, A.E., Namer, I.J., Tomasetto, C., et al. (2020). Matrix Metalloproteinase-11 Promotes Early Mouse Mammary Gland Tumor Growth through Metabolic Reprogramming and Increased IGF1/AKT/FoxO1 Signaling Pathway, Enhanced ER Stress and Alteration in Mitochondrial UPR. *Cancers* 12, 2357. <https://doi.org/10.3390/cancers12092357>.
- Tan, D.S.P., Marchiò, C., and Reis-Filho, J.S. (2008). Hereditary breast cancer: from molecular pathology to tailored therapies. *Journal of Clinical Pathology* 61, 1073–1082. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.057950>.
- Tan, J., Buache, E., Chenard, M.-P., Dali-Youcef, N., and Rio, M.-C. (2011). Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol* 55, 851–859. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113365jt>.
- Tan, J., Buache, E., Alpy, F., Daguene, E., Tomasetto, C.-L., Ren, G.-S., and Rio, M.-C. (2014). Stromal matrix metalloproteinase-11 is involved in the mammary gland postnatal development. *Oncogene* 33, 4050–4059. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.434>.
- Tokunaga, M., Land, C.E., Tokuoka, S., Nishimori, I., Soda, M., and Akiba, S. (1994). Incidence of Female Breast Cancer among Atomic Bomb Survivors, 1950-1985. *Radiation Research* 138, 209–223. <https://doi.org/10.2307/3578591>.
- Toth, M., Hernandez-Barrantes, S., Osenkowski, P., Bernardo, M.M., Gervasi, D.C., Shimura, Y., Meroueh, O., Kotra, L.P., Gálvez, B.G., Arroyo, A.G., et al. (2002). Complex Pattern of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Shedding: REGULATION BY AUTOCATALYTIC CELL SURFACE INACTIVATION OF ACTIVE ENZYME *. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26340–26350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200655200>.
- Truchet, S., and Honvo-Houeto, E. (2015). Indirect Immunofluorescence on Frozen Sections of Mouse Mammary Gland. *Journal of Visualized Experiments* <http://www.jove.com/video/53179>. <https://doi.org/10.3791/53179>.

- Tsang, J.Y.S., and Tse, G.M. (2020). Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv Anat Pathol* 27, 27–35. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000232>.
- Valdivia, A., Peralta, R., Matute-González, M., García Cebada, J.M., Casasola, I., Jiménez-Medrano, C., Aguado-Pérez, R., Villegas, V., González-Bonilla, C., Manuel-Apolinar, L., et al. (2011). Co-expression of metalloproteinases 11 and 12 in cervical scrapes cells from cervical precursor lesions. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 674–682. .
- Vatten, L.J., Nilsen, T.I.L., Tretli, S., Trichopoulos, D., and Romundstad, P.R. (2005). Size at birth and risk of breast cancer: Prospective population-based study. *International Journal of Cancer* 114, 461–464. <https://doi.org/10.1002/ijc.20726>.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research* 92, 827–839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>.
- Voncken, J.W. (2011). Genetic modification of the mouse: general technology - pronuclear and blastocyst injection. *Methods Mol Biol* 693, 11–36. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-974-1_2.
- Waks, A.G., and Winer, E.P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA* 321, 316. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.20751>.
- Wang, H., Arun, B.K., Wang, H., Fuller, G.N., Zhang, W., Middleton, L.P., and Sahin, A.A. (2008). IGFBP2 and IGFBP5 overexpression correlates with the lymph node metastasis in T1 breast carcinomas. *Breast J* 14, 261–267. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2008.00572.x>.
- Wang, Y., Xia, Y., and Lu, Z. (2018). Metabolic features of cancer cells. *Cancer Commun (Lond)* 38, 65. <https://doi.org/10.1186/s40880-018-0335-7>.
- Wojtanik, K.M., and Liscum, L. (2003). The transport of low density lipoprotein-derived cholesterol to the plasma membrane is defective in NPC1 cells. *J Biol Chem* 278, 14850–14856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300488200>.
- Wojtowicz-Praga, S.M., Dickson, R.B., and Hawkins, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs* 15, 61–75. <https://doi.org/10.1023/a:1005722729132>.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 378, 789–792. <https://doi.org/10.1038/378789a0>.

- Wu, D., Li, M., Wang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Pan, H., and Qu, P. (2014). microRNA- 145 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase- 11 in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports* 10, 393–398. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2149>.
- Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., and Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology & Oncology* 12, 95. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0778-6>.
- Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22, 1393–1398. <https://doi.org/10.1038/nbt1026>.
- Xing, Y., Zhao, S., Zhou, B.P., and Mi, J. (2015). Metabolic reprogramming of the tumour microenvironment. *The FEBS Journal* 282, 3892–3898. <https://doi.org/10.1111/febs.13402>.
- Yan, D., Dai, H., and Liu, J.-W. (2011). Serum levels of MMP-11 correlate with clinical outcome in Chinese patients with advanced gastric adenocarcinoma. *BMC Cancer* 11, 151. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-151>.
- Yonemori, M., Seki, N., Yoshino, H., Matsushita, R., Miyamoto, K., Nakagawa, M., and Enokida, H. (2016). Dual tumor- suppressors miR- 139- 5p and miR- 139- 3p targeting matrix metalloproteinase 11 in bladder cancer. *Cancer Sci* 107, 1233–1242. <https://doi.org/10.1111/cas.13002>.
- Yoshida, D., Piepmeyer, J.M., Bergenheim, T., Henriksson, R., and Teramoto, A. (1998). Suppression of matrix metalloproteinase-2-mediated cell invasion in U87MG, human glioma cells by anti-microtubule agent: in vitro study. *British Journal of Cancer* 77, 21–25. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.4>.
- Zhang, X., Claerhout, S., Pratt, A., Dobrolecki, L.E., Petrovic, I., Lai, Q., Landis, M.D., Wiechmann, L., Schiff, R., Giuliano, M., et al. (2013). A Renewable Tissue Resource of Phenotypically Stable, Biologically and Ethnically Diverse, Patient-derived Human Breast Cancer Xenograft (PDX) Models. *Cancer Res* 73, 4885–4897. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4081>.
- Zhang, X., Zhang, X., Huang, S., Huang, S., Guo, J., Guo, J., Zhou, L., Zhou, L., You, L., You, L., et al. (2016). Insights into the distinct roles of MMP-11 in tumor biology and future therapeutics (Review). *International Journal of Oncology* 48, 1783–1793. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3400>.
- Zhao, Z.-S., Chu, Y.-Q., Ye, Z.-Y., Wang, Y.-Y., and Tao, H.-Q. (2010). Overexpression of matrix metalloproteinase 11 in human gastric carcinoma and its clinicopathologic

significance. Human Pathology 41, 686–696.

<https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.10.010>.

Ziegler, R.G., Hoover, R.N., Pike, M.C., Hildesheim, A., Nomura, A.M.Y., West, D.W., Wu-Williams, A.H., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., Rosenthal, J.F., et al. (1993). Migration Patterns and Breast Cancer Risk in Asian-American Women. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 85, 1819–1827. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.22.1819>.

Amélie JAULIN

Etude du mécanisme d'action de la MMP11 dans le cancer du sein

Notre équipe a identifié la métalloprotéase matricielle 11 (MMP11) comme étant une protéase qui participe à la progression tumorale par son activité protéolytique. Mes travaux de thèse ont permis d'apporter des éléments de compréhension sur le mécanisme d'action de la MMP11 dans la progression tumorale du cancer du sein par des approches *in vitro* et *in vivo*. Une étude d'interaction fonctionnelle a révélé que la MMP11 semble avoir une action protéolytique sur la MMP2, une autre MMP fonctionnellement associée aux phénomènes invasifs rencontrés lors de la progression tumorale. L'étude fonctionnelle de la MMP11 dans le cancer sur différents modèles précliniques de cancérogenèse mammaire a montré que la MMP11 favorise la croissance tumorale en intervenant dans plusieurs voies de signalisation impliquées dans la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses, leur donnant ainsi un avantage de survie et des propriétés prolifératives. Plus précisément, la MMP11 sécrétée par les adipocytes de la glande mammaire favoriserait la croissance tumorale en remodelant le microenvironnement tumoral. A long terme, la compréhension détaillée du mécanisme d'action moléculaire de la MMP11 permettra la mise au point d'une thérapie ciblée contre la MMP11.

Mots-clés : MMP11, cancer du sein, interaction fonctionnelle, progression tumorale, microenvironnement tumoral

Our team had identified matrix metalloproteinase 11 (MMP11) as a protease participating to tumor progression by using its proteolytic activity. My thesis work has provided insights into the mechanism of action of MMP11 in breast cancer tumor progression through *in vitro* and *in vivo* approaches. A functional interaction study revealed that MMP11 has a potential proteolytic action on MMP2, another MMP functionally associated with invasive phenomena encountered during tumor progression. The functional study of MMP11 in different preclinical models of breast carcinogenesis has shown that MMP11 promotes tumor growth by acting on several signaling pathways involved in the metabolic reprogramming of cancer cells, thus sustaining survival and proliferation. Specifically, MMP11 secreted by mammary gland adipocytes could promote tumor growth by remodeling the tumor microenvironment. In the long term, a detailed understanding of the molecular mechanism of action of MMP11 will allow the development of a targeted therapy against MMP11.

Key words: MMP11, breast cancer, functional interaction, tumor progression, tumor microenvironment