

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE  
UFR SCIENCES EXACTES ET NATURELLES**

**THESE**

**Présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne**

**Spécialité : Biochimie**

Soutenue publiquement le 8 décembre 2006

par

**Brice SID**

---

**Régulation de la protéolyse extracellulaire par LRP et la  
thrombospondine-1 lors de l'invasion tumorale :  
application au carcinome folliculaire thyroïdien.**

---

**Membres du Jury**

**Président :**

W. Hornebeck, Directeur de Recherche CNRS, Reims

**Rapporteurs :**

G. Barlovatz-Meimon, Professeur des Universités, Evry

D. Vivien, Professeur des Universités, Caen

**Examineur :**

G. Bellon, Maître de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier, Reims

**Directeur de thèse :**

L. Martiny, Professeur des Universités, Reims

Je remercie ici les Professeurs François-Xavier MAQUART, directeur de l'Unité CNRS 6198 et Bernard HAYE, directeur du laboratoire de Biochimie à mon arrivée en thèse, pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires et de m'avoir accordé leur confiance. Merci également au premier pour m'avoir offert l'opportunité de financer ma fin de thèse et au second pour la petite Fiat.

Je tiens à remercier le Professeur Laurent MARTINY, mon directeur de thèse et actuel directeur du laboratoire de Biochimie, pour avoir dirigé ce travail avec une grande disponibilité et une très grande patience. Puisses tu trouver ici mes remerciements infinis et mon plus grand respect.

Je remercie les Docteurs Georges BELLON et William HORNEBECK pour leurs excellents et précieux conseils et leurs avis éclairés tout au long de ce travail de thèse. Je les remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je tiens à remercier les Professeurs Georgia BARLOVATZ-MEIMON et Denis VIVIEN pour avoir accepté de rapporter ce travail, pour y avoir apporté des corrections claires et précises afin d'améliorer la qualité et la compréhension de ce manuscrit. Je les remercie également pour la discussion qu'ils ont animée lors de la soutenance de ma thèse et qui a contribué à l'ouverture de nouvelles perspectives à ce travail.

Je remercie très sincèrement les Docteurs Nathalie DELORME et Stéphane DEDIEU pour leur aide et leurs précieux conseils, respectivement en début et fin de thèse, et sans lesquels, peut-être, rien n'aurait été possible.

Je remercie également Laetitia PARENT, Benoît LANGLOIS et le docteur Hervé SARTELET pour leurs précieux aides techniques et notamment la purification de la TSP-1, ainsi que les Docteurs Jérôme DEVY et Hervé KAPLAN pour les analyses en microscopie confocale.

Enfin, je livre d'immenses remerciements à l'ensemble des personnels de l'Unité CNRS 6198, avec une mention particulière pour mes "collègues de bureau" Francine et Fred, ainsi qu'à mon "collègue de déboire" Dude. Gros bisous à Elise, Christelle et Charlotte. Merci à tous pour ces années...

**ABBREVIATIONS**

<b><math>\alpha</math>2-M</b>	alpha 2 Macroglobuline
<b>ADAM</b>	A Disintegrin And Metalloproteinase
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ADNc</b>	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
<b>AP-1</b>	Activator Protein-1
<b>ApoE</b>	Apolipoprotéine E
<b>APP</b>	Amyloid Protein Precursor
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>ATF</b>	Amino Terminal Fragment
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>BM-40</b>	Basement Membrane protein of 40 kDa
<b>BSA</b>	Bovin Serum Albumin
<b>CBD</b>	Collagen Binding Domain
<b>COMP</b>	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
<b>Dab1</b>	Disable-1
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>dNTP</b>	Désoxynucléotide triphosphate
<b>DO</b>	Densité Optique
<b>dsRNA</b>	ARN double brin
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamino tétraacétique
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EGTA</b>	Acide éthylène glycol bis (beta-amino éthyl éther)-N,N,N',N'-tétra acétique
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<b>ERK</b>	Extracellular signal Regulated Kinase
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>FTC</b>	Follicular Thyroid Carcinoma
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>GAPDH</b>	Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HMW uPA</b>	High Molecular Weight form of uPA
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>HSPG</b>	Heparan Sulfate ProteoGlycann
<b>HUVEC</b>	Human Umbilical Vascular Endothelial Cells
<b>IAP</b>	Integrin Associated Protein
<b>IGF</b>	Insulin Growth Factor
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KO</b>	Knock-Out
<b>LAP</b>	Latency Associated Protein
<b>LDL</b>	Low-Density-Lipoprotein
<b>LDL-R</b>	Low-Density-Lipoprotein Receptor
<b>LMW uPA</b>	Low Molecular Weight form of uPA

<b>LRP</b>	Low-density-lipoprotein receptor-Related Protein
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>MEC</b>	Matrice ExtraCellulaire
<b>MEK</b>	MAPK/ERK Kinase
<b>MLCK</b>	Myosin Light Chain Kinase
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase Matricielle
<b>MT-MMP</b>	Membrane-Type MMP
<b>NO</b>	Nitric Oxyde
<b>PAGE</b>	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
<b>PAI</b>	Plasminogen Activator Inhibitor
<b>PAs</b>	Plasminogen Activator
<b>pb</b>	paire de bases
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDGF</b>	Plateled-Derived Growth Factor
<b>PKA</b>	Protéine Kinase A
<b>pol III</b>	Polymerase III
<b>PTB</b>	PhosphoTyrosin Binding
<b>PDZ</b>	Protein Dimerization
<b>RAP</b>	Receptor-Associated Protein
<b>RCL</b>	Reactif Center Loop
<b>RISC</b>	RNA-induced silencing complex
<b>RNAi</b>	RNA interference
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
<b>sc-uPA</b>	single chain form of uPA
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SEM</b>	Erreur Standart à la Moyenne
<b>SERPIN</b>	SERin Protease INhibitor
<b>siRNA</b>	small interfering RNA
<b>SPARC</b>	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
<b>STAT</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Foetal
<b>TBS-t</b>	Tris Buffered Saline-tween
<b>TCA</b>	Acide Trichloroacétique
<b>tc-uPA</b>	two chain form of uPA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine
<b>TFPI</b>	Tissue-Factor Pathway-Inhibitor
<b>TIMP</b>	Inhibiteur Tissulaire des Métalloprotéinases Matricielles
<b>TGF</b>	Transforming Growth Factor
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>TPA</b>	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
<b>tPA</b>	tissue-type Plasminogen Activator
<b>TSH</b>	Thyroid Stimulating Hormone
<b>TSP</b>	Thrombospondine
<b>TSR</b>	Thrombospondin type I repeats
<b>uPA</b>	urokinase-type Plasminogen Activator
<b>uPAR</b>	urokinase-type Plasminogen Activator Receptor
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VLDL</b>	Very-Low-Density Lipoprotein
<b>VLDL-R</b>	Very-Low-Density Lipoprotein-Receptor

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>I-La progression tumorale.....</b>	<b>2</b>
<b>II-La matrice extracellulaire.....</b>	<b>6</b>
II-1 <u>Composition de la MEC</u> .....	6
II-1-1 Les protéines fibreuses structurales.....	6
II-1-1-1 Les collagènes.....	6
II-1-1-2 L'élastine.....	10
II-1-2 Les polysaccharides.....	11
II-1-2-1 Les glycosaminoglycanes.....	11
II-1-2-2 Les protéoglycannes.....	13
II-1-3 Les glycoprotéines d'adhésion.....	16
II-1-3-1 La fibronectine.....	16
II-1-3-2 La laminine.....	17
II-1-3-3 La vitronectine.....	18
II-1-4 Les protéines matricellulaires.....	18
II-1-4-1 Les ténacines.....	19
II-1-4-2 L'ostéonectine/SPARC/BM-40.....	20
II-1-4-3 Les thrombospondines.....	21
II-2 <u>Organisation de la MEC</u> .....	22
II-2-1 La matrice des tissus conjonctifs.....	22
II-2-2 La matrice des lames basales.....	23
II-3 <u>Rôles de la matrice extracellulaire</u> .....	24
<b>III-Les MMPs.....</b>	<b>25</b>
III-1 <u>Classification</u> .....	26
III-2 <u>Organisation structurale des MMPs</u> .....	28
III-3 <u>Régulation des MMPs</u> .....	30
III-3-1 Régulation de l'expression des MMPs.....	31
III-3-2 Régulation de l'activation des MMPs.....	32
III-3-2-1 Mécanismes d'activation généraux.....	32
III-3-2-2 Cas particulier de la MMP-2.....	33
III-3.3 Régulation de l'activité des MMPs.....	34
III-3-3-1 Les inhibiteurs tissulaires des MMPs : les TIMPs.....	35
III-3-3-2 Les inhibiteurs synthétiques des MMPs.....	35
III-4 <u>Rôle des MMPs dans la progression tumorale</u> .....	36
<b>IV-Le système plasminogène/plasmine.....</b>	<b>37</b>
IV-1 <u>plasminogène/plasmine</u> .....	37
IV-2 <u>uPAet uPAR</u> .....	41
IV-3 <u>PAI-1</u> .....	45
<b>V-TSP1.....</b>	<b>48</b>
V-1 <u>Organisation structurale de la TSP1</u> .....	49

V-1-1 La région amino-terminale.....	49
V-1-2 Les domaines de connexion et d'homologie au procollagène.....	51
V-1-3 Les domaines de répétition de type I (ou TSR).....	51
V-1-4 Les domaines de répétition de type II.....	52
V-1-5 Les domaines de répétition de type III.....	52
V-1-6 Le domaine carboxy-terminal.....	52
V-2 <u>Rôle de TSP1 dans l'adhésion et dans l'invasion cellulaire</u> .....	53
V-3 <u>Rôle de TSP1 dans l'activité des protéases matricielles</u> .....	55
<b>VI-LRP.....</b>	<b>56</b>
VI-1 <u>Organisation structurale de LRP</u> .....	57
VI-2 <u>Les ligands de LRP</u> .....	59
VI-3 <u>Les fonction de signalisation de LRP</u> .....	61
VI-3-1 Interactions avec les protéines de surface cellulaire.....	61
VI-3-2 Interactions avec les protéines adaptatrices et d'échafaudage intracellulaires..	62
VI-4 <u>Rôle de LRP dans le métabolisme des protéases matricielles</u> .....	65
<b>But du travail.....</b>	<b>67</b>
<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>68</b>
<b>I-Modèle cellulaire.....</b>	<b>69</b>
I-1 <u>Les FTC-133</u> .....	69
I-2 <u>Les FTC-238</u> .....	69
<b>II-Culture cellulaire.....</b>	<b>70</b>
II-1 <u>Entretien des cellules</u> .....	70
II-2 <u>Mise au repos des cellules</u> .....	70
II-3 <u>Traitements des cellules</u> .....	70
II-4 <u>Test d'invasion en Transwell™</u> .....	71
<b>III-Transfection des cellules FTCs : extinction de LRP par RNAi.....</b>	<b>72</b>
III-1 <u>le plasmide pSuppressorNeo</u> .....	72
III-2 <u>l'insert codant le siRNA</u> .....	74
III-3 <u>Tansfection stable des cellules FTCs</u> .....	75
<b>IV-Etude de l'expression des ARN messagers.....</b>	<b>76</b>
IV-1 <u>Extraction des ARNs totaux</u> .....	76
IV-2 <u>Analyse par Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</u> .....	76
IV-2-1 Transcription inverse et choix des amorces.....	76
IV-2-2 Réaction de polymérisation en chaîne.....	77
<b>V-Analyse des protéines.....</b>	<b>77</b>
V-1 <u>Prélèvement des milieux de cultures conditionnés</u> .....	77
V-2 <u>Préparation des extraits protéiques totaux</u> .....	77
V-3 <u>Préparation des extraits protéiques membranaires</u> .....	78
V-4 <u>Immunoprécipitation</u> .....	78
V-5 <u>Electrophorèse SDS-PAGE</u> .....	79
V-5-1 Principe.....	79
V-5-2 Protocole expérimental.....	80

V-5-2-1 <i>Composition des solutions</i> .....	80
V-5-2-2 <i>Etablissement d'un gradient</i> .....	80
V-5-3 <i>Coloration des gels au nitrate d'argent</i> .....	81
V-5-3-1 <i>Composition des solutions</i> .....	81
V-5-3-2 <i>Mode opératoire</i> .....	82
V-6 <u>Immunotransfert en milieu liquide (Western blot)</u> .....	82
V-6-1 <i>Electro-transfert des protéines</i> .....	82
V-6-2 <i>Immunodétection des protéines</i> .....	82
V-7 <u>Analyses zymographiques</u> .....	83
V-7-1 <i>Détection des gélatinases par zymographie sur gel de gélatine</i> .....	83
V-7-2 <i>Détection des activateurs du plasminogène par zymographie sur gel de fibrine/agarose</i> .....	84
<b>VI-Purification de TSP-1 à partir de plaquettes sanguines humaines</b> .....	<b>85</b>
<b>VII-Dosage de l'activité plasmine</b> .....	<b>86</b>
<b>VIII-Immunomarquage de LRP et TSP-1 à la surface des cellules FTCs</b> .....	<b>87</b>
<b>IX- Zymographie In Situ avec substrats fluorogéniques</b> .....	<b>88</b>
(Localisation In Situ des activités plasmine et gélatinase)	
<b>X-Expression des résultats</b> .....	<b>89</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>90</b>
<b>A-<u>Etude du rôle de TSP-1 dans le potentiel invasif des cellules FTC</u></b> .....	<b>91</b>
<b>I-Corrélation de l'expression de TSP-1 avec le potentiel invasif</b> .....	<b>92</b>
I-1 <u>Le pouvoir invasif différentiel des cellules FTC-133 et FTC-238</u> .....	92
I-2 <u>L'expression différentielle de TSP-1 par les cellules FTC-133 et FTC-238</u> .....	94
<b>II-Rôle de TSP-1 dans le pouvoir invasif des cellules FTC</b> .....	<b>96</b>
II-1 <u>Purification de TSP-1</u> .....	96
II-2 <u>Tests d'invasion <i>in vitro</i></u> .....	97
<b>III-Analyses des profils d'expression et d'activité des protéases MMP2 et uPA ainsi que de leurs inhibiteurs</b> .....	<b>99</b>
III-1 <u>Analyse protéolytique des milieux conditionnés par zymographie</u> .....	99
III-2 <u>Analyse protéique des milieux conditionnés par western blot</u> .....	100
III-3 <u>Analyse des expressions des ARNm par RT-PCR</u> .....	101
III-4 <u>Localisation <i>In Situ</i> des activités gélatinase et plasmine</u> .....	103
<b>IV-Etude des interactions moléculaires entre TSP-1, MMP2 et uPA</b> .....	<b>105</b>
<b>V-Rôle de TSP-1 dans l'expression et l'activation de MMP2</b> .....	<b>107</b>
V-1 <u>Effet de TSP-1 exogène sur l'expression et l'activation de MMP2 des cellules FTC</u> .....	107
V-2 <u>Effet de la neutralisation de TSP-1 sur l'expression et l'activation</u>	

<u>de MMP2 des cellules FTC</u> .....	108
<b>VI-Rôle de MMP2 dans le pouvoir invasif, régulé par TSP-1, des cellules FTC</b> .....	<b>110</b>
<b>VII-Rôle de TSP-1 dans l'expression et l'activité d'uPA</b> .....	<b>111</b>
VII-1 <u>Effet de TSP-1 exogène sur l'expression d'ARNm codant pour uPA dans les cellules FTC</u> .....	112
VII-2 <u>Effet de TSP-1 exogène sur la sécrétion et l'activité d'uPA dans les milieux conditionnés des cellules FTC</u> .....	113
VII-3 <u>Effet de la neutralisation de TSP-1 sur l'expression d'ARNm codant pour uPA dans les cellules FTC</u> .....	114
VII-4 <u>Effet de la neutralisation de TSP-1 sur la sécrétion et l'activité d'uPA dans les milieux conditionnés des cellules FTC</u> .....	115
<b>VIII-Rôle d'uPA dans le potentiel invasif, régulé par TSP-1, des cellules FTC</b> .....	<b>117</b>
VIII-1 <u>Effet de l'ajout d'uPA exogène sur les capacités invasives des cellules FTC</u> .....	117
VIII-2 <u>Effet de l'anticorps neutralisant anti-uPA sur l'activité plasmine</u> .....	118
VIII-3 <u>Effet de l'inhibition de l'activité d'uPA sur le potentiel invasif basal et induit des cellules FTC</u> .....	119
<b><u>B-Etude du rôle de LRP dans le potentiel invasif des cellules FTC</u></b> .....	<b>121</b>
<b>I-Corrélation entre l'expression de LRP et leur potentiel invasif</b> .....	<b>122</b>
<b>II-Effet de la neutralisation de LRP induit sur le pouvoir invasif des cellules FTC</b> .....	<b>124</b>
<b>III-Etude des interactions moléculaires avec LRP</b> .....	<b>126</b>
<b>IV-Effet de la neutralisation de LRP entraîne sur l'accumulation de TSP-1 dans les milieux conditionnés des cellules FTC</b> .....	<b>128</b>
<b>V-Rôle de MMP2 dans le pouvoir invasif, régulé par LRP, des cellules FTC</b> .....	<b>129</b>
V-1 <u>Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation de MM2 dans les milieux conditionnés</u> .....	129
V-2 <u>Effet de l'inhibition de l'activité de MMP2 sur les capacités invasives induites par RAP des cellules FTC</u> .....	131
<b>VI-Rôle d'uPA dans le pouvoir invasif, régulé par LRP, des cellules FTC</b> .....	<b>132</b>
VI-1 <u>Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation d'uPA dans les milieux conditionnés des deux lignées FTC</u> .....	132
VI-2 <u>Effet de la neutralisation de LRP sur l'activité plasmine dans les milieux conditionnés des cellules FTC</u> .....	134
VI-3 <u>Effet de l'inhibition de l'activité d'uPA sur les capacités invasives des cellules FTC</u> .....	135
<b>VII-Effet de l'extinction génique de LRP par RNAi sur le potentiel invasive des cellules FTC</b> .....	<b>138</b>

<b>CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>141</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>165</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>167</b>

# *Introduction*

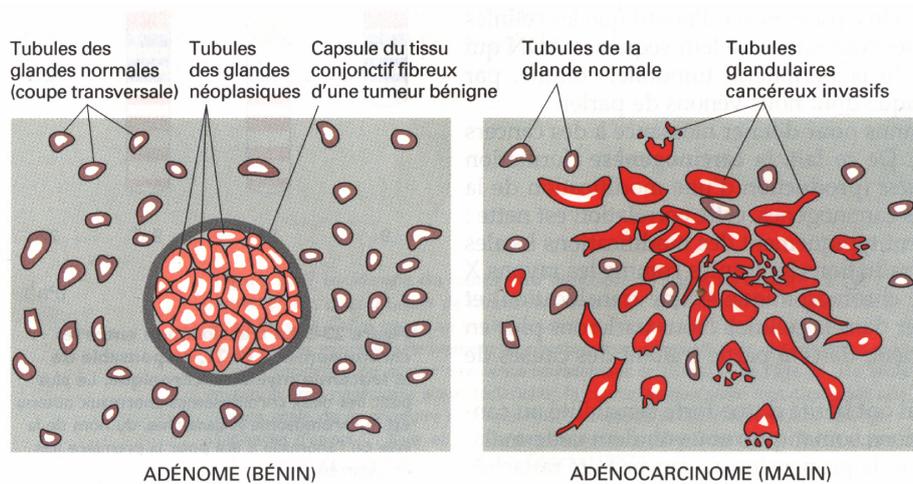
## I-LA PROGRESSION TUMORALE

Au cours du développement tumoral, les perturbations des fonctions biologiques sont nombreuses et variées. Issues de mutations géniques, ces modifications fonctionnelles confèrent aux cellules cancéreuses des propriétés prolifératives et invasives. Ces modifications fonctionnelles affectent les mécanismes de transduction des signaux, de transcription, de traduction, de réplication et d'ancrage à la matrice extracellulaire (MEC).

On peut distinguer, schématiquement, trois étapes dans la genèse d'un cancer, dont les deux premières sont connues uniquement par les modèles expérimentaux et l'étude de l'épidémiologie des tumeurs humaines :

- **l'initiation** correspond à une lésion rapide et irréversible du DNA après exposition à un carcinogène (physique, chimique, viral, etc.),
- **la promotion** correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée,
- **la progression** correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique.

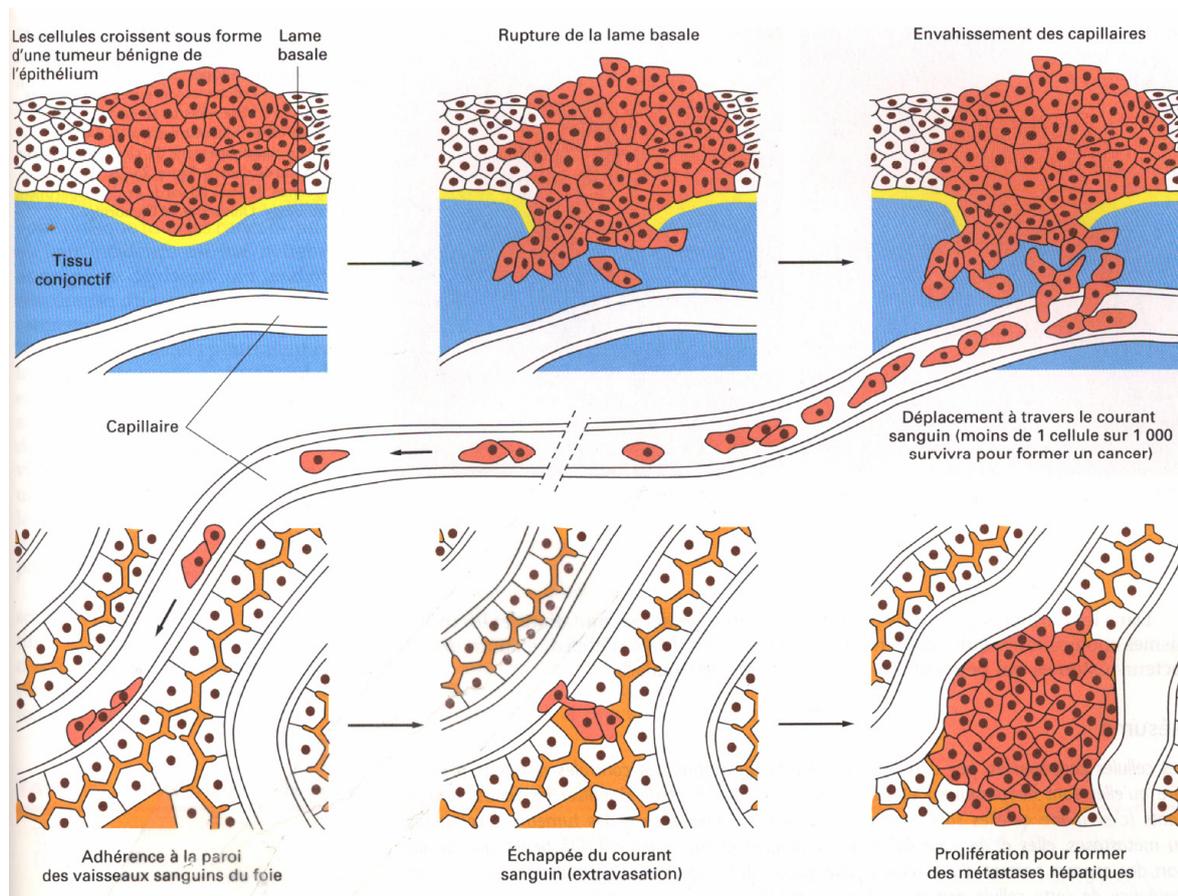
La progression définit ce qu'est un cancer : c'est à dire une tumeur qui évolue localement et à distance. Le développement local de la tumeur nécessite un nombre important de multiplications cellulaires. Les cellules cancéreuses initiales sont des cellules souches, qui donnent naissance à des clones. Une cellule isolée anormale, qui ne prolifère pas plus que ses voisines normales, n'occasionne pas de lésions significatives quelles que soient les autres propriétés nuisibles qu'elle peut avoir. Mais si sa prolifération n'est plus contrôlée, elle donnera naissance à une tumeur, ou néoplasie - masse constamment croissante de cellules anormales. Cependant, tant que les cellules néoplasiques restent rassemblées en une seule masse, la tumeur est dite bénigne. En fait, ce qui caractérise le cancer ou tumeur maligne, c'est la capacité qu'acquièrent ces cellules d'envahir progressivement le tissu voisin. Elles détournent à leur profit, soit directement, soit en stimulant les cellules voisines, les mécanismes normaux de remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). Sous la dépendance des protéines de surface, elles perdent leur cohésion, et envahissent le tissu voisin. La rupture et le franchissement de la membrane basale, une forme particulière de la MEC, représentent un critère formel pour distinguer les cancers invasifs des cancers *in situ* (figure 1).



**Figure 1 :** Tumeurs bénignes versus tumeurs malignes. Une tumeur glandulaire bénigne (adénome) et une tumeur glandulaire maligne (adénocarcinome) sont structurellement distinctes.

Pour survivre, la tumeur cancéreuse doit être capable de susciter la création de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse). La formation de nouveaux vaisseaux assure en effet la croissance tumorale en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à l'expansion des néoplasmes, en éliminant les déchets métaboliques et en produisant différentes cytokines et facteurs de croissance qui stimulent directement la croissance des cellules cancéreuses. Ce processus de stimulation des cellules mésenchymateuses normales aboutit à ce qu'on appelle la 'réaction stromale', qui permet ainsi le développement ultérieur du cancer. Ce qui fait la gravité du processus cancéreux, c'est le développement de métastases. Ce développement est la conséquence logique de l'invasion locale : les mêmes mécanismes sont utilisés par les cellules cancéreuses pour envahir les vaisseaux lymphatiques et sanguins et ainsi métastaser à distance (figure 2). L'invasion tumorale se fait préférentiellement le long des zones de moindre résistance : cloisons des organes, gaines des nerfs et des vaisseaux. Elle respecte longtemps le cartilage, les armatures artérielles, nerveuses, tendineuses et aponévrotiques. Puis, l'invasion tumorale va intéresser les parois des vaisseaux sanguins ou lymphatiques qui, dans ce cas, libéreront son contenu, la lymphe, dans le courant sanguin. Les cellules tumorales vont devoir traverser la lame basale et la limite endothéliale du vaisseau pour entrer dans la circulation, sortir de la circulation quelque part dans le corps puis survivre et proliférer afin de produire une tumeur dans un nouveau site.

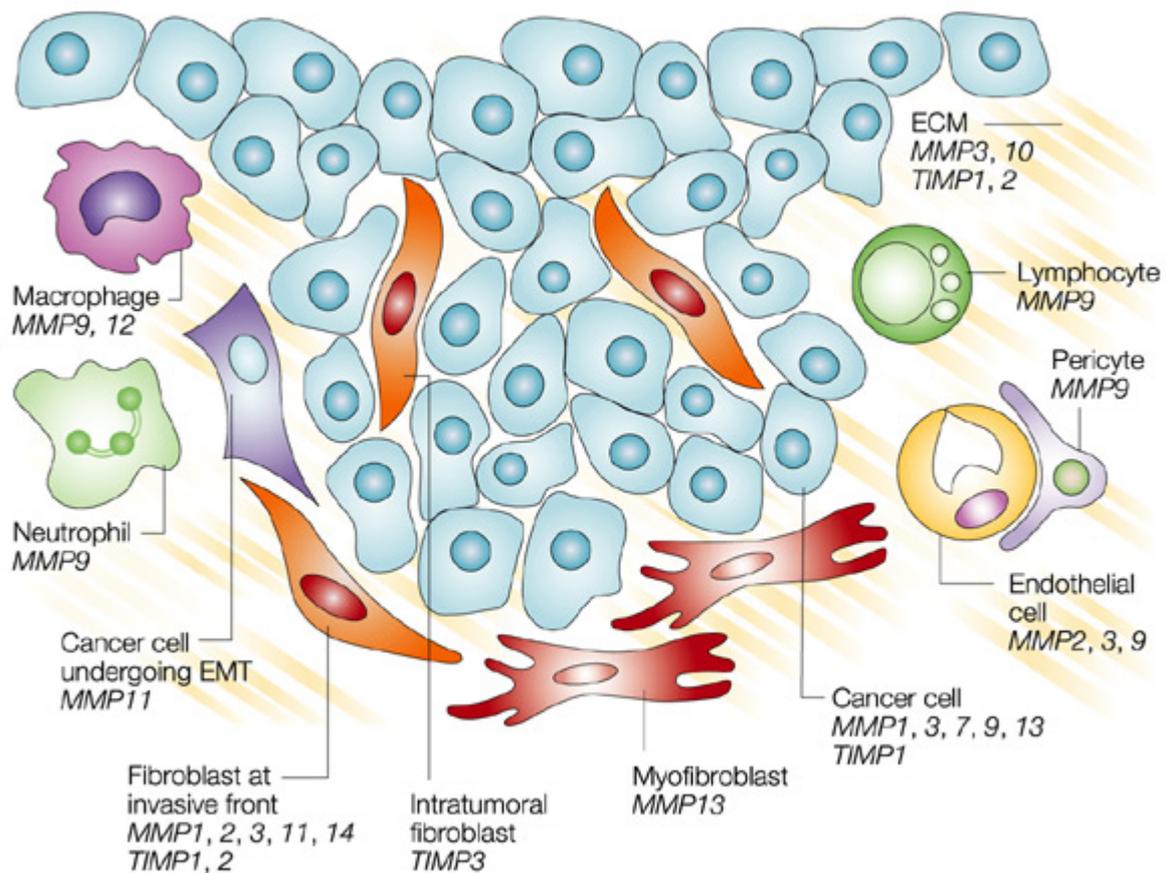
Les cellules qui se détachent de la tumeur primaire doivent survivent à toutes les étapes du processus et seule une proportion très faible sera capable de le faire. Cependant, la répétition permanente de ce processus provoque inévitablement à long terme la formation de métastases. Il est à noter que les cellules tumorales qui sont entrées dans un vaisseau lymphatique sont souvent piégées dans les ganglions lymphatiques le long de la voie, donnant naissance aux métastases des ganglions lymphatiques.



**Figure 2 :** Etapes du processus de métastase. Cet exemple illustre la dissémination d'une tumeur à partir d'un organe, comme le poumon ou la vessie, vers le foie.

Ainsi, l'invasion tumorale est un événement multifactoriel dans lequel la motilité cellulaire est associée à une protéolyse matricielle et implique des interactions entre les cellules tumorales et la MEC. Les remodelages tissulaires qui accompagnent la progression tumorale font appel à une coopération entre deux systèmes enzymatiques matriciels qui sont d'une part, le système plasminogène/plasmine et d'autre part, les métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs, les TIMPs. De nombreuses études ont également démontré l'importance

fondamentale des interactions cellules tumorales – cellules stromales, (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, neutrophiles...), durant ces processus [Dano et coll., 1999]. En effet, les MMPs présentes au niveau du front invasif sont souvent produites non seulement par les cellules tumorales mais également par les cellules stromales, stimulées spécifiquement par les cellules cancéreuses [Basset et coll., 1997] (figure 3).



**Figure 3 :** Expression des MMPs et des TIMPs lors de l'invasion tumorale.

*Outre les cellules cancéreuses, une tumeur est également composée de cellules stromales, qui incluent les fibroblastes, les myofibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes. Chacun de ces types cellulaires participe au développement tumoral en sécrétant différents MMPs et TIMPs (d'après Egeblad et coll. 2002).*

Enfin, les protéines de la MEC jouent un rôle considérable dans la progression tumorale, dans la mesure où elles sont capables de séquestrer les molécules actrices, telles que les facteurs de croissance et les cytokines, ainsi que les protéases matricielles. Lorsque la dégradation de ses composants est entamée, la MEC libère donc ces molécules dans le stroma.

## **II-LA MATRICE EXTRACELLULAIRE**

Une partie substantielle du volume des tissus représente l'espace extracellulaire, en grande partie constitué d'un réseau complexe de macromolécules composant la matrice extracellulaire. Cette matrice est composée de divers protéines et polysaccharides localement sécrétés qui s'assemblent en un réseau organisé, solidement associé à la surface cellulaire qui les produit. Les variations des quantités relatives des différents types de macromolécules matricielles et de leur mode d'organisation dans la MEC ont donné naissance à une surprenante diversité de formes, chacun adaptée aux besoins fonctionnels du tissu en question. La matrice peut se calcifier pour former les structures osseuses ou dentaires dures comme de la pierre, peut former la matrice transparente de la cornée ou peut adopter l'organisation en corde qui donne aux tendons leur énorme résistance élastique à la traction. A l'interface entre un épithélium et le tissu conjonctif, la matrice forme une membrane basale importante pour le contrôle du comportement cellulaire.

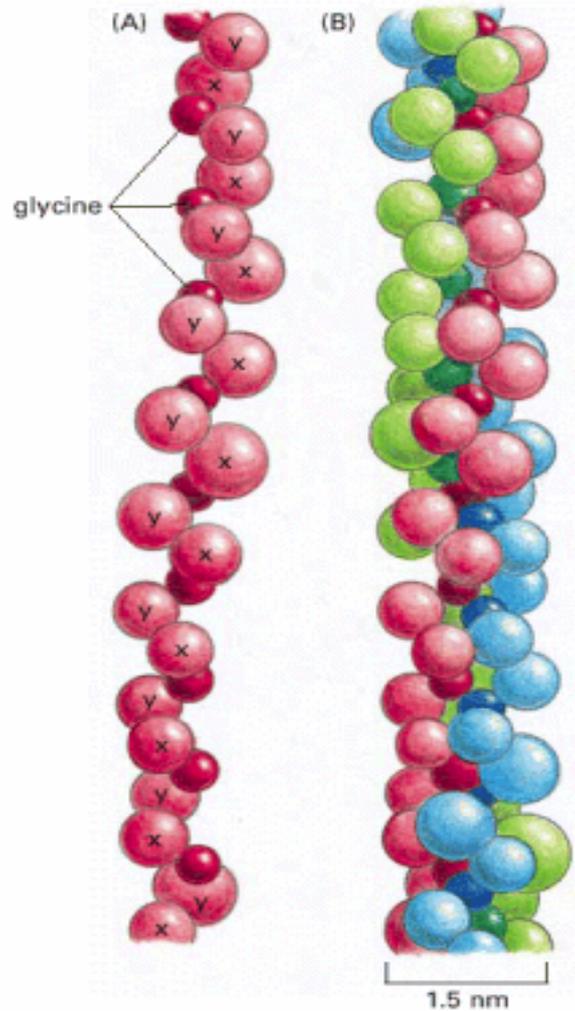
### **II-1 Composition de la matrice extracellulaire**

#### **II-1-1 Les protéines fibreuses structurales**

##### **II-1-1-1 Les collagènes**

Les collagènes sont les principales protéines de la MEC. La caractéristique primaire d'une molécule de collagène typique est sa structure longue, rigide, hélicoïdale à trois brins, dans laquelle trois chaînes polypeptidiques de collagène, les chaînes  $\alpha$ , sont enroulées les unes autour des autres en une super-hélice en forme de corde. La chaîne  $\alpha$  possède environ 1 000 acides aminés. Elle est disposée en une hélice tournée vers la gauche avec trois acides aminés par tour et de la glycine tous les trois acides aminés. De ce fait, une chaîne  $\alpha$  est composée d'une série de séquences triplets Gly-X-Y, dans laquelle X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé, bien que X soit souvent de la proline et Y de l'hydroxyproline. Les collagènes sont donc extrêmement riches en proline et en glycine, tous deux importants dans la formation de l'hélice à trois brins. La proline, du fait de sa structure en anneau, stabilise la conformation hélicoïdale de chaque chaîne  $\alpha$ , tandis que la glycine est régulièrement espacée sur toute la région centrale de la chaîne  $\alpha$ . Comme c'est le plus petit acide aminé, la glycine permet aux

trois chaînes hélicoïdales de se serrer étroitement pour former la super-hélice finale de collagène (figure 4).



**Figure 4 :** Structure d'une molécule typique de collagène. (A) Modèle d'une partie d'une seule chaîne  $\alpha$  de collagène dans laquelle chaque acide aminé est représenté par une sphère. (B) Modèle d'une partie de la molécule de collagène dans laquelle trois chaînes  $\alpha$ , chacune montrée d'une couleur différente, sont enroulées l'une autour de l'autre pour former un bâtonnet hélicoïdal à trois brins.

Les collagènes constituent une vaste famille de protéines de structure. Jusqu'à présent, 25 chaînes  $\alpha$  différentes de collagène ont été identifiées, chacune codée par un gène distinct, mais seulement 21 types de collagènes ont été décrits chez l'homme [Myllyharju et Kivirikko, 2001].

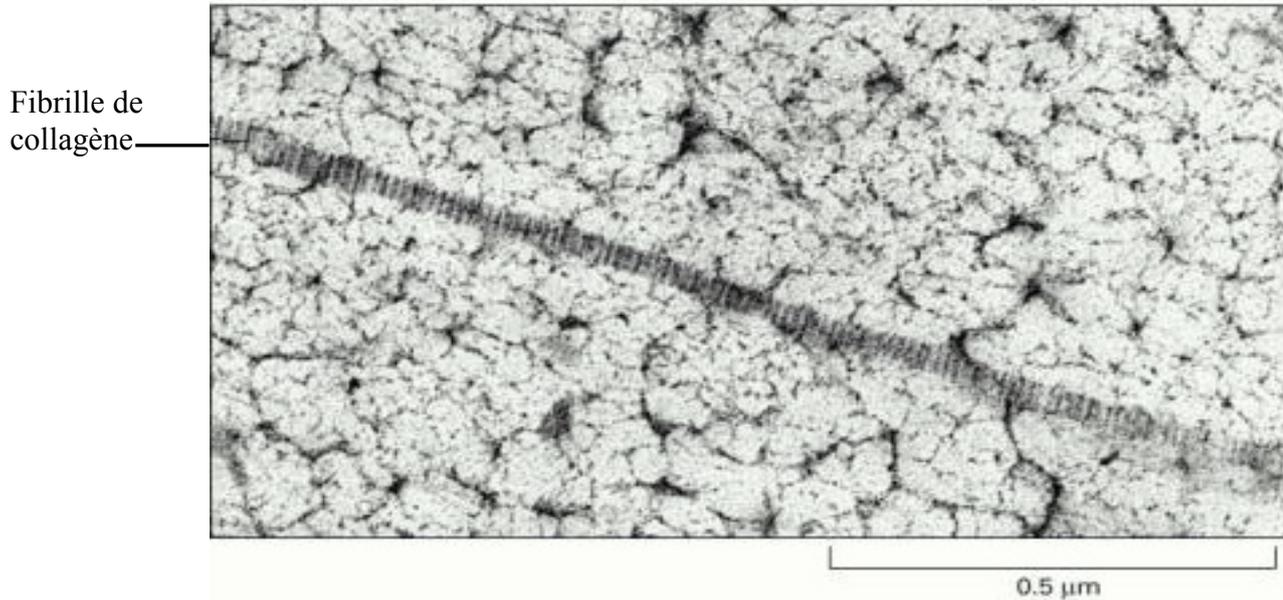
Ils sont classés selon leur structure primaire et/ou leur organisation supramoléculaire. On distingue les collagènes fibrillaires, les collagènes en réseaux, les collagènes associés aux fibrilles et les collagènes transmembranaires (tableau 1).

Forme	Type	Localisation	Fonction
Fibrillaire	I	Tout l'organisme sauf cartilage	Résistance à l'étirement
	II	Cartilage, Disques intervertébraux	
	III	Vaisseaux	
	V	Copolymérise avec collagène I	
	XI	Copolymérise avec collagène II	
Réseau	IV	Lame Basale	Support
	VIII	Vaisseaux (endothélium) , cornée	
	X	Cartilage	
Associé aux fibrilles	VI	Vaisseaux (intima)	Liaisons entre molécules
	IX	Cartilage	
	XII	Tendons, ligaments	
	XIV	Peau, tendons	
Trans membranaire	XIII	Cœur, vaisseaux	Liaisons à la cellule
	XVIII	Rétine, iris	

**Tableau 1 :** Quelques types de collagènes et leurs propriétés.

Les principaux types de collagène des tissus conjonctifs sont les types I, II, III, V et XI, le type I étant le collagène le plus abondant chez les vertébrés. Il représente environ 70% du collagène total contenu dans les tissus. Il est le composant principal de tissus comme le tendon, l'os, la peau et d'autres tissus conjonctifs complexes. Son rôle est de maintenir la structure des tissus. Ces collagènes sont des collagènes fibrillaires ou collagènes formant des fibrilles, dotés de la structure en corde illustrée dans la figure 4. Après avoir été sécrétées dans l'espace extracellulaire, ces molécules de collagène s'assemblent en polymères d'ordre supérieur, les fibrilles de collagène, qui sont de fines structures (10 à 300 nm de diamètre) de plusieurs centaines de micromètre de long dans les tissus matures, clairement visibles sur les photographies en microscopie électronique (figure 5). Celles-ci s'agrègent souvent en faisceaux plus larges de type câbles, de plusieurs micromètres de diamètre, qui forment les fibres de collagène observées en microscopie optique.

Le collagène de type IV ne s'assemble pas en fibrilles mais en réseau qui se superposent en plusieurs couches pour former un feuillet qui constitue la majeure partie de la membrane basale mature.



**Figure 5** : Photographie en microscopie électronique de protéoglycannes de la matrice extracellulaire d'un cartilage de rat, avec une fibrille de collagène. Ce tissu a été rapidement congelé à  $-196^{\circ}\text{C}$  et fixé puis coloré encore gelé pour éviter que les chaînes de glycosaminoglycannes (GAG) ne se rétractent. Les molécules de protéoglycannes forment un fin réseau filamenteux dans lequel est incluse une unique fibrille striée de collagène. Les parties colorées plus noires des molécules de protéoglycannes représentent les noyaux protéiques. Les fils légèrement colorés sont les chaînes de GAG. D'après Hunziker et Schenk, 1984.

Les collagènes de type VI, IX, XII et XIV présents en plus faible quantité, permettent la connexion entre les collagènes et les autres composants de la MEC conduisant ainsi à sa stabilisation [Fukai et coll., 1994 ; Van der Rest et Garonne, 1991].

Il existe aussi un certain nombre de protéines de « type collagène », y compris le type XVII qui possède un domaine transmembranaire et se trouve dans les hémidesmosomes et le type XVIII, localisé dans la membrane basale des vaisseaux sanguins. La coupure du domaine C-terminal du collagène de type XVIII donne un peptide, l'endostatine, qui inhibe la néoformation de vaisseaux sanguins.

### II-1-1-2 l'élastine

Beaucoup de tissus de vertébrés, comme la peau, les vaisseaux sanguins et les poumons ont besoin d'être à la fois résistants et élastiques pour assurer leurs fonctions. Le réseau de fibres élastiques dans leur MEC leur donne leur élasticité nécessaire pour qu'ils puissent se détendre après leur étirement transitoire.

Le principal composant des fibres élastiques est l'élastine, une protéine composée d'environ 750 acides aminés. Cette protéine est un polymère résultant de l'association de plusieurs molécules de tropoélastine, le précurseur de l'élastine, et a la particularité de n'être élastique qu'en présence d'eau. Elle est caractérisée par sa totale insolubilité dans tout solvant, son extrême hydrophobie ainsi que sa résistance extraordinaire aux dégradations chimiques, physiques ou enzymatiques. Elle peut toutefois être dégradée par des enzymes protéolytiques communément nommées " élastases " ou autres protéases telles que des MMPs et des sérine-protéases [Hornebeck et coll., 2002].

La conformation de l'élastine n'est pas connue de manière précise, cependant, diverses études suggèrent fortement que l'élastine fibreuse est un assemblage tridimensionnel de molécules de tropoélastine globulaire reliées entre elles. La tropoélastine, contrairement à l'élastine, est soluble en milieu aqueux, donc physiologique [Vrhovski et Weiss, 1998]. Plusieurs types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les fibroblastes synthétisent de la tropoélastine [Uitto et coll., 1991]. Lorsque celle-ci est sécrétée dans l'espace extracellulaire, elle s'associe aux microfibrilles de la fibre élastique en cours de synthèse, près de la membrane plasmique. On pense que les microfibrilles permettent d'aligner correctement les molécules de tropoélastine avant leur pontage au sein du réseau d'élastine [Mecham, 1991]. L'hypothèse concernant le rôle des microfibrilles comme matrice de déposition de la tropoélastine est renforcée par l'observation du fait que l'élastine est alignée suivant la même orientation que les microfibrilles [Ross et Bornstein, 1969]. Après leur sécrétion, les molécules de tropoélastine sont extrêmement reliées les unes aux autres, ce qui engendre un réseau étendu de fibres élastiques et de feuilletts.

L'élastine est la protéine dominante de la matrice extracellulaire des artères et représente 50% du poids sec de l'aorte. Des mutations du gène de l'élastine provoquant un déficit en cette protéine chez la souris ou chez l'homme résultent en un rétrécissement de l'aorte ou d'autres artères, du fait d'une prolifération excessive des muscles lisses dans la paroi artérielle. Apparemment, l'élasticité normale d'une artère est nécessaire pour restreindre la prolifération de ces cellules [Urban Z, et coll., 2002]. Un rôle de plus en plus important est attribué aux fibres élastiques dans la genèse de maladies impliquant une perte

d'élasticité des tissus telle que l'athérosclérose et l'emphysème pulmonaire ainsi que dans le vieillissement [Debelle et Tamburro, 1999 ; Brooke et coll., 2003]. Enfin, les peptides d'élastine, issus de la dégradation enzymatique de l'élastine, possèdent de nombreuses activités biologiques, et beaucoup d'entre elles peuvent être mises en relation directe avec le développement tumoral : effets sur la prolifération cellulaire, le chimiotactisme et la synthèse de protéases sur de nombreux types cellulaires tumoraux mais aussi normaux impliqués dans la réaction stromale, tels que les fibroblastes [Duca et coll., 2004].

## **II-1-2 Les polysaccharides**

### II-1-2-1 Les glycosaminoglycanes (GAG)

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'unités disaccharidiques répétitives. On les appelle GAG parce qu'un des deux sucres du disaccharide est toujours un sucre aminé (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) sulfaté dans la plupart des cas. Le deuxième sucre est généralement un acide uronique (glucuronique ou iduronique). Comme il y a des groupements sulfates ou carboxyles sur la plupart de leurs sucres, les GAG possèdent une forte charge négative. En effet, ce sont les molécules les plus anioniques produites par des cellules animales.

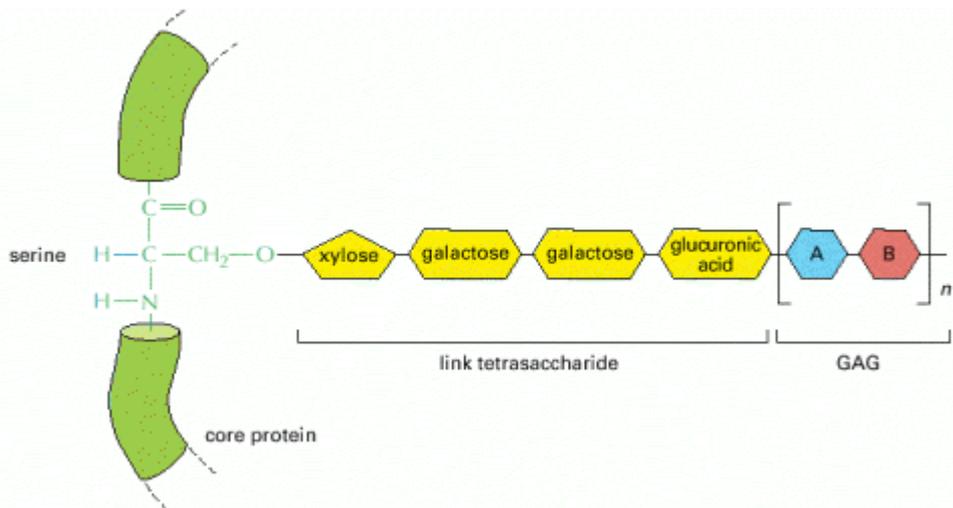
On distingue quatre principaux groupes de GAG selon leurs sucres, le type de liaisons osidiques et le nombre et la localisation des groupements sulfates : (1) l'acide hyaluronique, (2) la chondroïtine-sulfate et le dermatane-sulfate, (3) l'héparane-sulfate et (4) le kératane-sulfate (tableau 2).

	<p><b>Acide hyaluronique</b> D-glucuronate + GlcNAc</p> <p>liaison <math>\beta(1, 3)</math></p>
	<p><b>Dermatane-sulfate:</b> L-iduronate (parfois sulfaté) + GalNAc-4-sulfate</p> <p>liaison <math>\beta(1, 3)</math></p>
	<p><b>Chondroïtine 4- et 6-sulfates :</b> D-glucuronate + GalNAc-4- ou 6-sulfate</p> <p>liaison <math>\beta(1, 3)</math> (ici, le GalNAc 4-sulfate)</p>
	<p><b>Héparine et Héparane sulfate:</b> D-glucuronate-2-sulfate (ou iduronate-2-sulfate) + N- sulfo-D-glucosamine-6- sulfate</p> <p>liaison <math>\alpha(1, 4)</math> (les héparanes ont moins de sulfate que les héparines)</p>
	<p><b>Kératane-sulfate:</b> galactose + GlcNAc-6- sulfate</p> <p>liaison <math>\beta(1, 4)</math></p>

**Tableau 2 :** Structures des unités disaccharides répétitives des quatre principaux groupes de GAG.

### II-1-2-2 Les protéoglycannes

A l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAG sont attachés de façon covalente sur une protéine et forment des protéoglycannes, synthétisés par la plupart des cellules animales. La chaîne polypeptidique, appelée noyau protéique, d'un protéoglycane est fabriquée par les ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique puis passe dans la lumière. Les chaînes polysaccharidiques sont principalement assemblées sur ce noyau protéique dans l'appareil de Golgi. Tout d'abord, un liant tétrasaccharidique particulier se fixe sur une chaîne latérale de sérine du noyau protéique pour servir d'amorce à la croissance polysaccharidique, puis une glycosyl-transférase spécifique y ajoute un sucre après l'autre (figure 6).



**Figure 6 :** Liaison entre une chaîne de GAG et le noyau protéique dans une molécule de protéoglycane. Une liaison spécifique tétrasaccharidique s'assemble d'abord sur une chaîne latérale de sérine. Dans la plupart des cas, il semblerait que le choix de cette sérine spécifique implique la reconnaissance d'une conformation locale spécifique de la chaîne polypeptidique, plutôt que d'une séquence linéaire spécifique en acides aminés. Le reste de la chaîne de GAG est alors synthétisée par l'ajout d'un sucre à la fois.

Les protéoglycannes sont généralement faciles à distinguer des autres glycoprotéines par la nature, la quantité et la disposition de leurs chaînes latérales de sucre. Par définition, au moins une des chaînes latérales de sucre d'un protéoglycane doit être un GAG. Alors que les glycoprotéines contiennent entre 1 et 60% de glucides par poids sous forme de nombreuses chaînes relativement courtes d'oligosaccharides ramifiés, les protéoglycannes peuvent contenir jusqu'à 95% de glucides par poids, surtout sous la forme de longues chaînes de GAG non ramifiées, chacune d'une longueur typique de 80 sucres. Les protéoglycannes peuvent

être immenses. L'aggrecane, par exemple, a une masse moléculaire de  $3 \times 10^6$  Da avec plus de 100 chaînes de GAG. D'autres sont bien plus petits et n'ont que 1 à 10 chaînes de GAG (tableau 3).

PROTEOGLYCANNES	MASSE MOLECULAIRE APPROXIMATIVE DU NOYAU PROTEIQUE	TYPE DE CHAINE DE GAG	NOMBRE DE CHAINES DE GAG	LOCALISATION	FONCTIONS
Aggrecane	210 000	Chondroïtine-sulfate + kératane-sulfate	~130	cartilage	Soutien mécanique; Forme de gros agrégats avec l'acide hyaluronique
Bêtaglycane	36 000	Chondroïtine-sulfate/ dermatane-sulfate	1	Surface cellulaire et matrice	Se fixe sur le TGF- $\beta$
Décorine	40 000	Chondroïtine-sulfate/ dermatane-sulfate	1	Très répandue dans les tissus conjonctifs	Se fixe sur les fibrilles de collagène I et les TGF- $\beta$
Perlecane	600 000	Héparane-sulfate	2-15	Lame basale	Fonction structurale et de filtration dans la lame basale
Syndécan-1	32 000	Chondroïtine-sulfate + héparane-sulfate	1-3	Surface des cellules épithéliales	Adhésion cellulaire; Se fixe au FGF et autres facteurs de croissance

**Tableau 3 : Exemples de quelques protéoglycannes communs**

Les protéoglycannes jouent un rôle majeur dans la signalisation chimique entre les cellules. Ils fixent diverses molécules de signalisation sécrétées, comme certains facteurs de croissance protéiques, et peuvent augmenter ou inhiber leur activité de signalisation. Les protéoglycannes se fixent aussi sur d'autres types de protéines sécrétées, y compris des protéases et des inhibiteurs de protéases et régulent leurs activités. La fixation d'un protéoglycanne pourrait contrôler l'activité d'une protéine sécrétée par le biais de différentes voies : (1) elle pourrait immobiliser la protéine proche du site de sa production, et restreindre ainsi son champ d'action ; (2) elle pourrait bloquer stériquement l'activité de la protéine ; (3) elle pourrait fournir un réservoir de cette protéine pour la libérer de façon retardée ; (4) elle pourrait protéger la protéine de sa dégradation protéolytique, et prolonger ainsi son action ; (5) elle pourrait modifier ou concentrer la protéine pour qu'elle se présente plus efficacement sur ses récepteurs cellulaires de surface.

Les GAG et les protéoglycannes peuvent s'associer pour former d'énormes complexes polymériques dans la MEC. En plus de leur association entre eux, ils s'associent également à des protéines de la matrice fibreuse comme le collagène (figure 5) et aux réseaux de protéines comme la membrane basale, afin de créer des structures extrêmement complexes. La décorine, qui se fixe sur les fibrilles de collagène, est essentielle pour la formation des fibres de collagène.

Toutefois, tous les protéoglycannes ne sont pas des composants sécrétés de la MEC. Certains sont des composants intégraux des membranes plasmiques et leur noyau protéique se trouve soit inséré au travers de la bicouche lipidique soit fixé sur la bicouche lipidique par une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI). Certains de ces protéoglycannes agissent comme co-récepteurs qui collaborent avec les récepteurs protéiques cellulaires de surface, à la fois pour fixer les cellules à la MEC et pour initier la réponse des cellules à certaines protéines de signalisation extracellulaire.

Les syndécanes, dont le noyau protéique traverse la membrane, font partie des protéoglycannes de la membrane plasmique les mieux caractérisés. Ces molécules sont localisées à la surface de nombreux types cellulaires, y compris les fibroblastes et les cellules épithéliales, où elles servent de récepteurs aux protéines matricielles. Dans les fibroblastes, on trouve les syndécanes au niveau des plaques d'adhésion, où ils modulent la fonction des intégrines en interagissant avec la fibronectine à la surface cellulaire et avec le cytosquelette et les protéines de signalisation à l'intérieur de la cellule.

Il est maintenant établi que les protéoglycannes peuvent jouer un rôle actif dans la tumorigenèse. Par exemple, les cellules issues de différents types de cancer, notamment de

mélanomes [Maniglia et coll., 1985 ; Turley et Tretiak, 1985] ou de carcinomes [Steck et coll., 1987 ; Harada et coll., 1994], modifient leur profil de synthèse de protéoglycannes en fonction de leur capacité à générer des métastases. D'une façon générale, le pouvoir invasif des cellules cancéreuses est corrélé à une augmentation de leur production d'héparane-sulfate et une diminution de celle des autres GAG [Van Muijen et coll., 1995 ; Timar et coll., 1995]. Shishiba et coll. (1984) ont, en particulier, décrit une accumulation anormale de protéoglycannes dans le tissu thyroïdien humain adénocarcinomateux.

### **II-1-3 Les glycoprotéines d'adhésion (ou protéines spécialisées)**

La MEC contient un certain nombre de protéines non collagéniques dotées typiquement de multiples domaines, chacun pourvu de sites spécifiques de liaison sur les autres macromolécules de la matrice et sur les récepteurs cellulaires de surface. Ces protéines contribuent donc à la fois à l'organisation de la matrice et y facilitent l'attachement des cellules.

#### II-1-3-1 La fibronectine

La fibronectine a été la première glycoprotéine d'adhésion bien caractérisée. Elle a été isolée en 1948 sous le nom de "cold insoluble globulin" à partir de cryoprécipités de plasma sanguin. Il s'agit d'une glycoprotéine dimérique de 500 kDa composée de deux chaînes polypeptidiques de 220 à 250 kDa chacune, reliées entre elles par deux ponts disulfure. Chaque sous-unité est repliée en une série de domaines fonctionnellement distincts, séparés par des régions souples de la chaîne polypeptidique. Ces domaines sont à leur tour composés de plus petits modules, dont chacun se répète en série et est généralement codé par un exon séparé. Toutes les formes de fibronectine sont codées par un seul grand gène qui contient environ 50 exons de taille identique. Le principal type de module, appelé répétition de type III de la fibronectine, se fixe sur les intégrines. Il mesure environ 90 acides aminés et se retrouve au moins 15 fois dans chaque sous-unité. La répétition de type III de la fibronectine est un des domaines protéiques les plus communs chez les vertébrés et est retrouvé dans d'autres protéines de la matrice, comme les ténascines et les thrombospondines dont on parlera un peu plus tard. Des peptides synthétiques qui correspondent aux différents segments des domaines de liaison à la cellule ont été utilisés pour identifier une séquence tripeptidique spécifique, Arg-Gly-Asp ou RGD, retrouvée dans une des répétitions de type III et qui est une

caractéristique centrale du site de liaison. La séquence RGD est reconnue par de nombreux membres de la famille des intégrines.

Il existe de multiples isoformes de fibronectine. L'une d'elle, la fibronectine plasmatique, est soluble et circule dans le sang et d'autres liquides organiques dans lesquels on suppose qu'elle augmente la coagulation sanguine, la cicatrisation et la phagocytose. Toutes les autres formes s'assemblent à la surface cellulaire et sont déposées dans la MEC sous forme de fibrilles de fibronectine hautement insoluble, impliquées dans les processus d'attachement, de prolifération et de différenciation cellulaire [Pankov et Yamada, 2002]. L'importance de la fibronectine dans le développement animal a été mise en évidence de façon spectaculaire par des expériences d'inactivation génique [George et coll., 1993]. Les souris mutantes, incapables de produire de la fibronectine, meurent au début de l'embryogenèse parce que leurs cellules endothéliales ne peuvent pas former de vaisseaux sanguins corrects. Enfin, l'importance de la production de fibronectine durant la transformation maligne a également été clairement démontrée [Labat-Robert J, 2002]. En effet, par ses interactions avec des intégrines, elle est capable d'induire l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire, comme c-jun ou c-fos, ou encore de protéases matricielles, telle que MMP-1, MMP-3 et MMP-9 [Werb Z et coll., 1989].

#### II-1-3-2 La laminine

Les laminines sont des protéines hétérotrimériques en forme de croix asymétrique résultant de l'assemblage de 3 chaînes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Chacune de ces chaînes a plus de 1500 acides aminés de long. Il existe 5 types de chaînes  $\alpha$ , 3 types de chaînes  $\beta$  et 3 types de chaînes  $\gamma$  permettant la formation de 11 isoformes différentes avec des distributions tissulaires spécifiques. Les laminines représentent les composants non collagéniques les plus abondants des lames basales [Timpl R, 1996]. Au début du développement, les lames basales contiennent soit peu, soit pas de collagène de type IV et sont surtout composées de laminine. Seule la laminine 1 (laminine classique) est présente dans toutes les lames basales. Comme beaucoup d'autres protéines de la MEC, les laminines des membranes basales sont composées de plusieurs domaines fonctionnels : l'un d'eux se fixe sur le perlecan, un autre sur le nidogène (ou entactine) et deux ou plus sur les récepteurs spécifiques de surface cellulaire. Elles peuvent également s'auto-assembler en un feuillet de type feutre, surtout par le biais d'interactions entre les extrémités des bras de laminine. Comme le nidogène et le perlecan peuvent se lier à la fois sur les laminines et les collagènes de type IV, on pense qu'ils relient

les collagènes de type IV et les réseaux de laminines. Beaucoup de récepteurs cellulaires de surface des laminines sont membres de la famille des intégrines. Le dystroglycane, une protéine transmembranaire, est un autre récepteur important des laminines qui, associé aux intégrines, peut organiser l'assemblage de la lame basale.

Ces glycoprotéines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que l'attachement cellulaire et l'extension des neurites. La laminine 5 jouerait un rôle dans la morphogénèse du poumon en modulant la migration des cellules épithéliales trachéales fœtales [Coraux et coll., 2002], ainsi que dans la progression tumorale [Lohi J, 2001].

### II-1-3-3 La vitronectine

La vitronectine est une glycoprotéine de 75 kDa à la fois présente dans le plasma sanguin et déposée sous forme fibrillaire dans la MEC de nombreux tissus [Dvorak et coll., 1995 ; Schwartz et coll., 1999], en particulier des tissus lésés. Elle existe sous deux conformations, l'une native dite "fermée" et l'autre dite "étendue". La vitronectine du plasma sanguin se trouve dans la conformation fermée, alors que la vitronectine matricielle se présente sous la deuxième conformation [Hess et coll., 1995]. Cette glycoprotéine est capable de lier à la fois l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1) et le récepteur de l'activateur de plasminogène du type urokinase (uPAR). Ces deux molécules se trouvent ainsi en compétition pour le même site de liaison [Deng et coll., 1996]. PAI-1 peut se lier aux deux conformations de la vitronectine alors que l'uPAR se lie préférentiellement à la conformation étendue. Les intégrines  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_8\beta_1$  peuvent se lier à la séquence RGD de la vitronectine. PAI-1 entre aussi en compétition au niveau de ces interactions [Stefansson et Lawrence, 1996 ; Kjoller et coll., 1997]. La vitronectine est ainsi capable de réguler la coagulation sanguine en fixant l'héparine, le plasminogène et les inhibiteurs des activateurs du plasminogène [Felding-Habermann et Cheresch, 1993] et fournit un support à l'étalement et à la migration cellulaire [Andreasen et coll., 1997].

### **II-1-4 Les protéines matricellulaires**

Le terme "matricellulaire" est apparu en 1995 pour désigner un sous-groupe de protéines de la matrice extracellulaire dont les propriétés peuvent être distinguées des

macromolécules structurales d'une part, et des protéines bio-actives d'autre part, tels que les facteurs de croissances, les cytokines et protéases [Bornstein, 1995].

Les protéines matricellulaires possèdent de nombreuses propriétés, qui justifient leur ségrégation dans une sous-catégorie de protéines matricielles. En effet, elles n'ont principalement pas un rôle structural, dans le sens où elles ne constituent pas des composants intégraux des entités physiques comme des lames basales ou des fibres. Ces protéines fonctionnent plutôt contextuellement comme adaptateurs et modulateurs des interactions cellule-matrice [Sage et Bornstein, 1991]. On présume que la nature complexe de leurs fonctions dérive de leur capacité à interagir avec plus d'un récepteur de surface cellulaire, et avec des cytokines, des facteurs de croissance, des protéases et des protéines structurales. La nature contextuelle de leurs fonctions peut ainsi refléter la composition de la matrice, la disponibilité des molécules bio-actives et l'expression de différents récepteurs cellulaires de surface dans divers environnements cellulaires.

Contrairement aux souris dont un gène codant une protéine de structure a été invalidé et qui souvent présentent un phénotype léthal ou sévère, les souris Knock Out (K.O.) pour une protéine matricellulaire apparaissent étonnamment normales après observations superficielles. Ceci peut découler du fait que l'éventail de protéines possédant des fonctions structurales est plus limité que celui des protéines possédant des fonctions modulatrices. Probablement que les ajustements compensatoires complexes requis pour la survie d'un organisme face à l'absence de protéines régulatrices sont plus facilement réalisables que la compensation d'un défaut d'expression de protéines structurales, puisque les voies de régulation sont des réseaux complexes avec beaucoup d'opportunités pour des interactions compensatoires.

#### II-1-4-1 Les ténascines

Quatre membres de la famille des ténascines ont été décrits jusqu'à présent chez les vertébrés. Il s'agit des ténascines-C, -R, -X (-Y chez le poulet) et -W [Erickson HP, 1993 ; Chiquet-Ehrismann R, 2004]. Ce sont de grosses protéines qui ont la capacité de s'oligomériser : les ténascines-C et -W forment des hexamères, alors que la ténascine-R a été isolée comme une molécule trimérique. Les ténascines sont synthétisées principalement par les cellules du tissu conjonctif. Toutefois, chaque ténascine possède un profil d'expression typique. Ainsi, la ténascine-R est exclusivement exprimée dans le système nerveux central. La ténascine-C est également exprimée dans le système nerveux central, mais est également un constituant important des nerfs périphériques [Joester et Faissner, 2001]. De plus, la ténascine-C est fortement exprimée durant l'embryogenèse, transitoirement pendant

l'organogenèse, ensuite est absente ou fortement réduite dans les organes adultes, mais réapparaît dans des situations pathologiques causées par des infections, des inflammations ou lors de la tumorigenèse [Chiquet-Ehrismann et Chiquet, 2003]. Enfin, la ténascine-X est un constituant important de la MEC des muscles et la ténascine-W a son plus haut niveau d'expression dans le squelette adulte, ainsi que dans les reins et certains muscles [Scherberich et coll., 2004].

Les ténascines, contrairement à beaucoup de ces protéines de la MEC, favorisent seulement le faible attachement des cellules et ne stimulent pas la propagation cellulaire. La ténascine C est capable d'inhiber l'adhésion de beaucoup de types cellulaires à la fibronectine et peut ainsi être classée comme une protéine modulant l'adhésion [Orend et Chiquet-Ehrismann, 2000]. La ténascine-R a été reportée comme favorisant l'adhésion des cellules de crêtes neurales d'une part et comme étant un répulsif pour les neurites aussi bien *in vitro* qu' *in vivo* d'autre part [Zacharias et coll., 2002 ; Becker et coll., 2003]. Enfin, la ténascine-X, plus que les autres ténascines, médie l'adhésion cellulaire mais pas la dissémination [Elefteriou et coll., 1999].

Des anticorps dirigés contre la ténascine-C ont été utilisés comme diagnostics et en thérapie pour beaucoup de cancers différents. Il a, en effet, été montré que l'expression de ténascine-C était corrélée avec l'angiogenèse et l'infiltration locale de tissus normaux par des cellules tumorales issues de divers types de carcinomes.

#### II-1-4-2 L'ostéonectine/SPARC/BM-40

L'ostéonectine, encore appelée SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) ou BM-40 (Basement Membrane protein of 40 kDa) est une glycoprotéine de 32 kDa qui module les interactions cellulaires avec la MEC en se liant aux protéines structurales de la matrice, comme le collagène et la vitronectine, et en abrogeant les adhésions focales. Ceci contribue à son effet contre-adhésif sur les cellules. L'ostéonectine inhibe également la prolifération cellulaire par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, module l'activité de facteurs de croissance tels que le PDGF, le FGF2 et le VEGF et affecte l'expression de MMPs. L'expression de SPARC chez l'animal adulte est très fortement limitée aux tissus en remodelage, comme les os, les muqueuses intestinales ou les blessures cicatrisantes, et est préminente dans les tumeurs et désordres associés à la fibrose [Brekken et Sage, 2000].

### II-1-4-3 Les thrombospondines

Les thrombospondines (TSPs) sont des glycoprotéines animales extracellulaires à multi-domaines et liant le calcium. Les travaux se sont focalisés sur leurs propriétés et leurs fonctions chez les vertébrés, où les TSPs ont été identifiées pour la première fois. Le membre prototype de la famille est la thrombospondine-1 (TSP-1). Sa structure, ses fonctions, ainsi que son rôle dans la progression tumorale seront détaillé dans le chapitre V de l'introduction. Cette glycoprotéine est notamment impliquée dans l'agrégation plaquettaire, dans les réponses inflammatoires et dans la régulation de l'angiogenèse durant la cicatrisation et la croissance tumorale. Beaucoup de ces propriétés sont partagées par la TSP-2, qui possède également des rôles complexes dans l'assemblage de la MEC des tissus conjonctifs [Lawler, 2000 ; Bornstein, 2000]. L'autre TSP étudiée, de façon approfondie est la TSP-5 ou COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein). Celle-ci est principalement exprimée dans les cartilages et dans certains tissus conjonctifs, et joue un rôle dans l'attachement des chondrocytes, dans la différenciation et dans l'assemblage de la MEC du cartilage [Unger et Hecht, 2001]. Par contre, à ce jour, peu de connaissances sont acquises sur la biologie des TSP-3 et TSP-4.

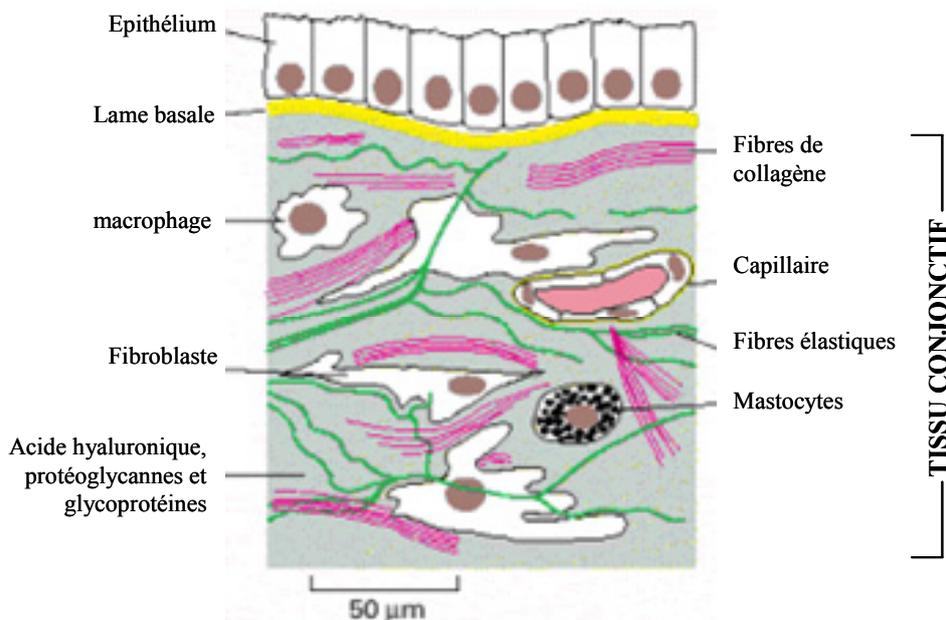
Les analyses de souris KO ont établies que TSP-1, TSP-2 et TSP-5 possède chacun un rôle distinct et non redondant dans des tissus spécifiques [Kyriakides et coll., 1998 ; Lawler et coll., 1998, Svensson et coll., 2002]. Ces rôles distincts sont dus à des différences de régulation transcriptionnelle de chaque gène et également à des différences dans les capacités fonctionnelles des membres individuels de la famille. Par exemple, les anomalies phénotypiques dans les poumons de souris dont le gène de la TSP-1 est éteint apparaît résulter de l'absence d'activation du TGF- $\beta$ , une activité qui est unique à TSP-1 [Schultz-Cherry et coll., 1995 ; Crawford et coll., 1998]. Toutefois, il apparaît un point commun fondamental dans les mécanismes cellulaires et tissulaire qui sont à la base des fonctions de TSP : toutes les TSPs de vertébrés favorisent l'attachement cellulaire de manière calcium-dépendant et se lient aux autres glycoprotéines et protéoglycannes de la MEC. Selon le type cellulaire et le membre de la famille TSP, il existe des activités supplémentaires, incluant l'induction de l'organisation du cytosquelette, l'organisation et la migration cellulaire, la modulation de la prolifération des cellules et également des effets indirects sur la fonction cellulaire, à travers la régulation de protéases extracellulaires et l'activation ou l'inhibition de cytokines et de facteurs de croissance [Adams, 2001].

## II-2 Organisation de la matrice extracellulaire

Il existe deux catégories de MEC, structurellement et fonctionnellement distinctes. Ce sont les MECs des tissus conjonctifs et les MECs des épithélia.

### II-2-1 La matrice des tissus conjonctifs

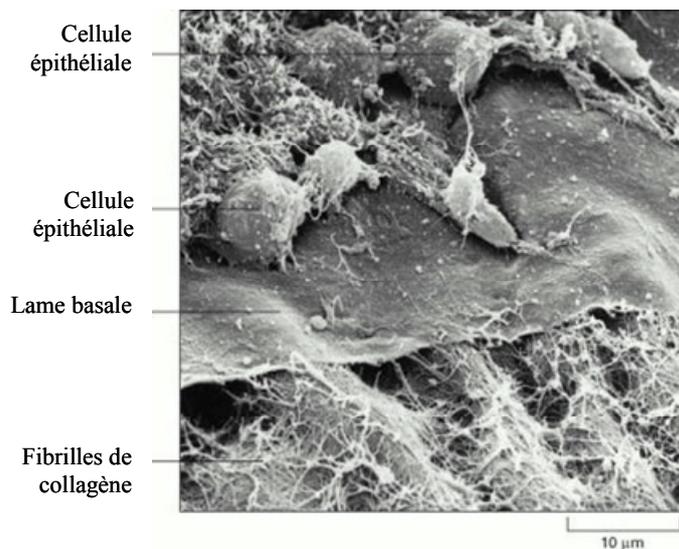
La matrice interstitielle entoure les cellules du tissu conjonctif telles que les fibroblastes, les ostéoblastes, les chondrocytes et les macrophages. Elle se caractérise par un enchevêtrement de fibres de collagènes, principalement les collagènes fibrillaires, de fibres élastiques mais aussi d'autres composés minoritaires tels que des protéoglycannes, des glycoprotéines d'adhésions et des protéines matricellulaires [Aumailley et Gayraud, 1998 ; Tryggvason et coll., 1987]. Cet environnement constitue un réservoir de facteurs de croissance qui se trouve piégés dans le réseau de macromolécules et peuvent être libérés dans certaines conditions physiologiques et pathologiques.



**Figure 7 :** Le tissu conjonctif sous-jacent à un épithélium. Ce tissu contient divers cellules et composant de la MEC. Le type cellulaire prédominant est le fibroblaste qui sécrète une abondante MEC.

## II-2-2 La matrice des lames basales

Les lames basales sont des matrices extracellulaires fines et spécialisées qui séparent les couches de cellules épithéliales et endothéliales des cellules sous-jacentes au stroma de collagène [Yurchenco et O'Rear, 1994 ; Timpl, 1996], (figure 8).

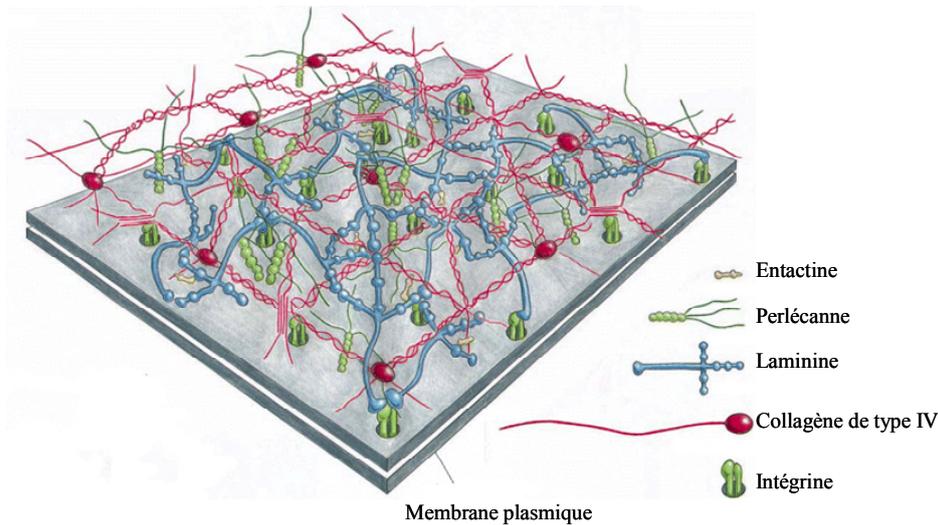


**Figure 8 :** Photographie en microscopie électronique de la lame basale de la cornée d'un embryon de poulet. Certaines cellules épithéliales ont été retirées pour exposer la face supérieure de la lame basale, qui ressemble à un tapis. Le réseau de fibrilles de collagène du tissu conjonctif sous-jacent interagit avec la face inférieure de la lame.

Elles sont constituées d'un assemblage complexe de protéines matricielles, telles que le collagène IV, la laminine, l'entactine (ou nidogène) et des protéoglycannes à chondroïtine-sulfate ou héparane-sulfate, dont majoritairement le perlécane [Schittny et yurchenco, 1989 ; Kalluri, 2003]. D'autres macromolécules d'origine sérique ou plasmatique ou encore issues de cellules stromales peuvent être piégées comme la fibronectine, la vitronectine, l'ostéonectine, des ions, des facteurs de croissance ou autres cytokines [Paulsson, 1992].

Les lames basales jouent avant tout un rôle d'ancrage et de support mécanique aux cellules épithéliales, nécessaire au maintien d'une structure cohésive, mais elles peuvent également se trouver entre deux feuilletts cellulaires et fonctionner comme un filtre hautement sélectif, par exemple dans les glomérules rénaux. Elles sont aussi capables de déterminer la polarité cellulaire, d'influencer le métabolisme cellulaire, d'organiser les protéines dans la

membrane plasmique adjacentes, de promouvoir la survie cellulaire, la prolifération ou la différenciation et de servir d'"autoroute" spécifique pour la migration cellulaire.



**Figure 9 :** Un modèle de la structure moléculaire de la lame basale. La lame basale est formée d'interactions spécifiques entre les protéines de collagène IV, les laminines, l'entactine et un protéoglycane, le perlécanne. Il existe diverses isoformes de collagène de type IV et de laminine, chacun ayant une distribution tissulaire particulière. (D'après Colognato et Yurchenco, 2000)

## II-3 Rôles de la matrice extracellulaire

La MEC fut longtemps considérée comme servant principalement d'échafaudage relativement inerte pour stabiliser la structure physique des tissus [Bosman et Stamenkovic, 2003]. Mais il est clair aujourd'hui que la MEC joue un rôle bien plus actif et complexe dans la régulation du comportement des cellules qui interagissent avec elle. Elle joue, par exemple, un rôle majeur dans la régulation du développement embryonnaire [Adams et Watt, 1993], dans la réparation tissulaire ou encore lors de la différenciation cellulaire [Streuli, 1999].

Mais la matrice joue également un rôle clé dans la progression tumorale. En effet, les différents modules constitutifs des macromolécules matricielles ou certains ensembles de ces modules représentent, pour les cellules qui viennent à leur contact, des signaux reconnus par

des récepteurs spécifiques de la famille des intégrines. Ces signaux aboutissent à la modulation de processus aussi divers que l'adhérence, la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire ainsi que l'apoptose. Ils modulent également la synthèse protéique, l'expression et l'activation de protéases et de leurs activateurs ou inhibiteurs physiologiques. La matrice est un véritable réservoir de facteurs de croissance et de cytokines. L'action des protéases sur les macromolécules matricielles libère ces substances dans l'espace environnant, ainsi que des peptides dérivés des macromolécules qui peuvent par eux-mêmes posséder des activités biologiques parfois très différentes de celles des molécules dont ils sont issus. Pour désigner ces peptides issus de la dégradation des macromolécules de la MEC et capables de réguler l'activité cellulaire, le terme de "matrikine" a été proposé [Maquart et coll., 1999].

En fait, la MEC est soumise à un continuuel renouvellement alternant dégradation et synthèse. Ce renouvellement régulé est crucial dans divers processus biologiques et pathologiques importants. Une dégradation rapide se produit, par exemple, lors de l'involution de l'utérus après accouchement. Une dégradation plus localisée des composants de la matrice est nécessaire lorsque les cellules migrent à travers une lame basale. Cela se produit lorsque les leucocytes d'un vaisseau sanguin migrent à travers la lame basale dans les tissus en réponse à une infection ou une lésion, ou lorsque les cellules cancéreuses migrent depuis leur site d'origine pour former des métastases.

Dans chacun de ces cas, les composants matriciels sont dégradés par des enzymes protéolytiques sécrétées localement par la cellule. Beaucoup de ces protéases appartiennent à l'une des deux classes suivantes : les métalloprotéases matricielles et les sérine-protéases. Ces deux classes d'enzymes coopèrent pour dégrader les protéines matricielles comme le collagène, la laminine ou la fibronectine.

### **III- LES METALLOPROTEINASES MATRICIELLES**

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) constituent une famille d'enzymes protéolytiques appartenant à la famille des zincines [Gomis-Rüth, 2003]. Ce sont des endopeptidases  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes dont l'activité est optimale à pH neutre. Elles renferment au sein de leur site actif un ion  $\text{Zn}^{2+}$  et sont toutes capables de dégrader au moins un des composant de la MEC.

Les MMPs sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs et doivent être clivées pour acquérir leur activité. Celles-ci sont régulées *in vivo* par des inhibiteurs naturels et spécifiques appelés TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*). Il est admis que lorsque l'équilibre protéases-inhibiteurs de protéases est rompu soit par surexpression des MMPs soit par déficience des TIMPs, cela conduit à un état pathologique.

### III-1 Classification des MMPs

A ce jour, 25 MMPs ont été caractérisées chez les vertébrés, dont 21 chez l'homme [Sternlicht et Werb, 2001]. Ces enzymes possèdent des caractéristiques structurales communes et sont généralement classées selon leur séquence protéique et leur spécificité de substrat.

Historiquement, les MMPs ont été divisées en différentes classes appelées collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines et métallo-élastases sur la base de leur spécificité de substrats matriciels (Tableau 4). Il existe également des MMPs associées à la membrane plasmique appelées *Membrane Type Metalloproteinases* (MT-MMPs).

Cependant, avec la découverte de nouveaux substrats non matriciels, une nouvelle classification basée sur la structure de ces protéases a été créée [Egeblad et Werb, 2002], (Figure 10). En effet les MMPs participent à la libération de précurseurs membranaires de facteurs de croissance incluant le TGF $\alpha$  [Peschon et coll., 1998]. De plus, des récepteurs aux facteurs de croissances ont également été décrits parmi les substrats des MMPs. Par exemple, le FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) est clivé par la MMP-2, tandis que HER2 et HER4, deux membres de la famille du récepteur de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ainsi que le récepteur à l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), c-met, sont substrats de MMPs non identifiées [Codony-Servat et coll., 1999 ; Vecchi et coll., 1996 ; Nath et coll., 2001].

Certaines molécules d'adhésion sont également des substrats de MMPs. Le clivage de la cadhérine E par la matrilysine ou la stomélysine-3 et celui du CD44 par la MMP-14, augmentent le pouvoir invasif des cellules [Noe et coll., 2001 ; Kajita et coll., 2001]. Par ailleurs, le clivage du précurseur de l'intégrine  $\alpha$ v par la MMP-14 stimule la migration des cellules tumorales [Deryugina, 2002].

Famille	Nom	N°	Substrats matriciels	Autres substrats
<b>Collagénase</b>	Collagénase interstitielle	MMP-1	Collagènes I, II, III, VII, VIII, X, gélatine, entactine, agrécannes	Amyloïde A sérique, serpines
	Collagénase des neutrophiles	MMP-8	Collagènes I, II, III, V, VII, VIII, X, gélatine, fibronectine, agrécannes	serpines
	Collagénase-3	MMP-13	Collagènes I, II, III, IV, V, X, XI, XIV, gélatine, fibronectine, laminine, ténascine, agrécannes, perlécannes	PAI-2
	Collagénase-4	MMP-18	Collagène I	
<b>Gélatinases</b>	Gélatinase A	MMP-2	Gélatine, collagènes IV, V, VII, X, XI, élastine, fibronectine, laminine, décorine, entactine	Galectine-3, IL <sub>1β</sub> , plasminogène, FGFR1
	Gélatinase B	MMP-9	Gélatines, collagène IV, V, XIV, fibronectine, élastine	Galectine-3, IL <sub>1β</sub> , plasminogène
<b>Stromélysines</b>	Stromélysine-1	MMP-3	Gélatine, fibronectine, laminine, collagènes III, IV, IX, X, vitronectine, protéoglycannes	SSA3, substance P, serpines, IL <sub>1β</sub>
	Stromélysine-2	MMP-10	Fibronectine, collagène I, III, IV, V, X, laminine, gélatine	Caséine
	Stromélysine-3	MMP-11	Fibronectine, laminine, collagène IV, gélatine	Caséine, α2-macroglobuline, cadhérine E
	Enamélysine	MMP-20	amélogénine	
<b>Matrilysine</b>	Matrilysine	MMP-7	Fibronectine, laminine, gélatines, collagène IV, protéoglycannes	Chaîne B de l'insuline, caséine, TNFα, plasminogène, cadhérine E
	Matrilysine 2 (endométase)	MMP-26	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine, gélatine, collagène I, IV	Inhibiteur de protéinase α-1
<b>Métalloélastase</b>	Métalloélastase	MMP12	Elastine, fibronectine, collagène IV, gélatine, entactine, vitronectine	plasminogène
<b>MMPs de type membranaire</b>	MT1-MMP	MMP-14	Collagènes I, II, III, fibronectine, laminine, vitronectine	Caséine, intégrine αv, CD44
	MT2-MMP	MMP-15	Gélatine, fibronectine, laminine, collagènes I, III, nidogène, ténascine, agrécannes, perlécane	Caséine
	MT3-MMP	MMP-16	Collagène III, fibronectine, gélatine	Caséine
	MT4-MMP	MMP-17	gélatine	
	MT5-MMP	MMP-24	Non connu	
	MT6-MMP	MMP-25	Collagène IV, gélatine, fibronectine, fibrine	

**Tableau 4 : Récapitulatif des principales MMPs et de leurs substrats.**

## III-2 Organisation structurale des MMPs

Les MMPs peuvent être subdivisées en huit groupes structuraux distincts : cinq correspondent aux MMPs sécrétées et trois aux MMPs associées à la membrane. Cette subdivision correspond à la classification des MMPs basée sur la structure de ces protéases (Figure 10).

La comparaison de la structure primaire des différentes MMPs révèle la présence de domaines conservés tels que :

- le pré-domaine : localisé à l'extrémité N-terminale, il permet de diriger la protéine vers le réticulum endoplasmique. Il s'agit d'un peptide signal comprenant 17 à 20 acides aminés, hydrophobes pour la plupart.
- Le pro-domaine : il contient environ 80 à 90 acides aminés dont une séquence de 8 résidus très conservés : PRCGVDPV. Les pro-MMPs, ou formes latentes des MMPs, sont activées par clivage de ce domaine, qui contient un groupement thiol interagissant avec un ion  $Zn^{2+}$  maintenant le zymogène inactif, et un domaine catalytique possédant un site de fixation pour le zinc. L'activation des pro-MMPs est basée sur la propriété que possèdent certaines substances (SDS, urée, radicaux oxydants...) ou protéases, de rompre la liaison de coordination cystéine- $Zn^{2+}$ , soit directement, soit en altérant la conformation du pro-domaine.
- Le domaine catalytique : il renferme le site actif de l'enzyme et présente une séquence hautement conservée : HExGHxxGxxHs permettant la stabilité de l'ion  $Zn^{2+}$ . Les 3 résidus histidyl de cette séquence sont en effet liés à l'ion du site actif et sont donc nécessaires à l'activité protéasique de l'enzyme. Ce domaine contient 162 à 173 acides aminés.
- La région charnière : cette région riche en proline relie le domaine catalytique de l'enzyme à son domaine C-terminal, encore appelé domaine d'homologie à l'hémopexine. Elle présente une flexibilité importante permettant le repliement du

domaine C-terminal sur le domaine catalytique. Seules les MMP-7 et MMP-26 (les matrilysines) ne possèdent pas ce domaine.

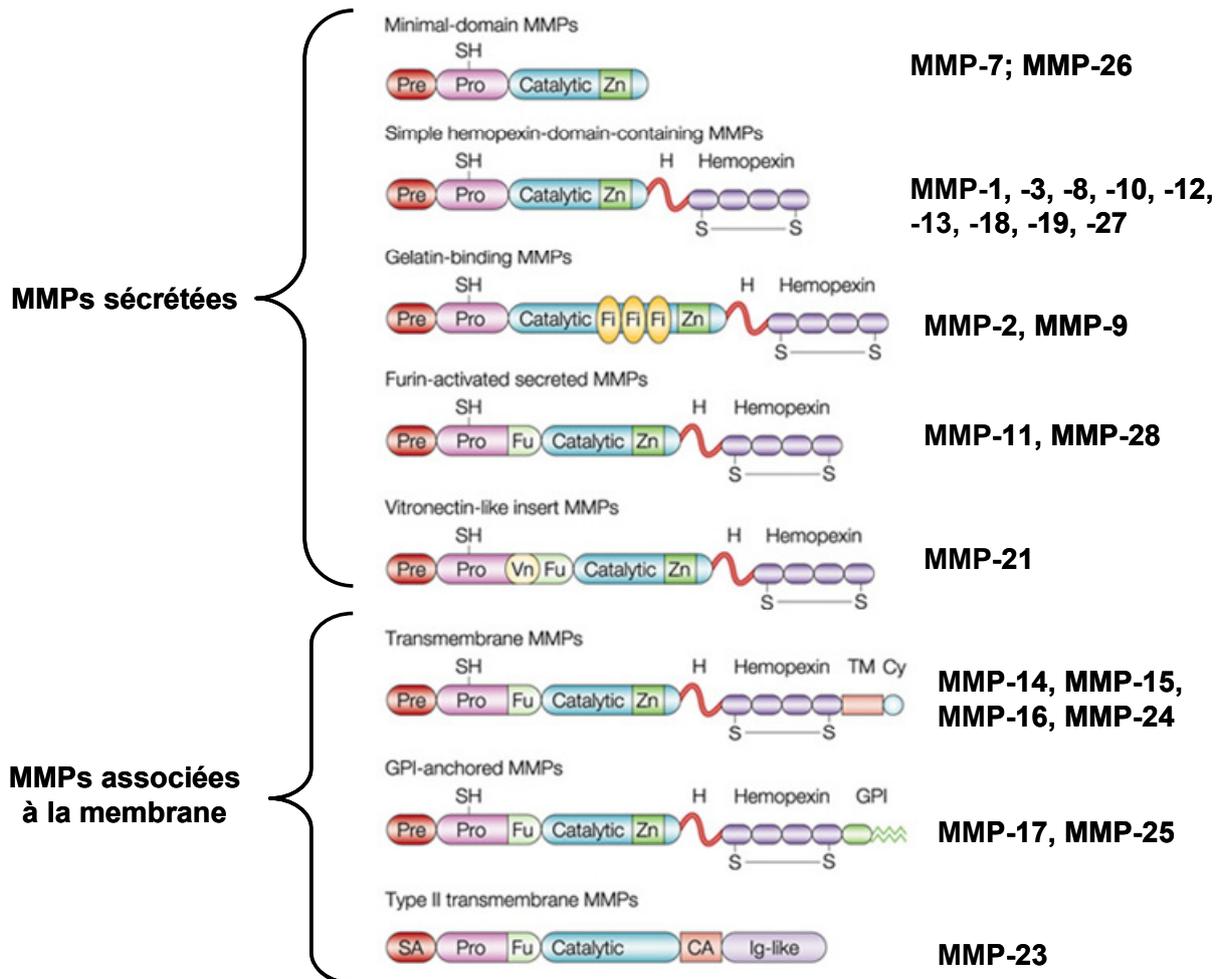
- Le domaine C-terminal : ou domaine d'homologie à l'hémopexine : il est présent dans tous les MMPs hormis les matrilysines. Il comprend environ 200 acides aminés et influence la spécificité de substrats des MMPs, leur liaison aux TIMPs, ainsi qu'à celles de molécules de surface.

Outre ces 5 domaines fondamentaux, les MMPs possèdent des domaines supplémentaires qui leur confèrent leur spécificité :

- le domaine similaire aux séquences répétées de type II de la fibronectine : ou CBD (Collagen Binding Domain) : seules les gélatinases A et B possèdent ce domaine. Il est constitué de 3 répétitions identiques situées dans le domaine catalytique. Il confère à ces protéases la capacité de lier la gélatine.
- Le domaine de reconnaissance de la furine : il est constitué d'environ 10 acides aminés et se situe entre le pro-domaine et le domaine catalytique des MMPs-11, -21, -28, -23 et des MT-MMPs. Il est sensible au clivage par les protéases à sérine de type furine et les MMPs qui possèdent ce domaine peuvent ainsi être activées par ce type d'enzyme, au niveau intracellulaire.
- Le domaine transmembranaire : constitué d'une séquence hydrophobe, il est spécifique de la majorité des MT-MMPs décrites. Il est situé après le domaine C-terminal et confère ainsi aux MMPs-14, -15, -16 et -24 une localisation membranaire.

Les MMP-17 et MMP-25 (respectivement MT4-MMP et MT6-MMP), qui constituent la deuxième classe de MT-MMPs décrites, sont ancrées à la membrane plasmique via un groupement GPI situé juste après le domaine C-terminal.

MMP-23 représente la troisième classe de MMPs membranaires. Elle possède un signal d'ancrage N-terminal (SA) qui l'adresse à la membrane plasmique, et la définit comme MMP transmembranaire de type II. Cette MMP est également caractérisée par son domaine riche en cystéine (CA) et son domaine de type immunoglobuline ( Ig).



**Figure 10 : Organisation structurale des MMPs.** *Pre* : pré-peptide ; *Pro* : pro-peptide ; *Catalytic* : domaine catalytique ; *Hemopexin* : domaine similaire à l'hémopexine ; *Fu* : domaine de reconnaissance des sérine protéases à furine intracellulaire ; *Vn* : domaine similaire à la vitronectine ; *Fi* : domaine similaire aux séquences répétées de type II de la fibronectine ; *H* : région charnière ; *SH* : groupement thiol ; *Zn* : site de fixation du zinc ; *TM* : domaine transmembranaire ; *Cy* : domaine cytoplasmique ; *GPI* : glycosylphosphatidylinositol ; *CA* : domaine riche en cystéine ; *Ig-like* : domaine similaire à l'immunoglobine. (d'après Egeblad et Werb, 2002)

### III-3 Régulation des MMPs

La régulation des MMPs s'effectue à trois niveaux principaux : au niveau transcriptionnel, au niveau de leur activation par clivage protéolytique du pro-domaine et au niveau de leur activité par inhibition de l'enzyme active. D'autres mécanismes de contrôle

impliquent la régulation de la stabilité des ARNm, l'efficacité de la traduction, la compartimentalisation et la sécrétion de l'enzyme, le clivage du substrat ou encore le recrutement et l'internalisation cellulaire.

### III-3-1 Régulation de l'expression des MMPs

Etant donné la redondance de spécificité de substrats des MMPs (tableau 4), les fonctions biologiques de ces enzymes sont en grande partie dictées par un profil d'expression différentielle. Ce sont des différences spatiales, temporelles ou d'induction d'expression qui leur confèrent un rôle unique. La plupart des MMPs sont finement régulées au niveau transcriptionnel. Elles sont exprimées à faible niveau dans les tissus et ne voient leur expression augmenter que lorsque le remodelage de la MEC est requis ou lors de physiopathologies caractérisées par une forte dégradation matricielle. Une forte conservation d'éléments régulateurs est observée dans les régions promotrices de divers gènes de MMPs. L'expression génique des MMPs est régulée par des facteurs inducteurs ou répresseurs qui influencent de multiples voies de signalisation. Cette expression peut, par exemple, être modulée par les esters de phorbol, les signaux transduits *via* les intégrines de surface, les protéines de la MEC (fibronectine...) ou un stress cellulaire. Leur expression est également induite par divers facteurs de croissance (EGF, PDGF, VEGF, TNF $\alpha$  et TGF- $\beta$ ) et cytokines (interleukines, interférons) [Vincenti et coll., 1996 ; Kähäri et Saarialho-Kere, 1997 ; Shapiro, 1998 ; Woessner, 1998]. La plupart de ces stimuli induisent l'expression et/ou l'activation des proto-oncogènes c-fos et c-jun, qui après hétérodimérisation lient les sites AP-1 des régions promotrices de plusieurs MMPs [Westermarck et Kähäri, 1999]. Cependant, un même signal peut induire de façon coordonnée à la fois l'augmentation de l'expression de certaines MMPs et la diminution de l'expression de certaines autres.

La régulation d'expression de la MMP-2 paraît quelque peu différente. En effet, celle-ci est souvent exprimée de manière constitutive et présente une distribution tissulaire ubiquitaire. De plus, l'analyse du promoteur de la MMP-2 révèle l'absence de site PEA3, site de fixation de facteurs de transcription de la famille ETS, impliqué dans l'expression d'un grand nombre de MMPs [Westermarck et Kähäri, 1999 ; Vincenti, 2001].

Des mécanismes post-transcriptionnels peuvent aussi influencer l'expression des MMPs. La demie vie des ARNm codant pour les MMP-1 et MMP-3 est augmentée par les esters de phorbol et l'EGF, alors que celle des ARNm codant pour la MMP-13 est augmentée

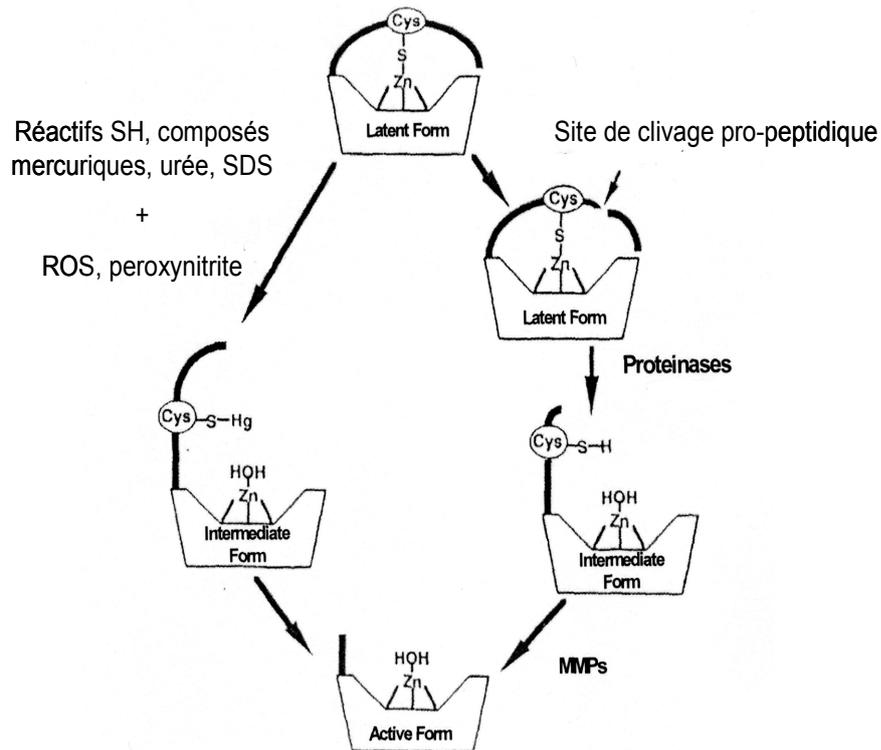
par le PDGF et les glucocorticoïdes et diminuée par le TGF- $\beta$  [Delany et coll., 1995 ; Vincenti, 2001].

### III-3-2 Régulation de l'activation des MMPs

#### III-3-2-1 Mécanismes d'activation généraux

A l'exception des MMPs associées à la membrane et de la MMP-11, les MMPs sont sécrétées sous forme latente et sont ensuite activées dans l'environnement péricellulaire ou extracellulaire. Les exceptions précitées ont en effet la particularité d'être activées au niveau de l'appareil de Golgi par la furine et atteignent par conséquent le compartiment extracellulaire sous forme mature. L'activation initiale de l'ensemble des autres MMPs résulte de la déstabilisation de la liaison entre l'ion  $Zn^{2+}$  catalytique présent au niveau du site actif de l'enzyme et la cystéine de la séquence PRCGVDPV située dans le pro-domaine (figure 11). Cette déstabilisation peut être réalisée soit *in vivo* et *in vitro* par l'action de protéases (plasmine, MMPs...), soit *in vitro* par l'utilisation de radicaux libres, de dérivés organomercuriels, de détergents tel que le SDS et l'urée, ou encore par la chaleur ou un pH acide [Nagase, 1997 ; Stetler-Stevenson et coll., 1989 ; Sternlicht et Werb, 2001].

Cependant, les mécanismes moléculaires d'activation des MMPs *in vivo* restent encore à élucider, dans la mesure où les protéases impliquées dans les différentes étapes d'activation des MMPs sont mal connues. Actuellement, seul le mécanisme d'activation de la MMP-2 est bien décrit.



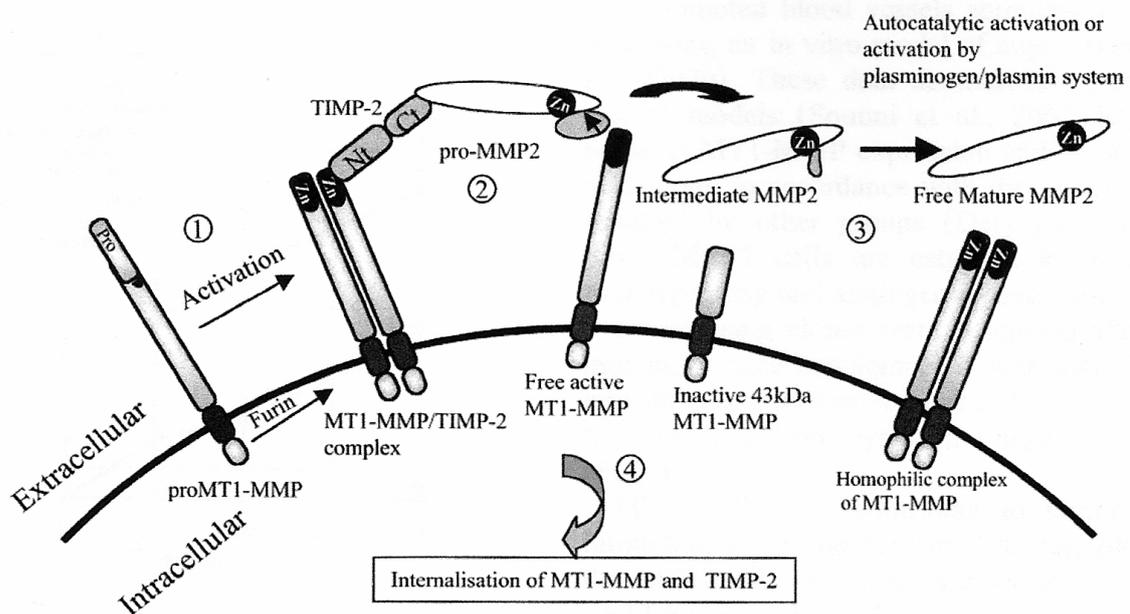
**Figure 11 :** Schéma d'activation des pro-MMPs. Dans une première étape, le clivage enzymatique du pro-peptide par d'autres MMPs active ou par des sérines protéases génère la forme intermédiaire. Dans une seconde étape, la forme intermédiaire est clivée par l'action de MMPs (MMP-3, MMP-1) pour générer la forme active, mature. Alternativement, les composés qui réagissent avec le groupement SH peuvent aussi activer la pro-MMP. (d'après Novotna et herget, 2002)

### III-3-2-2 Cas particulier de la MMP-2

La pro-MMP-2 possède un mécanisme d'activation qui lui est particulier. Il met en jeu un complexe quaternaire membranaire formé de deux molécules de MT1-MMP, d'une molécule de TIMP-2 et d'une molécule de pro-MMP-2. Il s'effectue selon le modèle proposé par la figure 12 [Strongin et coll., 1995 ; Butler et coll., 1998 ; Zucker et coll., 1998 ; Wang et coll., 2000] :

- (1) la pro- MT1-MMP peut être activée soit de façon intracellulaire par la furine, soit de façon extracellulaire par la plasmine.

- (2) Le TIMP-2 agit comme une molécule adaptatrice entre la MT1-MMP et la pro-MMP2 (72 kDa). Une deuxième molécule de MT1-MMP libre clive partiellement le pro-domaine de la pro-MMP2 générant une forme intermédiaire de la MMP-2 (66 kDa).
- (3) La maturation finale de l'enzyme est effectuée soit par autocatalyse, soit via la plasmine. La MMP-2 active (62 kDa) est alors libérée de la surface cellulaire.
- (4) La MT1-MMP et le TIMP-2 sont ensuite internalisés dans le cytoplasme.



**Figure 12** : modèle d'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP. *Nt* : domaine N-terminal et *Ct* : domaine C-terminal du TIMP-2. (d'après Sounni et coll., 2003)

### III-3-3 Régulation de l'activité des MMPs

La régulation de l'enzyme active peut se faire par l'inhibition de l'activité de l'enzyme. Outre l'inhibiteur non spécifique  $\alpha$ 2-macroglobuline, un inhibiteur plasmatique de 725 kDa, synthétisé par le foie et capable d'inhiber les MMPs, mais aussi d'autres protéases

telles que la plasmine, la cathepsine G ou encore l'élastase leucocytaire [Travis et Salvesen, 1983]. Il existe deux types d'inhibiteurs plus ou moins spécifiques des MMPs : les inhibiteurs physiologiques, constitués par la famille des TIMPs et les inhibiteurs synthétiques.

### III-3-3-1 Les inhibiteurs tissulaires des MMPs : les TIMPs

A ce jour, la famille des TIMPs est composée de quatre membres dont les gènes ont été clonés chez l'homme : TIMP-1, glycoprotéine de 28,5 kDa [Carmichael et coll., 1986] ; TIMP-2, non glycosylé, 21 kDa [Stetler-Stevenson et coll., 1989] ; TIMP-3, possédant un site de glycosylation à l'extrémité C-terminale, masse moléculaire variant de 22 à 25 kDa [Apte et coll., 1994] et TIMP-4, non glycosylé, 22 kDa [Greene et coll., 1996].

Ces inhibiteurs naturels présentent des caractéristiques communes [Brew et coll., 2000]. Ils possèdent dans leur séquence 12 cystéines conservées formant 6 ponts disulfure organisant la structure tertiaire de ces molécules en 2 sous-domaines distincts, un long domaine N-terminal et un domaine C-terminal, impliqués dans les interactions avec les MMPs. Les TIMPs forment des complexes stoechiométriques non covalents et de forte affinité, non seulement avec les formes actives des MMPs mais aussi avec leur pro-forme, empêchant ainsi leur activation. En théorie, les TIMPs sont tous capables d'inhiber les MMPs. Cependant il s'avère que TIMP-1 inhibe préférentiellement la MMP-9, ainsi que les MMPs-1 et -3, alors que TIMP-2 inhibe préférentiellement la MMP-2. TIMP-3 présente des propriétés inhibitrices préférentielles pour les MMPs-2, -9, -1 et -3. TIMP-4, enfin, est capable d'inhiber la MMP-2.

Le rôle des TIMPs dans le cancer est assez controversé. Certains auteurs leur confèrent une activité anti-tumorale, d'autres une activité pro-tumorale [Henriet et coll., 1999].

### III-3-3-2 Les inhibiteurs synthétiques des MMPs

Etant donné l'implication des MMPs dans diverses pathologies graves, l'industrie pharmaceutique a développé des inhibiteurs synthétiques de MMPs à visée thérapeutique. Ces inhibiteurs appartiennent à deux classes : la première comprend des inhibiteurs pseudo-peptidiques et la seconde, des inhibiteurs non peptidiques.

Les inhibiteurs pseudo-peptidiques miment le site de clivage du substrat de l'enzyme. Ces inhibiteurs entrent donc en compétition avec le substrat des MMPs et se lie au niveau de leur site catalytique par chélation de l'ion  $Zn^{2+}$ . La majorité des inhibiteurs de cette classe sont des dérivés hydroxamates, dont les plus connus sont le Batimasta et le Marimastat, développés par la British Biotech. Pharmaceuticals L.t.d (Oxford, UK). Cependant, les résultats des essais cliniques réalisés avec ces molécules non sélectives sont décevants en raison de l'apparition d'importants effets secondaires.

Le manque de sélectivité des inhibiteurs pseudo-peptidiques a conduit à la synthèse d'inhibiteurs non peptidiques. Le mode d'inhibition est similaire à celui des agents précédemment décrits avec toutefois une plus grande spécificité pour le type de MMP inhibé. Les dérivés des tétracyclines (antibiotique) permettent d'inhiber les collagénases et les gélatinases par divers mécanismes : ils bloquent l'activité par chélation de l'ion  $Zn^{2+}$  du site catalytique, interfèrent avec l'activation protéolytique des pro-enzymes et réduisent l'expression des MMPs.

Il existe d'autres niveaux de régulation de l'activité des MMPs. En effet, la régulation de l'endocytose de ces protéases via LRP (*LDL receptor Related Protein*) peut constituer une manière très efficace de contrôle de l'activité des MMPs dans l'environnement péri-cellulaire. Les mécanismes d'endocytose de ces protéases par l'intermédiaire de récepteurs membranaire tel que LRP seront détaillés ultérieurement (cf. *chapitre VI*)

### **III-4 Rôle des MMPs dans la progression tumorale**

Le renouvellement de la MEC est le résultat d'un phénomène dynamique dont le bon déroulement repose sur l'équilibre de trois événements principaux : la dégradation de ses constituants par des protéases spécifiques, dont les MMPs, la modulation de l'activité de ces enzymes par des inhibiteurs et la néosynthèse des protéines matricielles.

Dans certains cas, cet équilibre est rompu : l'expression et la sécrétion des MMPs deviennent largement excédentaires par rapport aux TIMPs. Ceci est particulièrement observé dans le cadre de la pathologie tumorale, favorisant ainsi le développement de la tumeur primaire et la formation de métastases.

Mais les MMPs ne sont pas uniquement associées à la dégradation des composants matriciels survenant dans l'invasion tumorale. En effet, il a été clairement établi que la génération de "matrikines" par les MMPs permettait de réguler via les intégrines de surface, les voies de signalisation intracellulaire, affectant ainsi la différenciation et la croissance des cellules concernées [Streuli, 1999]. Ces enzymes peuvent également cliver directement certains récepteurs de facteurs de croissance [Egeblad et Werb, 2002]. Les molécules impliquées dans l'adhérence cellulaire constituent aussi des substrats pour les MMPs. Ainsi, les clivages de la cadhérine E et de l'intégrine CD 44, respectivement par les MMPs-3, -7 et MT1-MMP augmentent le potentiel invasif de cellules cancéreuses [Noe et coll., 2001 ; Kajita et coll., 2001]. Les MMPs peuvent réaliser elles-mêmes l'activation d'autres protéases dans le cadre de cascades protéolytiques. Ainsi, la MMP-2 active les pro-MMPs-9 et -13 [Fridman et coll., 1995], alors que la MMP-3 active les pro-MMPs-1, -7, -8, -9 et -13. Les MMPs-1 et -7 sont, elles, capables d'activer la pro-MMP-9. La MT1-MMP, dont nous avons précédemment détaillé le rôle prépondérant dans l'activation de la pro-MMP-2 (cf. paragraphe III-3-2-2) est également capable d'activer la MMP-13 [Knauper et coll., 2002].

Les MMPs se trouvent ainsi impliquées dans les différentes étapes de la progression tumorale, telles que la perte d'adhérence, l'invasion, la prolifération et l'angiogenèse [Chang et Werb, 2001 ; Chantrain et DeClerck, 2002 ; Egeblad et Werb, 2002]. Peu d'études associent l'expression et l'activation de ces enzymes à un bon pronostic.

## **IV LE SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE**

Ce que nous dénommons le système plasminogène/plasmine regroupe un ensemble de molécules (substrats, enzymes, récepteurs et inhibiteurs enzymatiques naturels) impliquées principalement dans les processus de fibrinolyse et d'invasion tumorale régulant la protéolyse localisée, l'adhérence et la migration cellulaire [Andreasen et coll., 2000].

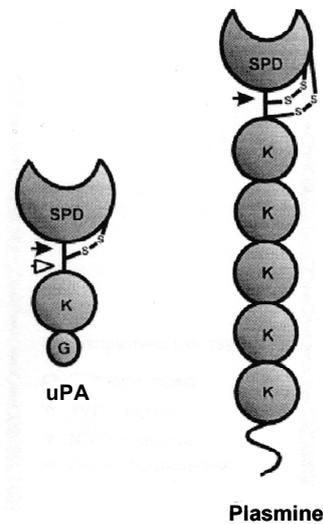
### **IV-1 Plasminogène/plasmine**

Le plasminogène natif (ou 'Glu-plasminogène', de son acide glutamique N-terminal) est une glycoprotéine de 92 kDa, composée d'une seule chaîne polypeptidique,

principalement synthétisée par les hépatocytes et que l'on trouve dans le plasma et les fluides interstitiels, à la concentration d'environ  $2\mu\text{M}$ . C'est le zymogène inactif de la plasmine, une protéase à sérine, et contient 790 acides aminés, 24 ponts disulfure intra-chaînes et 5 domaines "kringle" [Collen et Lijnen, 1984] (figure 13). Ces 5 structures en triple boucles sont homologues aux domaines "kringle" des activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) et tissulaire (tPA), de l'apolipoprotéine A, de l'*hepatocyte growth factor* (HGF), des défensines et d'autres protéines [Bork et coll., 1996]. Le plasminogène contient un seul site de liaison à lysine de haute affinité ( $K_d = 9\mu\text{M}$ ) qui permet son interaction avec la fibrine et l'inhibiteur plasmatique  $\alpha_2$ -antiplasmine. Le Glu-plasminogène natif de 92 kDa est susceptible d'être converti en 'Lys-plasminogène' de 84 kDa par hydrolyse limitée à la plasmine entre les résidus Lys76-Lys77 ou Lys77-Val78, du côté N-terminal du domaine K1. Ce changement de conformation donne au plasminogène une plus grande affinité pour la fibrine et potentialise une conversion en plasmine plus rapide. De plus, l'élastase neutrophile peut cliver le plasminogène natif entre les résidus Val441-Val442, situés entre les domaines K4 et K5, et ainsi donner naissance à une forme tronquée, mais fonctionnelle de la pro-enzyme de 38 kDa, appelé 'Val-plasminogène' ou 'mini-plasminogène' [Castellino et Powell, 1981]. Comme le Lys-plasminogène, le Val-plasminogène est plus facilement activable que le Glu-plasminogène. De plus, la Val-plasmine active est relativement résistante à l'inhibition de  $\alpha_2$ -antiplasmine, du fait de l'absence des domaines K1 à K4, mais est toujours capable de lier la fibrine [Moroz, 1981]. Son rôle physiologique n'est cependant pas clairement établi.

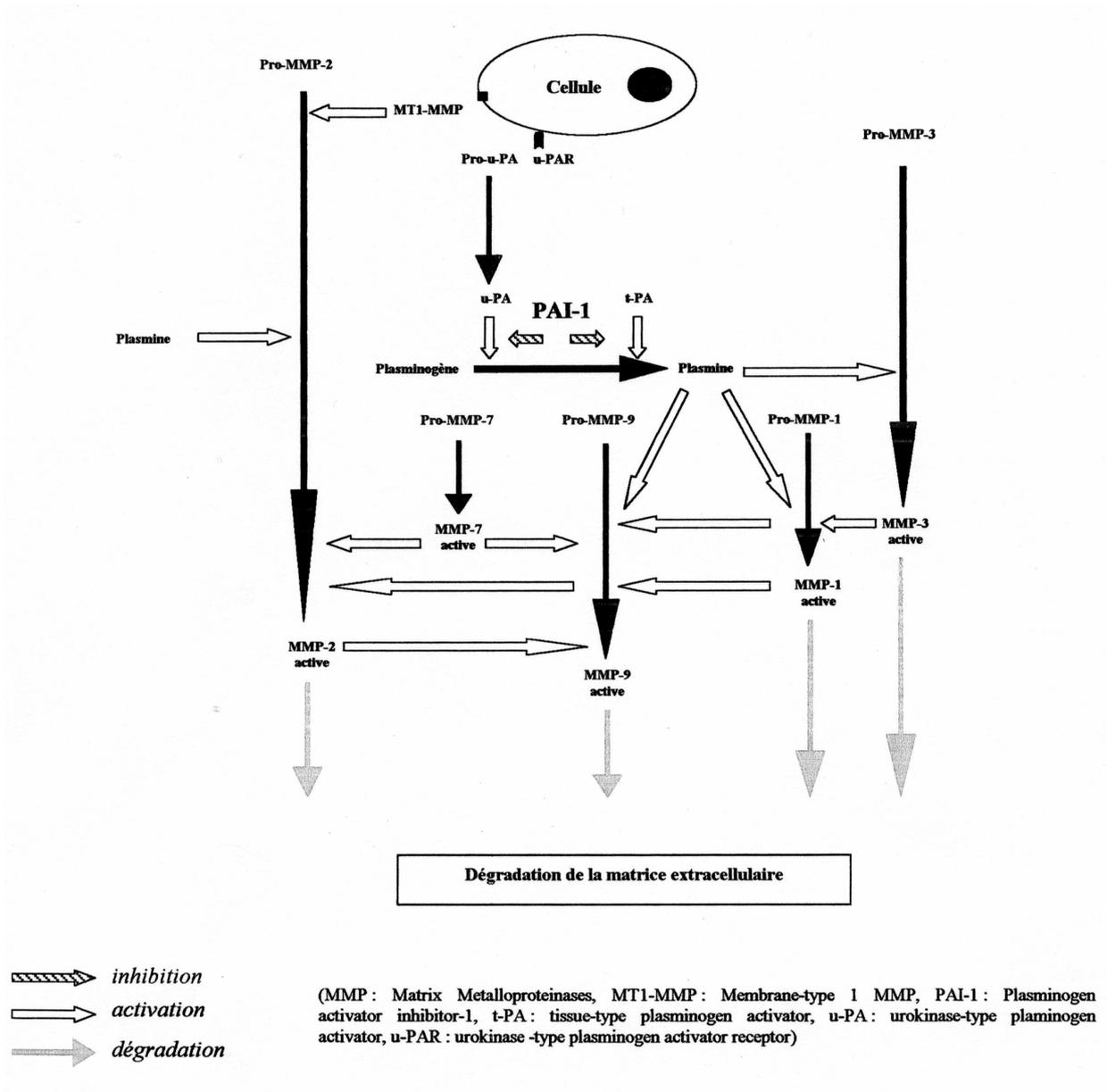
La conversion du plasminogène en plasmine peut être catalysée par plusieurs activateurs physiologiques et pathologiques. Ceci inclut les protéases à sérine telles que uPA, tPA, kallikrein et les facteurs IXa et XIIa, ainsi que des activateurs non enzymatiques, telles que la streptokinase et la staphylokinase. Les activateurs non enzymatiques forment un complexe équimolaire avec le plasminogène qui pourra activer d'autres molécules de plasminogène, alors que les activateurs enzymatiques clivent directement le plasminogène. Dans les deux cas, le plasminogène est converti en plasmine par une hydrolyse spécifique entre les résidus Arg560 et Val561 (figure 13). Ceci conduit à une molécule à deux chaînes polypeptidiques (la plasmine) composé d'une chaîne lourde en N-terminal (A) et d'une chaîne légère en C-terminal (B). Les deux chaînes sont reliées entre elles par deux ponts disulfure. La chaîne A contient les 5 domaines kringle et a une masse moléculaire de 12 à 65 kDa, selon le type de plasminogène dont il dérive. La chaîne B de 25 kDa contient le site catalytique, qui se résume aux 3 résidus His602/Asp645/Ser740.

Le plasminogène est capable de lier divers substrats via ses domaines kringle et ces liaisons peuvent être rompues par des analogues de lysine comme l'acide  $\epsilon$ -aminocaproïque (EACA).



**Figure 13 :** les domaines structuraux de pro-uPA et du plasminogène. SPD, domaine de protéinase à sérine ou domaine catalytique ; K, domaine kringle ; G, domaine d'homologie aux facteurs de croissance. Les flèches pleines indiquent la position des sites de clivage pour la conversion de la forme zymogène à la forme active de l'uPA et de la plasmine. La flèche blanche indique la position du site de clivage pour la conversion de la forme HMW-uPA à la forme LMW-uPA. (d'après Andreasen et coll., 1997)

Les défensines neutrophiles I et II de 4 kDa présentent une structure similaire aux domaines kringle du plasminogène et peuvent ainsi inhiber la fibrinolyse dépendante du plasminogène et médiée par le tPA, par compétition avec la plasmine pour la liaison à la fibrine [Higazi et coll., 1995]. D'autres protéines peuvent également lier le plasminogène, telles que la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine 1, la laminine ou encore des protéoglycannes [Salonen et coll., 1985 ; Preissner, 1990 ; Silverstein et coll., 1984 ; Salonen et coll., 1984]. De plus, théoriquement, toutes les cellules sont capables de lier le plasminogène grâce à leurs abondants récepteurs de surface de faible affinité, qui reconnaissent les domaines kringle [Redlitz et Plow, 1995]. Le plasminogène lié aux cellules est plus facilement activable que le plasminogène libre et une fois activé, il est protégé des inhibiteurs plasmatiques de protéases [Stephens et coll., 1989]. De même, le plasminogène lié à la MEC est beaucoup plus facilement activable par l'uPA et le tPA et est moins facilement inhibé par l' $\alpha_2$ -antiplasmine que le plasminogène non lié [Knudsen et coll., 1986].



**Figure 14 :** les cascades protéolytiques (d'après Parsons et coll., 1997)

La plasmine appartient donc à la classe des protéinases à sérine et possède une spécificité de substrat identique à la trypsine. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques entre des résidus lysine et arginine. Outre son rôle connu dans la fibrinolyse et dans la fibrigénolyse, la plasmine est également capable de cliver un grand nombre de molécules, notamment des composants de la MEC (fibronectine, thrombospondine, laminine...). Via l'activation de certaines MMPs, elle contribue à la dégradation des collagènes, de l'élastine et des

protéoglycannes. En effet la plasmine peut activer directement la pro-MMP-1, la pro-MMP-3, la pro-MMP-9 ainsi que les pro-MMPs-10 et -13 [Eeckhout et Vaes, 1977 ; He et coll., 1989 ; Suzuki et coll., 1990 ; Okada et coll., 1992]. Elle est également impliquée dans l'activation de la pro-MMP-2 sécrétée par les cellules en culture [Mazzieri et coll., 1997] et il a été démontré qu'elle est aussi capable d'activer l'activateur physiologique de la MMP-2 : la MT1-MMP, de manière extracellulaire [Okumura et coll., 1997]. On parle alors de cascades protéolytiques (figure 14). Ainsi, les deux systèmes protéolytiques coopèrent étroitement dans les remodelages de la MEC.

La plasmine peut être inhibée par des inhibiteurs standards de protéinases à sérine et par les inhibiteurs endogènes que sont l' $\alpha_2$ -antiplasmine,  $\alpha_2$ -macroglobuline,  $\alpha_1$ -antitrypsine et la protéase nexine-2 [Kwaan, 1992 ; Van Nostrand et coll., 1990]. L'inhibiteur physiologique le plus important de la plasmine est l' $\alpha_2$ -antiplasmine, une protéine Arg-serpin de 70 kDa, qui a une concentration plasmatique d'environ 1 $\mu$ M.

## **IV-2 L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et son récepteur (uPAR)**

L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) est une protéase à sérine qui possède une grande spécificité envers le plasminogène, dont il peut cliver la forme simple chaîne pour former la plasmine active. On le trouve dans le plasma à une concentration d'environ 3,5ng/ml et dans l'urine à plus de 200ng/ml [Rijken, 1995]. Il est sécrété sous la forme pro-uPA, avec une seule chaîne peptidique (sc-uPA) et est activé soit par protéolyse à la plasmine en tc-uPA, avec 2 chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure, soit par association avec son récepteur de surface cellulaire uPAR [Higazi et coll., 1996]. Des études indiquent que le complexe sc-uPA/uPAR a une meilleure affinité pour le plasminogène et est moins sensible à l'inhibition par l'inhibiteur physiologique des activateurs de plasminogène de type I (PAI-1) que la forme tc-uPA [Higazi et coll., 1996]. De plus, le sc-uPA lié à son récepteur est moins facilement clivé par la plasmine que le sc-uPA libre. Ainsi, la liaison de sc-uPA à uPAR stimule son activité et le prévient de son inhibition et de sa conversion en tc-uPA (une étape qui peut précéder son inactivation et son endocytose).

La forme pro-uPA (sc-uPA) humaine a une masse moléculaire de 54 kDa et contient 411 acides aminés. Le clivage de la pro-uPA par la plasmine ou la kallikréine, ou encore par la trypsine ou la cathepsine B, s'effectue entre les résidus Lys158 et Ile159 et conduit à la forme tc-uPA de 54 kDa appelée HMW tc-uPA "High Molecular Weight". La chaîne A N-terminale résultant de ce clivage contient un domaine d'homologie aux facteurs de croissance. Ce domaine est responsable de la liaison d'uPA à uPAR (figure 15). Il est suivi par un seul domaine kringle sans site de liaison lysine/fibrine (figure 13). La chaîne B, en position C-terminale, contient la triade catalytique (His204/Asp255/Ser356) et reste attachée à la chaîne A par un seul pont disulfure entre Cys148 et Cys279. Néanmoins aucune portion de la chaîne A n'est requise pour l'activité catalytique complète. En effet, la forme HMW tc-uPA peut être à nouveau clivée par la plasmine entre ses résidus Lys134 et Lys135, qui sera alors délestée de ses domaines kringle et d'homologie aux facteurs de croissance pour former l'uPA de 33 kDa appelée LMW tc-uPA "Low Molecular Weight". *Nous parlerons désormais de pro-uPA pour désigner sc-uPA, et de uPA pour désigner tc-uPA.* Cette forme active à bas poids moléculaire a une chaîne A fortement tronquée, mais garde sa capacité de convertir le plasminogène en plasmine. Par contre, elle ne peut plus se lier à uPAR. De plus, la matrilysine (MMP-7) peut cliver la liaison peptidique Glu143-Leu144 d'uPA, entraînant le largage d'un fragment amino-terminal de 143 résidus (ATF) qui se révèle mitogène pour certaines cellules [Marcotte et coll., 1992 ; Rabbani et coll., 1992 ; Menshikov et coll., 2006; Mazzieri et coll., 2006 ; Gandhari et coll., 2006]. L'activité mitogène est liée à la fucosylation du résidu Thr18 dans le domaine d'homologie aux facteurs de croissance d'uPA. Un unique site de N-glycosylation se trouve dans l'uPA humaine sur Asn302, toutefois la pro-uPA non glycosylée est plus facilement activable par la plasmine et l'uPA non-glycosylé est plus active pour le clivage du plasminogène.

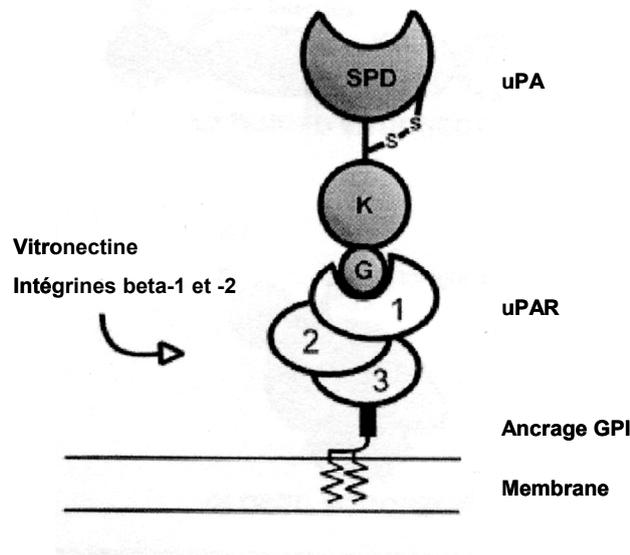
L'uPA est localisé à la surface cellulaire, car son domaine d'homologie aux facteurs de croissance le dirige vers la membrane plasmique des cellules exprimant le récepteur uPAR. La pro-uPA possède une légère activité enzymatique, qui est environ 250 fois inférieure à celle de l'uPA active. Celui-ci peut activer indirectement divers MMPs latentes, à travers le plasminogène. L'uPA est toutefois incapable de cliver directement la laminine, la fibronectine ou les collagènes [Liotta et coll., 1981]. Mais il est, en revanche, capable d'activer le HGF (Hepatic Growth Factor) en clivant une unique liaison peptidique dans le HGF inactif [Andreasen et coll., 1997]. uPA peut aussi cliver uPAR entre les domaines I et II, libérant ainsi un fragment composé des domaines II et III, qui possède une activité chimiotactique [Hoyer-Hansen et coll., 1992 ; Blasi et Carmeliet, 2002]. Etant donné que l'uPA convertie le

plasminogène en plasmine active, qui en retour convertie la pro-uPA en uPA active, ces enzymes participent donc à une cascade d'activation en rétrocontrôle positif. La boucle d'activation est de plus potentialisée par la présence du récepteur uPAR à la surface cellulaire (et non soluble). En effet, cette boucle n'est pas amplifiée dans les cellules dont le gène codant pour uPAR est éteints [Behrendt et coll., 1995]. De même, la boucle d'activation est abolie par des traitements avec des anticorps neutralisants anti-uPAR ou avec des analogues de lysine, qui inhibent la liaison du plasminogène aux cellules. Ainsi, des récepteurs à l'uPA et au plasminogène sont donc requis et ceux-ci pourraient induire des changements de conformation de leurs ligands et/ou apporter des effets d'orientation et de concentration qui favoriseraient l'activation du plasminogène. D'autres études indiquent que la quantité de plasminogène lié, et donc accessible, est le point limitant pour l'activation du plasminogène dépendant de l'uPA à la surface cellulaire, qui est à son tour le point limitant pour l'invasion des cellules dans la MEC [Namiranian et coll., 1995].

L'uPA est exprimé par un grand nombre de types cellulaires et sa surexpression est souvent corrélée à la tumorigenèse [Andreasen et coll., 1997 et 2000]. De nombreuses évidences, obtenues à partir de tests de migration *in vitro* supportent l'idée que le système plasminogène/plasmine régule la migration cellulaire. Mais les effets d'uPA sur la migration cellulaire peuvent être causés aussi bien par des mécanismes protéolytiques que non-protéolytiques [Chazaud et coll., 2000]. L'effet pro-migratoire de l'uPA peut impliquer la génération de plasmine au niveau des contacts focaux, catalysée par la liaison d'uPA à son récepteur uPAR, ce qui conduit à la dégradation de la MEC et cela facilitera le détachement du front arrière des cellules. Mais dans un mécanisme non-protéolytique, uPA peut également stimuler la migration cellulaire en favorisant l'adhésion du front de migration de la cellule, à travers la stimulation de la liaison de uPAR à la vitronectine, la modulation des interactions uPAR/intégrines et/ou par l'initiation de cascades de transduction du signal. En effet, la migration induite par uPA est associée à une activation rapide et transitoire de la phosphorylation sur sérine et tyrosine [Busso et coll., 1994], des activations de kinases Src [Bohuslav et coll., 1995], de FAK, de MAPK et de JAK [Tang H et coll., 1998 ; Dumler et coll., 1999]. Ces deux mécanismes d'action peuvent s'opérer simultanément dans la cellule en migration.

Le récepteur de l'uPA (uPAR ou CD87) est une glycoprotéine de 55-60 kDa, selon le degré de glycosylation, comprenant 3 domaines homologues d'environ 90 acides aminés

chacun. Il est ancré à la membrane plasmique via un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI).



**Figure 15 :** Structure d'uPAR lié à une molécule d'uPA. (d'après Andreassen et coll., 1997)

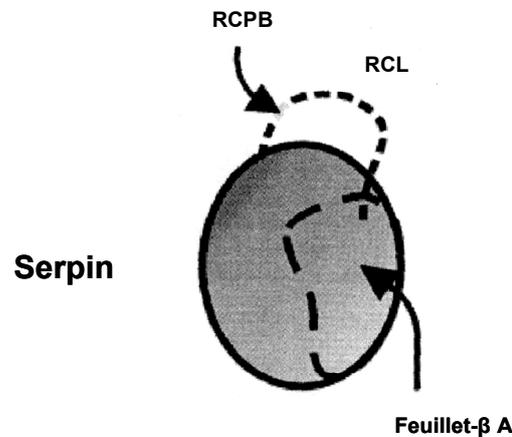
Il est présent dans de nombreux types cellulaires et lie la pro-uPA et le HMW-uPA avec une haute affinité ( $K_d = 0,1-1$  nM). Le clivage de l'ancrage GPI par une phospholipase C libère l'uPAR sous une forme soluble (suPAR). uPAR possède 5 sites de glycosylation potentiels et est très glycosylé de manière hétérogène. En effet, sa masse moléculaire diminue de 35 kDa après déglycosylation.

Différentes études suggèrent que uPAR joue un rôle dans la transduction du signal, le chémotaxisme et l'adhésion par des voies indépendantes de l'activité protéolytique de l'uPA (Andreassen et coll., 1997 ; Behrendt et coll., 1995). Par exemple, l'uPA actif et inactif peut induire l'expression de c-fos dans certaines cellules et cet effet peut être bloqué par l'uPAR soluble (Dumler et coll., 1994). De plus, uPA ou son ATF non catalytique sont tout deux capables d'induire la migration de cellules épidermiques et la formation de diacylglycérol, et ces effets sont augmentés lors de la surexpression d'uPAR (Del Rosso et coll., 1993). L'effet pro-migratoire d'uPA peut aussi être inhibé par compétition en utilisant de l'uPA recombinant contenant un domaine d'homologie aux facteurs de croissance muté (Stepanova et coll., 1997). Par ailleurs, la liaison d'uPA ou de son ATF à uPAR entraîne une rapide

phosphorylation et activation de ERK1 et ERK2, signal requis pour la stimulation de la migration de cellules de cancer du sein par uPA (Nguyen et coll., 1998). Toutefois, du fait de l'absence de domaine intracellulaire dans sa structure, uPAR est incapable de transmettre directement le signal à l'intérieur de la cellule. Il doit donc interagir avec d'autres protéines cellulaires. Ainsi, plusieurs études ont identifiées des protéines adaptatrices candidates, qui pourraient faciliter la transmission des stimuli externes par leurs domaines transmembranaires et cytosoliques. Parmi ces protéines capables d'interagir avec uPAR, on trouve les intégrines [Chapman et Wei, 2001 ; Ossowski et Aguirre-Ghiso, 2000], des tyrosine kinases [Konakova et coll., 1998], la caveoline [Stahl et Mueller, 1995 ; Wei et coll., 1999] ou encore le récepteur-1 de l'EGF (EGFR-1) [Tsatas et Kaye, 2003]. Ces protéines peuvent faire le lien entre uPAR et le cytosquelette, ainsi que la machinerie de transduction du signal intracellulaire.

### **IV-3 L'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type I (PAI-1)**

PAI-1 est l'un des principaux inhibiteurs physiologiques (avec PAI-2) des activateurs du plasminogène uPA et tPA. Cet inhibiteur appartient à la superfamille des SERPINs (SERine Proteinase INhibitor), dont l'une des caractéristiques de ses membres est la liaison peptidique Arg346-Met347 qui constitue le site actif ou centre réactif (*RCPB : Reactive Center Peptide Bond*) [Pannekoek et coll., 1986 ; Silverman et coll., 2001]. Ainsi, PAI-1 est maintenant également appelé serpin E1. C'est une glycoprotéine de 379 acides aminés et d'une masse moléculaire prédictive et apparente de respectivement 42 et 52 kDa [Rijken, 1995]. Il ne contient pas de résidus cystéine, et par conséquent pas de pont disulfure dans sa structure, ce qui pourrait être une cause de son instabilité en solution. Le centre réactif de l'inhibiteur est situé dans une région en forme de boucle, du côté C-terminal de la molécule, appelée *Reactive Center Loop (RCL)* et sert de pseudo-substrat aux protéinases à sérine cible (figure 16). Au lieu de cliver cette liaison peptidique, les protéinases vont être piégées en une forme inactive dans un complexe stoechiométrique stable. La formation de ce complexe implique l'interaction entre le RCL et le grand feuillet- $\beta$  A central de la serpin [Potempa et coll., 1994 ; Stein et Carrell, 1995].



**Figure 16 : Structure d'une serpin.** *RCL, Reactive Center Loop ; RCPB, Reactive center Peptide Bond. (D'après Andreasen et coll., 1997)*

PAI-1 présente plusieurs conformations [Nar et coll., 2000]. Au delà des formes active et inactive, un état latent a également été identifié. La forme active se convertit spontanément en forme latente avec une demi-vie d'environ 1h [Hekman et Loskutoff, 1988]. Dans ce cas, le site réactif reste intact, mais est entièrement inséré dans le feuillet-β A. Ainsi, le RCL en entier est dissimulé et devient inaccessible aux enzymes cibles, ainsi qu'aux enzymes d'inhibition. Ceci rend la forme latente beaucoup plus stable que la forme active. L'activité inhibitrice de PAI-1 latent peut être restaurée *in vitro* par dénaturation et une réactivation limitée peut s'opérer *in vivo* sur une membrane de phospholipides chargée négativement. PAI-1 est la seule SERPIN capable de passer, de manière réversible, d'un état actif à un état latent [Binder et coll., 2002]. Enfin, en plus de la forme latente, il existe une seconde forme inactive, qui résulte de l'oxydation d'un ou plusieurs résidus de méthionine critiques dans PAI-1 actif [Lawrence et Loskutoff, 1986]. L'analyse de PAI-1 oxydé indique que l'inactivation est corrélée avec un rapide changement conformationnel, aboutissant à une structure distincte des formes active et latente. L'inactivation oxydative de PAI-1 pourrait être un mécanisme important dans la régulation du système plasminogène/plasmine. Les radicaux oxygènes produits localement par les neutrophiles ou par d'autres cellules pourraient inactiver

PAI-1 et ainsi permettre la génération d'activité plasmine aux sites d'infection ou dans les régions de remodelage tissulaire.

L'activité de PAI-1 est finement régulée au niveau transcriptionnel. Le régulateur majeur de l'expression et également de l'activité locale de PAI-1 est le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ). L'activité de TGF- $\beta$  est d'autre part elle-même régulée par PAI-1, car uPA est capable d'activer le TGF- $\beta$  latent.

En conditions physiologiques, PAI-1 est sécrété dans la circulation et dans les espaces extracellulaires par seulement quelques types cellulaires : les hépatocytes, les cellules de muscle lisse, les adipocytes et les plaquettes sont les sources principales de PAI-1. Il en résulte une concentration plasmatique assez faible, d'environ 20ng/ml, suffisante pour contrôler la fibrinolyse et la protéolyse extracellulaire. En conditions pathologiques, toutefois, plusieurs autres tissus sécrètent de grandes quantités de PAI-1, comme par exemple les cellules tumorales, les cellules endothéliales en réponse aux cytokines inflammatoires et d'autres cellules activées par l'inflammation.

Depuis quelques années, il est devenu évident que PAI-1 pouvait influencer le comportement des cellules à travers des activités indépendantes de ses effets inhibiteurs sur uPA et tPA et sur la génération de plasmine. En particulier, PAI-1 module l'adhésion et la migration cellulaire, et apparaît jouer un rôle important dans l'inflammation, l'angiogénèse et la formation de métastases. Ces activités impliquent des interactions complexes entre PAI-1, vitronectine, uPAR et certains récepteurs d'intégrines, avec des résultats observés différents, selon le type cellulaire et la composition de leur microenvironnement immédiat [Blasi, 1997 ; Loskutoff et coll., 1999 ; Stefansson et Lawrence, 1996]. Une découverte clé qui semble être à la base de ces effets est le fait que PAI-1 et uPAR sont en compétition pour un domaine de liaison commun situé dans l'extrémité N-terminale de la vitronectine, proche de la séquence RGD, qui lie les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  [Loskutoff et coll., 1999]. Lorsque la vitronectine lie PAI-1 (ce qu'il fait avec une plus grande affinité que uPAR), cela prévient non seulement l'adhésion cellulaire entre uPAR et la MEC riche en vitronectine, mais inhibe également l'adhésion médiée par les interactions entre les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et la vitronectine, par encombrement stérique. Enfin, in vitro, la présence de PAI-1 inhibe la migration et l'adhésion cellulaire dépendant de la vitronectine.

Toutefois, ces interactions peuvent avoir d'autres conséquences. La vitronectine peut jouer le rôle de navette pour transférer PAI-1 sur uPA lié à uPAR [Wei Y, Waltz DA et coll., 1994]. Une fois transféré, PAI-1 subit des changements conformationnels qui détruisent son

affinité pour la vitronectine et favorise sa dégradation après endocytose, via un processus qui implique des interactions entre le complexe uPAR-uPA-PAI-1 et LRP (cf. chapitre VI-3) [Herz et Strickland, 2001].

Sur la base de ces interactions, il semble paradoxal que dans beaucoup de situations *in vivo*, PAI-1 facilite plus qu'elle n'inhibe la migration cellulaire. C'est particulièrement le cas dans la biologie des cellules cancéreuses, pour lesquelles une forte concentration de PAI-1 prédit un phénotype métastatique plus agressif [Andreasen et coll., 1997]. Des études récentes chez des souris dont le gène PAI-1 est éteint, confirment cette association : beaucoup plus de métastases sont observées chez les souris sauvages par rapport aux souris déficientes en PAI-1 [Bajou et coll., 1998]. Le mécanisme impliqué dans cette régulation ferait intervenir des interactions PAI-1/protéases et non PAI-1/vitronectine [Bajou et coll., 2001]. Cependant, les bases moléculaires des effets pro-migratoires de PAI-1 ne sont toujours pas entièrement connues et il semblerait que les effets pro ou anti-migratoire seraient dépendants de la concentration en PAI-1 [McMahon et coll., 2001].

## **V LA THROMBOSPONDINE-1**

La thrombospondine-1 (TSP-1) fait partie d'une petite famille constituée de cinq membres : TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 et TSP-5/COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein). Ce sont des glycoprotéines de la MEC qui ont une structure modulaire très caractéristique. Cette structure a permis de classer ces molécules en deux groupes : le sous-groupe A comprenant TSP-1 et TSP-2 qui ont de longues chaînes associées en trimère et qui sont présentes dans une grande majorité de tissus ; le sous-groupe B, comprenant TSP-3, TSP-4 et TSP-5/COMP. Ces trois dernières ont des chaînes plus courtes et ne possèdent pas tous les domaines présents dans TSP-1 et TSP-2. De plus, elles s'associent en pentamère et ont des distributions plus spécifiques de certains tissus.

La TSP-1 a été la première découverte comme une protéine libérée des granules  $\alpha$  des plaquettes [Lawler et coll., 1978]. Depuis, sa sécrétion a été observée dans un grand nombre de cellules [Clezardin, 1993]. Le premier rôle qui lui a été reconnu était sa participation à l'agrégation des plaquettes, mais ensuite, des fonctions beaucoup plus larges lui ont été assignées telles que sa participation dans des processus fondamentaux de prolifération, d'adhérence et de migration cellulaires, d'embryogenèse ou d'angiogenèse.

La comparaison de séquences des thrombospondines révèle que les sites de liaison au calcium et quelques sites d'interaction protéine-protéine ont été très conservés durant l'évolution des vertébrés. Ceci suggère qu'une fonction commune aux thrombospondines serait de conduire la formation d'assemblages moléculaires à la surface cellulaire, modulant ainsi l'activité des protéinases et des facteurs de croissance, afin d'évoquer des réponses cellulaires spécifiques.

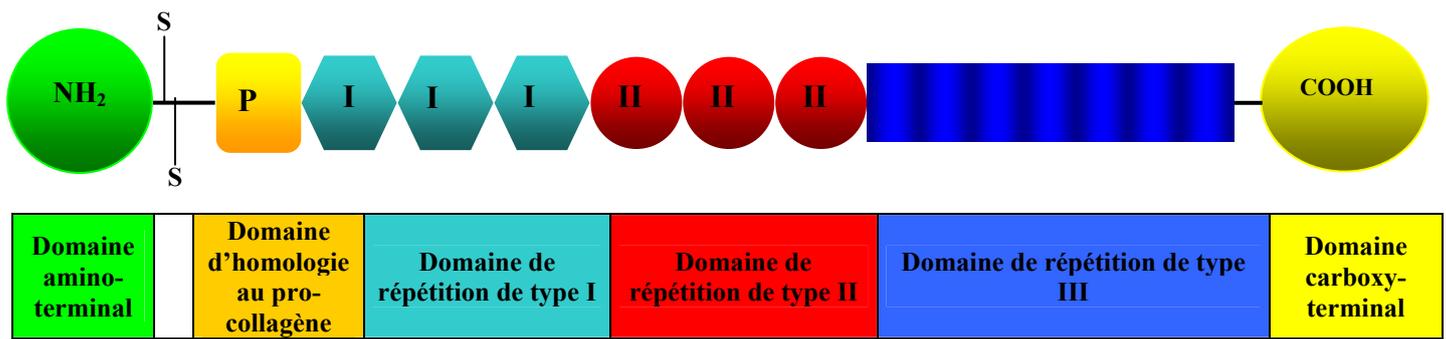
## **V-1 Organisation structurale de TSP-1**

La TSP-1 en conformation native est un homotrimère dont les chaînes sont reliées par des ponts disulfure. La chaîne mature de la TSP-1 contient 1152 résidus d'acides aminés. En conditions électrophorétiques dénaturantes et réductrices, la TSP-1 migre sous forme d'une bande dont la masse moléculaire varie de 145 à 185 kDa. En absence d'agent réducteur, sa masse moléculaire est estimée à 450 kDa.

Chaque sous-unité présente des domaines N-terminal et C-terminal globulaires connectés par une longue région linéaire. Celle-ci est organisée en modules qui définissent des domaines conférant à la macromolécule matricielle des fonctions précises lorsque ces derniers interagissent avec des récepteurs de surface cellulaire de type intégrine ou non, d'autres constituants matriciels, des cytokines ou des facteurs de croissance (figure 17).

### **V-1-1 La région amino-terminale**

Le domaine globulaire amino-terminal contient un site de liaison à l'héparine. L'affinité entre TSP-1 et l'héparine représente un outil très utilisé pour la purification de TSP-1 à partir des plaquettes [Lawler et coll., 1978]. Cette région de 25 kDa est également responsable de la capacité de TSP-1 à se lier aux protéoglycannes à héparane sulfate (HSPG) matricielles ou de surface et aux glycolipides sulfatés. La région amino-terminale est capable d'induire le désassemblage des contacts focaux de cellules endothéliales [Murphy-Ullrich et Hook, 1989]. Elle permet aussi la liaison de TSP-1 au récepteur d'endocytose LRP [Mikhailenko et coll., 1997]. L'interaction avec les HSPG de surface facilite cette liaison TSP-1/LRP.



Domaine de TSP-1	Séquences	Récepteurs et ligands	Fonctions
<b>Domaine amino-terminal</b>	QNV	Intégrine $\alpha 3\beta 1$	Adhésion cellulaire Hemostase
	RKGSRR/KKTR	HSPG – LRP – gp330 Syndécanne glycolipides sulfatés	Endocytose
	MKKTRG	Décorine	Inhibition de l'adhésion cellulaire
	BBXB	Héparine	Adhésion cellulaire
	LDVP	Intégrine $\alpha 4\beta 1$ Intégrine $\alpha 5\beta 1$	Adhésion cellulaire Chimiotactisme
	25 kDa peptide	?	Stimulation de synthèse de MMPs Stimulation de l'angiogenèse
<b>Domaine d'oligomérisation</b>			Multimérisation
<b>Domaine d'homologie au pro-collagène</b>	NGVQYRN		Inhibition de l'angiogenèse Inhibition du chimiotactisme
<b>Domaine de répétition de type I</b>	RFK	LTGF $\beta$	Activation du TGF $\beta$ latent
	WSHWSPW	Protéine glycosaminoglycane	Activation du TGF $\beta$ latent
	GGWSHW	Fibronectine	Adhésion cellulaire
	CSVTCG	CD36 HIV gp 120 HSPG	Anti-angiogénique Adhésion cellulaire
<b>Domaine de répétition de type II</b>			
<b>Domaine de répétition de type III</b>	RGD	Intégrine $\alpha v\beta 3$ Intégrine $\alpha IIb\beta 3$	Adhésion cellulaire
	NCPFHYNP NCQYVYNV	Cathepsine G, élastase Elastase	Liaison du calcium
<b>Domaine carboxy-terminal</b>	RFYVVM	CD47	Chimiotactisme
	IRVVM		Prolifération cellulaire

**Figure 17 :** représentation schématique de la structure modulaire de TSP-1 et les fonctions associées. Le tableau indique les séquences peptidiques reconnues par différents récepteurs ou ligands, ainsi que les activités biologiques associées (d'après Sid et coll., 2004)

### V-1-2 les domaines de connexion et d'homologie au procollagène

Le domaine de connexion, localisé du côté amino-terminal, contient 21 acides aminés dont 2 résidus cystéine impliqués dans la formation de ponts disulfure inter-chaînes de la molécule [Sottile et coll., 1991]. Ce domaine est responsable de l'homotrimérisation.

Le domaine d'homologie au pro-collagène renferme 97 acides aminés dont 10 cystéines. Il présente 35% d'homologie avec la partie amino-terminale de la chaîne  $\alpha 1$  du pro-collagène de type I. Dans le pro-collagène I, les 10 résidus cystéine sont impliqués dans des ponts disulfure intra-chaînes, il en est probablement de même dans la molécule de TSP-1. Le rôle de ce domaine reste encore à élucider, mais il semble impliqué dans l'activité anti-angiogénique de TSP-1 [Tolsma et coll., 1993].

### V-1-3 Les domaines de répétition de type I (ou TSR)

Ce domaine est constitué d'un premier motif d'une soixantaine d'acides aminés répété 3 fois, et dont chacun contient 6 résidus cystéine. Cette région est responsable de la liaison de TSP-1 aux protéines de la MEC, telles que le collagène IV, la laminine ou la fibronectine [Lawler, 2000], mais peut aussi jouer un rôle important dans l'attachement cellulaire. Elle est également responsable de la liaison au plasminogène et au fibrinogène. La séquence CSVTCG est capable de lier les cellules hématopoïétiques via le récepteur CD36 [Asch et coll., 1992], ainsi que les cellules d'adénocarcinome pulmonaire [Tuszynski et coll., 1993]. WSXW, une autre séquence peptidique présente dans les répétitions de type I, peut interagir avec des cellules de mélanome [Guo et coll., 1992]. Parmi les motifs peptidiques actifs situés dans cette région, la séquence KRFK peut provoquer le largage de TGF- $\beta$  mature à partir de TGF- $\beta$  latent, par une activation intermoléculaire. L'interaction de cette séquence s'effectue avec la séquence LSKL du pro-peptide amino-terminal LAP du TGF- $\beta$  latent, ce qui conduit à la dissociation du complexe LAP/TGF- $\beta$  [Schultz-Cherry et coll., 1995 ; Ribeiro et coll., 1999]. Il est à noter que le motif WSHW est également capable de lier le complexe latent TGF- $\beta$ /LAP. La TSP-1 constitue, *in vivo*, un des principaux activateurs du TGF- $\beta$  latent [Crawford et coll., 1998].

### V-1-4 Le domaine de répétition de type II

Ce domaine est constitué de 3 répétitions de type II. Chacune de ces répétitions compte 60 acides aminés dont 6 cystéines, de façon identique aux répétitions de type I. Les répétitions de type II sont également appelées "EGF-like", puisqu'elles présentent une homologie de 24% avec l'EGF. Jusqu'à présent, aucun rôle précis ne leur a été attribué ni dans des interactions avec des récepteurs de surface, ni dans la régulation de la croissance cellulaire.

### V-1-5 Le domaine de répétition de type III

Plusieurs études ont montré que la conformation de TSP-1 dépend de la concentration en calcium. Ce sont les 7 répétitions de type III, riches en aspartate, qui sont responsables de la liaison au calcium. Chaque répétition est constituée de 23 acides aminés dont 2 cystéines, une à chaque extrémité. Les répétitions de type III possèdent des caractéristiques communes avec la structure "E/F hand" de la calmoduline, ainsi qu'avec des sites de fixation du calcium présents dans le fibrinogène et la parvalbumine [Lawler et Hynes, 1986]. Des mesures de "binding" ont montré que chaque molécule de TSP-1 lie en moyenne 35 ions calcium [Misenheimer et Mosher, 1995]. Enfin, la septième répétition de type III contient une séquence RGD capable de lier les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_{11b}\beta_3$  présentes à la surface de nombreux types cellulaires [Lawler et coll., 1988].

### V-1-6 Le domaine carboxy-terminal

La séquence du domaine globulaire carboxy-terminal de TSP-1 ne possède aucune homologie de séquence avec d'autres protéines connues, excepté les autres TSPs. Ce domaine, également appelé domaine de liaison aux cellules (CBD), est impliqué dans les interactions avec de nombreuses cellules, telles que les plaquettes, les monocytes, les mélanocytes ou les kératinocytes. Les séquences peptidiques responsables de ces interactions (IRVVM et RFYVVM) ont été identifiées par Kosfeld et coll. (1991). La séquence RFYVVM est conservée dans les 5 isoformes de TSP. La capacité du domaine carboxy-terminal de TSP-1 à interagir avec IAP (*Integrin Associated Protein* ou CD47) permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régissant la mobilité cellulaire [Gao et coll., 1996 ; Wang et Frazier, 1998].

## **V-2 Rôles de TSP-1 dans l'adhérence cellulaire et l'invasion tumorale**

TSP-1, comme les autres protéines matricellulaires, peut favoriser l'attachement, l'adhérence et la migration cellulaires. Divers travaux ont décrit des propriétés adhésives [Tuszynski et Kowalska, 1991] et anti-adhésives [Lahav, 1988] de TSP-1 sur les plaquettes. Les processus d'adhérence incluent la formation de fibres de stress et de contact focaux. Selon Murphy-Ullrich en 2001, un fort état adhésif caractérise des cellules différenciées et quiescentes, alors qu'une faible adhérence caractérise la cicatrisation ou le remodelage tissulaire dans les situations pathologiques. L'attachement des cellules implique la liaison des protéines matricellulaires aux intégrines. Ces interactions induisent un regroupement membranaire des intégrines et une modification de l'affinité des intégrines pour leurs ligands. Ainsi, la réorganisation du cytosquelette et la formation de plaques d'adhérence focales régulent l'adhérence et la migration cellulaire.

La caractérisation de TSP-1 comme étant une protéine d'adhérence est en accord avec des données reportées dans différents systèmes [Pellerin et coll., 1993 ; Varani et coll., 1988]. Ces caractéristiques ont été clairement établies dans différents cancers thyroïdiens [Patey et coll., 1999] ainsi que dans des lignées cellulaires [Varani et coll., 1989 ; Clezardin et coll., 1989 ; Incardona, 1993]. Son rôle de récepteur d'intégrines et d'héparane sulfate a été par exemple confirmé dans des carcinomes du sein [Chandrasekaran et coll., 1999].

TSP-1 possède justement des effets de régulation sur le cytosquelette d'actine. La propagation et la migration cellulaire sur substrat de TSP-1 sont clairement associées avec une organisation distincte du cytosquelette cortical, qui implique la formation de grands lamellipodes avec des prolongements riche en fascine [Adams, 1995 ; 1997]. Ce mécanisme de formation des prolongements de fascine induit par TSP-1 a été principalement étudié dans les cellules de muscles squelettiques.

La capacité de TSP-1 à interagir avec plusieurs récepteurs cellulaires joue bien évidemment un grand rôle dans ses propriétés adhésives et migratoires. Le récepteur CD47 ou IAP (Integrin-associated protein) se lie à la séquence adhésive VVM, dont deux sont présentes dans TSP-1 [Gao et coll., 1996]. La surexpression, dans des cellules de carcinome mammaire, de TSP-1 mutée au niveau du domaine C-terminal sans le second motif VVM favorise la croissance tumorale [Weinstat-Saslow et coll., 1994].

La TSP-1 possède également une séquence RGD de reconnaissance aux intégrines dans sa septième répétition de type III. Le peptide RGD peut inhiber l'adhésion à TSP-1 des cellules exprimant l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . TSP-1 interagit aussi avec d'autres intégrines, telle que  $\alpha_3\beta_1$  chez les neurones [DeFreitas et coll., 1995],  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$  chez les lymphocytes T activés [Yabkowitz et coll., 1993] et  $\alpha_{II}\beta_{B3}$  et  $\alpha_2\beta_1$  chez les plaquettes activées [Tuszynski et Kowalska, 1991]. L'intégrine  $\alpha_3\beta_1$ , en coopération avec des glyco-conjugués et l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$ , est responsable de l'adhésion des cellules de carcinomes mammaires MDA-MB-435 et MDA-MB-231 à la TSP-1. Cette intégrine  $\beta_1$  est maintenue dans un état inactif ou partiellement actif dans ces lignées cellulaires, mais peut être activé par des stimuli exogènes, tels que le sérum, l'insuline, l'IGF1 et la liaison à CD98. Il a été découvert que  $\alpha_3\beta_1$  est l'intégrine dominante pour médier l'activité adhésive des cellules de carcinome mammaire à TSP-1 [Chandrasekaran et coll., 1999].

CD36 est le premier récepteur non-intégrine décrit pour TSP-1 [Asch et coll., 1987]. Les sites de liaison responsables de l'interaction entre TSP-1 et CD36 ont été identifiés sur ces deux protéines. Ce sont les domaines CSVTCG dans les répétitions de type I qui se lient au CD36 [Asch et coll., 1992]. Toutefois, la constante de liaison est de l'ordre du micromolaire, ce qui indique une faible affinité. Plusieurs cellules tumorales montrent une relation entre l'expression de CD36, la liaison à TSP-1 et le phénotype malin [Silverstein et coll., 1992].

Ainsi, l'adhérence des cellules à TSP-1 résulte d'interactions coopératives entre les séquences RGD, VVM et CSVTCG avec les récepteurs cellulaires appropriés. Toutefois, la fonction adhésive de TSP-1 doit être considérée avec précaution. En effet, des données présentées par Murphy-Ullrich et Hook en 1989 indiquent que TSP-1 soluble, peut induire le désassemblage des plaques d'adhérence focales de cellulesensemencées sur fibronectine. Cette activité est attribuée aux séquences de liaison à l'héparine situées dans le domaine globulaire N-terminal et est médiée par la calreticuline et par la protéine kinase dépendante du cGMP [Greenwood et coll., 1998]. Ainsi, TSP-1 modère probablement la force d'adhérence de contact sans altérer l'attachement à la matrice. Cette réduction de contractilité cellulaire pourrait avoir un effet pro-migratoire [Greenwood et coll., 2000].

Les fonctions adhésive et anti-adhésive de TSP-1 semblent dépendre du micro environnement des cellules tumorales durant la dissémination métastatique et du degré de saturation des sites de liaison de ces cellules à TSP-1. De plus, une coopération entre les séquences de liaison à CD47 et les peptides de répétition de type I semble nécessaire pour

promouvoir la motilité des cellules de mélanome et la phosphorylation de FAK [Sipes et coll., 1999].

### **V-3 Rôles de TSP-1 dans l'activité protéasique matricielle.**

La fonction adhésive de TSP-1 est aussi fortement reliée à son implication dans la protéolyse péricellulaire associée à l'invasion tumorale. TSP-1 est capable de lier différentes protéases, telles que l'uPA [Silverstein et coll., 1990], la plasmine, la thrombine, la cathépsine G ou l'élastase neutrophile [Bornstein, 1995]. Ainsi, la compréhension des mécanismes de régulation de l'activité protéasique semble essentielle pour expliquer l'invasion et l'extravasation [Westermarck et Kahari, 1999]. TSP-1 inhibe les activités plasmine et urokinase [Hosokawa et coll., 1993], mais les complexes formés avec ces enzymes peuvent aussi être actifs. Ainsi, TSP-1 produite dans les cellules tumorales mammaires induit l'invasion tumorale en stimulant l'expression d'uPA et de son récepteur uPAR [Albo et coll., 1997 ; Albo et coll., 2000]. L'expression de la forme tronquée d'uPAR dans des cellules tumorales thyroïdiennes pourrait donc modifier les interactions entre uPA et TSP-1 et ainsi perturber l'adhérence [Ragno et coll., 1998].

En parallèle, Bein et Simons (2000) ont montré que TSP-1 pouvait interagir avec MMP2, suggérant une activité de régulation de la protéolyse. Ces observations ont précisé la localisation péricellulaire de MMP2. De plus, il a été également démontré la nature inhibitrice de l'interaction TSP-1 et MMP2 : en effet, il résulte de cette interaction, une diminution de l'activité gélatinolytique de MMP2. Le fait que le domaine de liaison de MMP2 se trouve dans la partie catalytique de la gélatinase apporte une explication à l'inhibition de son activité. Toutefois, une même molécule de TSP-1 représente une seule et même source d'activation et d'inhibition de MMP2 dans la mesure où le fragment de liaison à l'héparine de 25 kDa de TSP-1 stimule la synthèse et l'activation de MMP2 et inhibe l'expression de TIMP2, alors que le fragment C-terminal de 140 kDa agit en opposition [Taraboletti et coll., 2000].

La régulation de la synthèse et de la sécrétion des protéases et de leurs inhibiteurs est également une cible potentielle de l'activité de TSP-1 et de TGF $\beta$  [Farina et coll., 1998]. La co-expression de différents régulateurs de l'activité plasmine est nécessaire à l'adhérence cellulaire associée à l'expression d'uPAR et d'intégrines [Planus et coll., 1997]. Par exemple, TSP-1 et TGF $\beta$  favorisent la production de PAI-1 et stimulent l'attachement des cellules

tumorales de carcinome pulmonaire. Des hauts niveaux d'expression de PAI-1 constituent un fort indicateur de mauvais pronostics chez les patients atteints de cancer. En effet, PAI-1 a été montré comme favorisant l'invasion de cellules cancéreuses mammaires en prévenant la dégradation excessive de la matrice associée à l'activité protéolytique de la plasmine [Pappot et coll., 1995]. *In vitro*, TSP-1 et TGF $\beta$  stimulent l'expression de PAI-1 dans des cancers pancréatiques [Albo et coll., 1999]. Les auteurs font l'hypothèse que l'inhibition de l'activité plasmine et par conséquent de l'activation des MMPs, stoppe la dégradation excessive de la matrice. Ce phénomène prévient les interactions cellule-matrice essentielles à l'invasion tumorale. Différentes études suggèrent une régulation de l'expression de protéinases via l'activation induite par TSP-1 de TGF $\beta$  [Sheibani et Frazier, 1995 ; Schultz-Cherry et Murphy-Ullrich, 1993 ; Schultz-Cherry et coll., 1994].

Ces dernières données tendent à classer TSP-1 comme un promoteur tumoral. Toutefois, des résultats controversés ont été obtenus et les effets de TSP-1 semblent spécifiques du type de la tumeur et des modèles expérimentaux étudiés [Sid et coll., 2003]. Les fonctions contradictoires attribuées à TSP-1 soulignent la structure multimodulaire de cette protéine.

La capacité de TSP-1 à interagir avec MMP2 ou avec différentes composantes du système plasminogène/plasmine amène à la considérer comme un régulateur important de la protéolyse tumorale. Le contrôle de la migration et de l'invasion cellulaire nécessite donc un équilibre fin entre la synthèse et le catabolisme de TSP-1. Le mécanisme de son internalisation dans la progression tumorale constitue la matière à des investigations attrayantes. Les acteurs principaux de l'endocytose médiée par récepteur ont été récemment décrits comme appartenant à la superfamille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDL-R) [Strickland et coll., 2002]. Parmi la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité, le LDL-R related protein (LRP) apparaît interférer dans la régulation de la migration et invasion tumorale [Krieger et Herz , 1994].

## **VI LOW-DENSITY-LIPOPROTEIN RECEPTOR RELATED PROTEIN.**

La famille de gènes de récepteur aux lipoprotéines à faible densité est un groupe conservé au cours de l'évolution de récepteurs de surface cellulaire produits notamment par

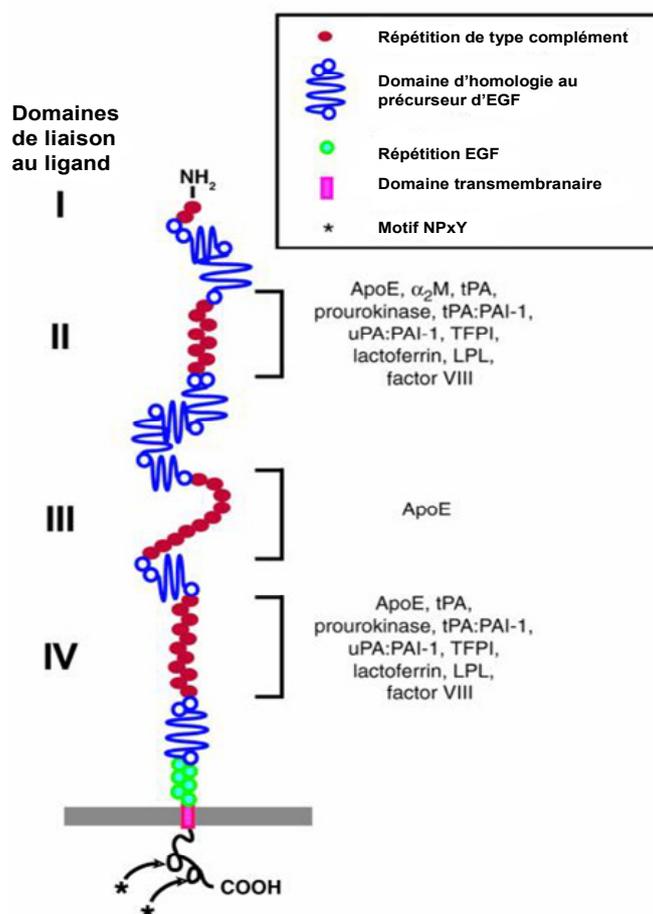
les mammifères, chez lesquels on dénombre, à ce jour, neuf membres. Initialement considérés comme étant juste des récepteurs d'endocytose, responsables de l'internalisation des lipoprotéines, de récentes études ont depuis montré que certains d'entre eux possédaient bien d'autres rôles à l'échelle des processus cellulaires. En effet, alors que le récepteur à LDL, le membre représentatif de cette famille, apparaît uniquement agir dans le métabolisme des lipoprotéines, LRP est responsable de l'endocytose de plusieurs familles de protéines incluant les lipoprotéines, les protéases matricielles et les protéines de la MEC comme les thrombospondines 1 et 2 [Godyna et coll., 1995 ; Mikhailenko et coll., 1995 ; Herz et Strickland, 2001].

## VI-1 Organisation structurale de LRP

LRP (ou LRP-1) est plus grand, mais est structurellement similaire aux autres membres de la famille des LDL-R. Il a été cloné pour la première fois en 1988 [Herz et coll., 1988] et a ensuite été identifié comme un récepteur de l' $\alpha_2$ -macroglobuline ( $\alpha_2$ -M) [Kristensen et coll., 1990 ; Strickland et coll., 1990]. Ce récepteur est produit à un taux élevé par les hépatocytes [Gliemann, 1998]. LRP est une protéine hétéro-dimérique constituée de deux sous-unités de 515 kDa et de 85 kDa. Il est synthétisé sous la forme d'un seul polypeptide de 4525 acides aminés puis est clivé par la furine au niveau de l'appareil de Golgi pour donner deux sous-unités de 3924 et 601 acides aminés [Herz et coll., 1990]. Ces deux sous-unités restent liées entre elles de manière non-covalente et possèdent deux fonctions indépendantes. La sous-unité de 85 kDa consiste en un domaine transmembranaire et cytoplasmique contenant deux copies de la séquence NPxY. Celle-ci sert de site d'ancrage pour la machinerie d'endocytose et pour les protéines adaptatrices et d'échafaudage cytoplasmiques impliquées dans les cascades de signalisation [Trommsdorff et coll., 1998]. La sous-unité de 515 kDa contient 31 répétitions de type Complément, riches en cystéine et similaires aux répétitions trouvées dans le domaine de liaison au ligand de LDL-R. Elles sont regroupées en quatre domaines de 2, 8, 10 et 11 répétitions avec lesquels la majorité des ligands connus de LRP va interagir [Neels et coll., 1999] (figure 18). Cette sous-unité contient également 21 répétitions d'homologie au précurseur d'EGF, riches en cystéine et en sites de O-glycosylation et constituées de deux répétitions EGF, six répétitions YWTD qui sont arrangées en structure *beta-propeller* [Springer, 1998] et d'autres répétitions EGF.

Une question majeure, qui reste sans réponse, est comment LRP peut reconnaître 30 ligands structurellement très différents avec une si grande affinité (tableau 5). Quatre approches ont été utilisées avec succès pour identifier les régions responsables de la liaison à ces nombreux ligands. La première a été de cliver du LRP purifié de manière enzymatique ou chimique et de transférer les différents fragments sur une membrane de nitrocellulose. Des expériences de *ligand blotting* sur ces fragments ont indiqué que le domaine de liaison II de LRP, contenant les acides aminés 776-1399, lie  $\alpha$ 2-M, le complexe uPA:PAI-1, et Receptor-Associated Protein (RAP) [Moestrup et coll., 1993]. Dans un deuxième temps, l'anticorps monoclonal A8 a été identifié comme inhibant la liaison de la lipase lipoprotéique, du complexe uPA:PAI-1, du pro-uPA et de la protéine RAP à LRP, mais n'ayant pas d'effet sur la liaison de la protéine  $\alpha$ 2-M et du complexe tPA:PAI-1 [Horn et coll., 1995]. Cela devrait préciser que la lipase lipoprotéique entre partiellement en compétition avec la liaison de  $\alpha$ 2-M avec LRP [Nykjaer et coll., 1993]. Ainsi, l'anticorps pourrait distinguer les sites de liaison de deux ligands en compétition. A8 lie la séquence d'acides aminés 776-1399, ce qui indique que cette région pourrait être impliquée dans la liaison des quatre ligands. Troisièmement, les domaines de liaison au ligand II ou IV ont été indépendamment fusionnés avec les domaines transmembranaire et cytoplasmique pour construire des mini-récepteurs [Willnow et coll., 1994]. Ces récepteurs chimériques ont été exprimés dans des cellules, et la liaison au récepteur, l'internalisation et la dégradation de divers ligands radio-marqués ont été étudiées. Ces deux mini-récepteurs lient et dégradent RAP. Par contre, seul le mini-récepteur exprimant le domaine II est capable de fixer les complexes tPA:PAI-1. Enfin, quatrièmement, les domaines individuels de LRP ont été exprimés comme des protéines sécrétrices [Bu et Rennke, 1996]. Les domaines sécrétés ont été immobilisés sur membranes de nitrocellulose et utilisés pour étudier la liaison de RAP. Celle-ci se lie fortement aux domaines II et IV, mais assez faiblement au domaine III.

Toutes ces études indiquent que le récepteur entier n'est pas indispensable pour l'activité d'internalisation des ligands et que LRP possède différents domaines, agissant indépendamment l'un de l'autre et peut lier plusieurs ligands simultanément. De plus, elles fournissent la preuve de l'implication du domaine II dans la liaison de la protéine  $\alpha$ 2-M, du complexe uPA:PAI-1, de la lipase lipoprotéique, du complexe tPA:PAI-1, et de la protéine RAP. Bien que  $\alpha$ 2-M et tPA:PAI-1 lient le même domaine, ils ne se concurrencent pas pour leur attachement à LRP [Bu et coll., 1992 ; Nykjaer et coll., 1992], indiquant que des sous-domaines, présents dans les domaines II et encore non-identifiés, déterminent la spécificité de liaison de ces ligands.



**Figure 18:** Organisation structurale de LRP. Liaison des ligands de LRP aux quatre regroupements de domaines de liaison. D'après Herz J et Strickland DK, 2001.

## VI-2 Les ligands de LRP.

LRP reconnaît au moins trente ligands différents (tableau 5), qui représentent plusieurs familles de protéines. Y sont inclus des lipoprotéines, des protéases, des complexes protéases:inhibiteurs, des protéines de la MEC, des toxines bactériennes, des virus et diverses protéines intracellulaires. Le groupe de loin le plus grand de ligands reconnu par LRP regroupe des protéases ou des molécules associées à la régulation de l'activité protéasique. Certaines protéases à sérine et metalloprotéases peuvent se lier directement à LRP, alors que d'autres protéases se lient uniquement une fois complexées à leur inhibiteur spécifique. Ces derniers incluent des membres de la superfamille d'inhibiteurs des protéinases à sérine dénommée SERPIN. Ces inhibiteurs sont reconnus par LRP seulement à la suite d'un changement de conformation qui s'opère en eux après clivage protéolytique ou réaction avec de petites amines. Par contre, LRP reconnaît les formes natives et complexées de *Tissue*

*Factor Pathway Inhibitor (TFPI)*. LRP peut également lier TSP-1 et TSP-2 et délivrer l'exotoxine A de *Pseudomonas* et des rhinovirus humains dans les cellules. De plus, LRP reconnaît de nombreuses protéines intracellulaires, comme HSP-96, la protéine TAT du VIH-1 et RAP, une protéine résidente dans le reticulum endoplasmique, qui fonctionne comme une protéine chaperonne moléculaire pour LRP et d'autres membres de la famille des récepteurs aux LDL.

Ligands	Catégories physiologiques
ApoE Lipase lipoprotéique Lipase hépatique	Métabolisme et transport des lipoprotéines
tPA	Fibrinolyse, signalisation dans le cerveau
uPA	Migration cellulaire, cicatrisation de blessure
Facteur IXa Facteur VIIIa Facteur VIIa/TFPI	Coagulation sanguine
MMP13 MMP9	Angiogenèse, métastases
Spingolipid activator protein	
Pregnancy Zone Protein $\alpha_2$ -M	Inhibiteurs des pan-protéinases, infections
Complément C3	Infection
PAI-1	Régulation de l'activité de tPA et uPA
Inhibiteur C1	Régulation de l'activité C1r/C1s
Antithrombin III TFPI Heparin cofactor II	Régulation de la coagulation sanguine
$\alpha_1$ -Antitrypsine	Régulation de l'élastase neutrophile
APP	Rôle physiologique non défini
TSP-1	Activation du TGF- $\beta$ , interactions cellules-matrice
TSP-2	Assemblage du collagène, interactions cellules-matrice
Lactoferrine	Anti-bactérien
Rhinovirus	
RAP HSP-96	Protéines chaperonnes
Protéine TAT du VIH-1	Activation de la transcription

**Tableau 5:** les ligands de LRP et leurs rôles physiologiques. (d'après Herz et Strichland, 2001)

## VI-3 Les fonctions de signalisation de LRP

Des études récentes indiquent que LRP participe également aux voies de signalisation. Ceci s'effectue en coopération avec d'autres molécules de surface cellulaire qui s'associent directement ou indirectement avec LRP et avec des molécules adaptatrices cytoplasmiques qui s'associent avec sa queue C-terminale.

### VI-3-1 Interactions avec les protéines de surface cellulaire

LRP a été décrit comme composant du complexe récepteur de la midikine [Muramatsu et coll., 2000], un facteur de croissance liant l'héparine et possédant des activités pro-migratoire et stimulante de la survie cellulaire. La midikine lie LRP avec une grande affinité et la survie des neurones embryonnaires dépendante de la midikine est inhibée en présence de RAP, confirmant le rôle de LRP dans ce processus. Toutefois, le rôle précis de LRP dans cette voie de signalisation reste à établir.

L'association de tPA avec LRP apparaît également être important pour la réponse signal des neurones. Des études chez des souris déficientes en tPA révèlent que la potentialisation à long terme de phase tardive (LTP) est sensiblement altérée, comparée à celle observée chez les souris sauvages, et peut être restaurée en ajoutant du tPA exogène. L'effet de tPA sur la LTP semble requérir l'association de LRP, car RAP inhibe la LTP induit par tPA [Zhuo et coll., 2000]. L'association de tPA avec LRP provoque également l'augmentation de l'activité de la protéine kinase A (PKA), et ceci pourrait à son tour altérer la LTP, car la PKA est connu pour être impliquée dans ce processus.

LRP est assez fortement exprimé dans les neurones du cerveau. La fonction de ce récepteur n'est à ce jour pas très claire, mais une évidence expérimentale suggère qu'il contribue à l'activité neuronale normale et au développement de désordres neuropathologiques [Herz et Beffert, 2000]. LRP est localisé principalement au niveau des membranes post-synaptiques qui reçoivent les signaux entrants [Gotthardt et coll., 2000]. Dans ces membranes, LRP est impliqué dans la régulation des flux de calcium, qui est un mécanisme central contrôlant le niveau global de l'activité synaptique. Des études sur des neurones en culture primaire indiquent que l'ajout de l'inhibiteur de protéase  $\alpha_2$ -M induit un fort influx de calcium, qui peut être bloqué par des antagonistes de LRP [Bacskai et coll., 2000].  $\alpha_2$ -M est un inhibiteur de protéases de 720 kDa qui subit un changement

conformationnel lors de la liaison à la protéase, exposant ainsi un motif de liaison à LRP. Parce que cet inhibiteur est un homotétramère hébergeant 4 sites de liaison au récepteur, il peut simultanément se lier à plusieurs molécules LRP [Gliemann, 1998]. Il a été montré que l'agrégation de LRP induite par  $\alpha_2$ -M à la surface des neurones génère un influx de calcium localement restreint. Cet influx est médié à travers les récepteurs à glutamate de type *N*-methyl-D-aspartate (NMDA), bien que l'on ne sache pas si LRP s'associe directement avec ces récepteurs NMDA. Ils pourraient, en effet, interagir via la protéine d'échafaudage post-synaptique PSD-95, qui peut lier ces deux protéines [Gotthardt et coll., 2000], (figure 19A).

### **VI-3-2 Interactions avec les protéines adaptatrices et d'échafaudage intracellulaires**

Non seulement le domaine extracellulaire de LRP lie une multitude de ligands biologiquement divers, mais un nombre croissant de protéines cytoplasmiques est également découvert comme interagissant avec l'extrémité C-terminale de LRP. La recherche de telles protéines a été initiée parce qu'il devenait impossible de réconcilier un spectre ahurissant d'observations expérimentales concernant les diverses fonctions de LRP avec un simple rôle de récepteur d'endocytose ou de transporteur cellulaire de molécules extracellulaires.

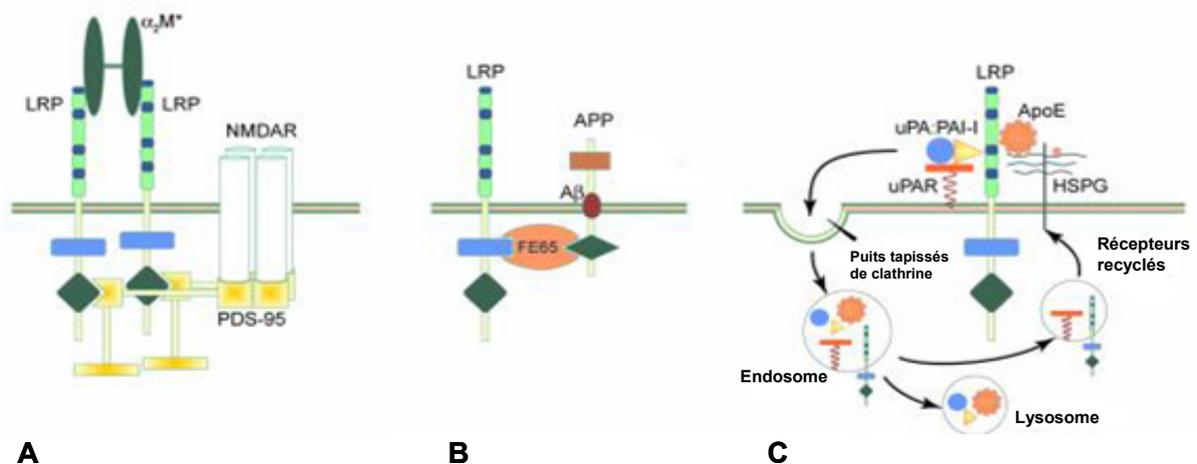
Initialement, les recherches se sont focalisées sur le motif de quatre acides aminés NPXY, présent en deux exemplaires dans la queue C-terminale de LRP. Ces deux motifs peuvent fonctionner indépendamment comme signal d'internalisation. En effet, un seul de ces motifs est suffisant pour permettre l'endocytose rapide du récepteur aux LDL [Chen et coll., 1990], suggérant qu'un des deux de ces motifs pourraient interagir avec d'autres protéines du cytoplasme, en plus de la machinerie d'endocytose. Les motifs NPXY ont justement été montrés comme interagissant avec des protéines cytoplasmiques contenant des domaines appelés "phosphotyrosine-binding" (PTB). En outre, dans un nombre croissant de cas, il est devenu évident qu'une phosphorylation du résidu tyrosine de ces motifs n'était pas requise pour la liaison des domaines PTB. Deux protéines cytoplasmiques, contenant des domaines PTB ont été à l'origine décrites comme pouvant interagir spécifiquement avec les motifs NPXY de la queue LRP. L'une d'entre elles, Disabled-1 (Dab1) se lie spécifiquement au second motif NPXY de LRP et joue un rôle important dans la transmission du signal de position pour les neurones en migration, durant le développement du cerveau [Trommsdorff et coll., 1999]. La seconde de ces protéines, la protéine d'échafaudage FE65 contient deux

domaines PTB et un domaine WW par lequel il peut interagir spécifiquement avec LRP [Trommsdorff et coll., 1998] et la protéine précurseur amyloïde (APP) [Bressler et coll., 1996 ; Zambrano et coll., 1997 ; Pietrzik et coll., 2004] (figure 19B). APP est impliqué dans l'initiation et dans la progression de la maladie d'Alzheimer, un désordre neurodégénératif dévastateur caractérisé par l'accumulation d'un dépôt protéique dans le cerveau. Parmi les symptômes présents chez des patients atteints de cette maladie, on observe la formation de plaques extra-cellulaires composées d'un peptide dénommé  $\beta$ -amyloïde de 40-42 acides aminés ( $A\beta$ ). Ce peptide entoure normalement des parties des domaines transmembranaire et extra-cellulaire de la protéine APP et est généré par le traitement de celle-ci par deux protéases cellulaires, les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases. Mais une étape de traitement alternatif impliquant une  $\alpha$ -sécrétase, conduit à un clivage de APP à la surface cellulaire, libérant ainsi le fragment extra-cellulaire (sAPP) et perturbant la séquence du peptide  $A\beta$ . Les mécanismes qui dirigent APP dans l'une ou l'autre de ces voies restent à identifier, mais LRP pourrait être un des facteurs impliqués. En effet, il interagit avec APP via FE65. En outre, il peut s'associer directement avec un domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz retrouvé dans la portion extra-cellulaire de quelques variants APP [Kounnas et coll., 1995]. Le blocage de cette interaction réduit la production de  $A\beta$  [Ulery et coll., 2000]. Enfin, le rôle de LRP dans la maturation de APP est supporté par une évidence génétique qui fait le lien entre l'expression des gènes du récepteurs et de deux de ses ligands ( $\alpha_2$ -M et apoE) et un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer [Herz et Beffert, 2000].

Après la découverte de Dab1 et FE65 comme protéines liant la queue de LRP, des criblages étendus de levures double-hybrides ont été conduits en utilisant différentes parties des queues cytoplasmiques des membres de la famille des LDL-R [Gotthardt et coll., 2000 ; Stockinger et coll., 2000]. Plusieurs autres produits de gènes ont été identifiés comme interagissant spécifiquement avec des régions distinctes de la queue cytoplasmique des membres des LDL-R. Quelques-unes d'entre elles contiennent également des domaines PTB [Barnes et coll., 2001], alors que la plupart des autres contiennent des domaines PDZ, un autre type de structures d'interaction protéique. Par exemple, LRP pourrait jouer un rôle important dans la transduction du signal en aval de Src et d'autres tyrosine-kinase non-récepteurs. v-Src phosphoryle la protéine adaptatrice Shc, qui alors recrute Grb2-Sos, potentialisant ainsi l'activation de Ras. En utilisant des mutants Shc, Barnes et coll., ont découvert que seules les mutations dans le domaine PTB de Shc abolissaient la phosphorylation de cette protéine adaptatrice [Barnes et coll., 2001]. Cette équipe a purifié

une protéine de 100 kDa liant le domaine PTB de Shc, identifiée comme la sous-unité  $\beta$  de LRP, et montra que LRP est phosphorylé sur tyrosine dans des cellules transfectées par v-Src et que la tyrosine phosphorylée lie Shc [Barnes et coll., 2003]. Ainsi, LRP peut jouer un rôle important dans la localisation de Shc à la membrane plasmique, fournissant de ce fait un lien à la voie Ras-ERK-MAP kinase et des voies alternatives en aval de Shc.

Ces nouvelles protéines adaptatrices et d'échafaudage identifiées sont des organisatrices ou des régulatrices clés de la signalisation MAP kinase, du fonctionnement des canaux ioniques au niveau post-synaptique, du transport des microtubules, de la signalisation par l'oxyde nitrique (NO) et du guidage des axones. Alors que les fonctions spécifiques de LRP dans la plupart de ces processus reste à déterminer, il est maintenant clair que ce récepteur est impliqué dans au moins quelques uns d'entre eux [Herz et Beffert, 2000 ; Trommsdorff et coll., 1999 ; Bacskai et coll., 2000].



**Figure 19:** Interactions extracellulaires et intracellulaires de LRP avec des ligands associés à la membrane. (A) Dimérisation de LRP par  $\alpha_2M$  et association avec les récepteurs NMDA (NMDAR). La dimérisation de LRP chez des neurones en culture induit un influx de calcium provoqué par les récepteurs NMDA. La protéine PSD-95 interagit avec LRP et NMDAR grâce à différents domaines d'interaction. (B) Association de LRP avec APP via la protéine d'échafaudage cytoplasmique FE65. FE65 peut interagir avec LRP et APP, grâce à ses domaines PTB indépendants. (C) Internalisation de ligands à ancrage GPI (ici, uPAR) et à ancrage HSPG. Dans le complexe uPA:PAI-1, PAI-1 se lie à LRP et uPA se lie à uPAR. Des lipoprotéines contenant ApoE sont séquestrées sur des HSPGs, facilitant ainsi l'enrichissement en ApoE et les interactions avec LRP. Après internalisation et dissociation des ligands de leurs récepteurs dans les endosomes, les récepteurs sont recyclés à la membrane plasmique. (d'après Herz J et Strickland DK, 2001)

## VI-4 Rôle de LRP dans le métabolisme des protéases de la MEC

A travers ses effets sur certaines protéases à sérine et métalloprotéases, LRP est un régulateur crucial de l'activité protéolytique extracellulaire. uPA et tPA sont des protéases à sérine qui activent le plasminogène et jouent un rôle important dans la réparation tissulaire, l'invasion tumorale et la migration cellulaire dans des situations physiologiques et pathologiques (cf. § IV). uPA est de manière prédominante associé aux cellules via son récepteur cellulaire uPAR, et initialise une cascade protéolytique qui active les MMPs. Cette voie protéolytique est régulée par l'inhibiteur spécifique PAI-1, qui forme un complexe stable avec uPA. Une fois formé, ce complexe est rapidement internalisé avec uPAR et dégradé (figure 19C) par un mécanisme dépendant de LRP ou d'autres membres de la famille LDL-R [Herz et coll., 1992 ; Nykjaer et coll., 1992]. Cette voie de dégradation permet la régénération de uPAR libre, nécessaire pour maintenir l'activation du plasminogène à la surface cellulaire. L'échec dans l'élimination des complexes uPA:PAI-1 de la surface cellulaire diminue le taux d'activation du plasminogène [Zhang et coll., 1998] et peut altérer la capacité de uPA à déplacer les molécules de PAI-1 fixées à la vitronectine, et donc inhiber la migration cellulaire dépendante de uPA [Stefansson et Lawrence, 1996].

En plus de ces effets sur le niveau et l'activité d'uPA, LRP régule également les niveaux de certaines MMPs de manière directe ou indirecte. En effet, il a été démontré que le catabolisme de MMP-13 implique deux récepteurs : un récepteur spécifique de la collagénase 3 qui agit comme un site de liaison primaire aux cellules et LRP, requis pour l'internalisation de cette enzyme [Barmina et coll., 1999]. De plus, une interaction directe et de haute affinité entre MMP-9 et LRP a été mise en évidence [Hahn-Dantona et coll., 2001].

Une autre équipe a montré que des IgG anti-LRP ou RAP peuvent chacun inhiber l'adhésion et provoquent une augmentation du niveau de MMP-2 dans les milieux conditionnés de cellules sauvages, mais pas dans ceux de cellules déficientes en TSP-2 [Yang et coll., 2000]. Ainsi, TSP-2 semble impliquée dans l'internalisation de MMP-2 par LRP. Ce dernier ne semble pas pouvoir interagir directement avec MMP-2 mais apparaît être capable de lier le complexe TSP-2:MMP-2. Parallèlement, il est connu que le motif TSR de TSP-1 et -2 peut interagir avec la région amino-terminal de MMP-2 qui contient le domaine catalytique [Bein et Simon, 2000].

De leur côté, Mikhailenko et coll. ont reporté une interaction spécifique et de haute affinité entre TSP-1 et LRP, puis ont démontré que l'internalisation et la dégradation de TSP-1 étaient médiées par son domaine de liaison à l'héparine en N-terminal [Mikhailenko et coll., 1997]. Il est à noter que des protéoglycannes de surface cellulaire apparaissent faciliter ce processus. La localisation de TSP-1 à la surface cellulaire via sa liaison aux protéoglycannes et à LRP est une étape importante du catabolisme de TSP-1 et *a fortiori* de MMP-2, car cela permet une augmentation de la concentration locale de ligands. Selon ces données, on peut considérer que les mêmes types d'interactions et les mêmes mécanismes d'internalisation existent pour les complexes LRP:TSP-2:MMP-2 et LRP:TSP-1:MMP-2.

La capacité de LRP à moduler les niveaux d'expression de trois MMPs (MMP-2, MMP-9 et MMP-13) indique un rôle majeur pour ce récepteur dans le contrôle d'une activité protéolytique extracellulaire excessive. Les taux et l'activité de LRP sont connus pour être sensiblement diminués dans les tumeurs [Kancha et coll., 1994], ce qui diminuerait notamment le catabolisme de MMP-2 et d'uPA, conduisant à une concentration plus élevée de ces protéases au niveau des sites tumoraux. Kancha et coll. ont observé une corrélation entre des phénotypes invasifs et une faible expression de LRP dans différents sous-clones dérivés d'une lignée cellulaire tumorale.

D'autre part, à la lumière de ces données, il semble que TSP-1 joue un rôle essentiel aussi bien dans l'activation de MMP2 que dans son catabolisme. Cette hypothèse est renforcée par la présence de sites de reconnaissance pour LRP, MMP2 et des protéoglycannes situés dans le même domaine de TSP-1 [Mikhailenko et coll., 1997].

## **But du travail**

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biochimie de l'UFR sciences Exactes et Naturelles de Reims, appartenant à l'UMR CNRS 6198 intitulée "Matrice Extracellulaire et Régulation Cellulaire". La thématique principale de l'unité est l'étude des interactions entre cellules et matrice extracellulaire dans les situations physiologiques et pathologiques. Une des équipes du laboratoire de Biochimie étudie plus précisément le rôle de la thrombospondine 1 (TSP-1) dans la régulation de la protéolyse extracellulaire, lors des processus de prolifération, de différenciation et d'invasion tumorale.

La TSP-1 est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire, dont le rôle dans l'invasion cellulaire semble dépendre du contexte et du type cellulaire étudié. Elle serait capable d'influencer le potentiel invasif en régulant notamment l'activité protéasique de la MMP2 et de l'uPA [Hosokawa et coll., 1993 ; Albo et coll., 1997 ; Taraboletti et coll., 2000]. Des travaux antérieurs effectués au sein de notre équipe ont établi une corrélation entre l'expression de TSP-1 et la dédifférenciation de thyrocytes porcins en culture primaire [Bellon et coll., 1994 ; Claisse et coll., 1999]. Il a ensuite été montré que l'expression de TSP-1 était corrélée à l'expression d'uPA et à l'activation de la pro-MMP2 et que ces deux composants matriciels jouaient un rôle important dans ce changement phénotypique observé chez les thyrocytes porcins [Delorme, 2003]. Par ailleurs, d'autres études ont montré que TSP-1 pouvait réguler la protéolyse extracellulaire via sa capacité à interagir avec le récepteur d'endocytose LRP et ainsi à faciliter l'internalisation de certaines protéases matricielles [Herz et coll., 1992 ; Nykjaer et coll., 1992 ; Yang et coll., 2000].

Le but de ce travail est d'étudier le rôle de TSP-1 et de LRP dans les processus invasifs de cellules thyroïdiennes. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser deux lignées cellulaires dérivées d'un carcinome folliculaire thyroïdien et possédant des capacités invasives différentes : les cellules FTC-133, peu invasives, issues d'une métastase ganglionnaire et les cellules FTC-238, très invasives, issues d'une métastase pulmonaire.

Dans une première partie, nous avons cherché à comprendre quel était le rôle de TSP-1 dans la régulation des activités protéasiques de MMP2 et d'uPA, ainsi que dans le potentiel invasif des cellules FTC.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'influence du récepteur d'endocytose LRP sur les capacités invasives des deux lignées cellulaires.

# *Matériel et Méthodes*

## **I-MODELE CELLULAIRE**

Les cellules utilisées lors de tous nos travaux sont deux lignées dérivées, à différents stades de la maladie, d'un même patient de 42 ans atteint d'un cancer folliculaire thyroïdien, qui s'est ensuite généralisé et qui lui a été fatal. Elles sont dénommées FTCs (Follicular Thyroid Carcinoma) et possèdent des phénotypes invasifs très différents [Goretzki et coll., 1990]. Ces deux lignées nous ont été fournies par *European Collection of Cell Cultures* (ECACC).

### **I-1 Les FTC-133**

La lignée de cellules FTC-133 (N° ECACC 94060901) est une lignée immortalisée établie à partir d'une métastase ganglionnaire lymphatique du patient. Nous les avons reçus à leur 10<sup>ème</sup> passage. Elles ont gardé leurs fonctions de thyrocytes différenciés et sont sensibles à la thyrotropine (TSH), et à d'autres facteurs de croissance comme l'EGF et l'IGF, bien que pour certains auteurs, elles ne semblent pas posséder de récepteurs à la TSH [Derwahl et coll., 1993]. Une autre équipe a montré que les FTCs exprimaient le récepteur, mais que la transduction du signal était déficiente [Demeure et coll., 1997]. Elles sont également immunoréactives à la thyroglobuline. Ces cellules ont un caractère peu invasif. Elles possèdent en revanche un fort indice de prolifération, qui nécessite toutefois un apport en sérum de veau fœtal (SVF).

### **I-2 Les FTC-238**

La lignée de cellules FTC-238 (N° ECACC 94060902) est une lignée métastatique obtenue à partir d'une tumeur secondaire développée au niveau des poumons. Nous les avons reçues à leur 53<sup>ème</sup> passage. Ces cellules sont plus dédifférenciées que les FTC 133 et sont beaucoup moins sensibles aux hormones. Elles sont également plus grandes et ont une morphologie plus « étoilée ». Les FTCs ont un indice de prolifération plus bas que les FTC 133 mais possèdent en revanche un fort caractère invasif.

## **II-CULTURE CELLULAIRE**

### **II-1 Entretien des cellules**

Les cellules FTC-133 et 238 sont cultivées à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu composé de D-MEM (Dulbecco-modified Eagle medium) et de Ham's F-12, en proportion 1:1, contenant du Glutamax-1 (Invitrogen) et supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, Roche Molecular Biochemicals) préalablement inactivé et 0,1% (v/v) d'un mélange d'antibiotiques (100 U/ml pénicilline, 10 µg/ml streptomycine, Sigma). La concentration cellulaire maximale est de 20.10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> pour les FTC 133 et de 12.10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> pour les FTC 238 et leur temps de dédoublement est de respectivement environ 20 heures et 30 heures. Les FTC 133 sont diluées au 1/20<sup>è</sup> une fois par semaine et les FTC 238 le sont au 1/10<sup>è</sup>.

### **II-2 Mise au repos des cellules**

La mise au repos correspond à la privation de tout facteur de croissance, ce qui permet d'une part d'éteindre la signalisation intracellulaire induite par ces facteurs et d'autre part d'amener chaque cellule au même stade ou cycle cellulaire, afin que celles-ci répondent de façon synchronisée aux différents traitements. Les cellules FTCs à environ 75% de confluence sont lavées deux fois avec du PBS, afin d'éliminer toutes traces de facteurs de croissance. Elles sont ensuite mises au repos durant 8 heures par incubation dans du milieu sans sérum.

### **II-3 Traitements des cellules**

Après la mise au repos, le milieu sans sérum des cellules est renouvelé et additionné pendant 24 heures, à 37°C, de 50µg/ml de TSP-1 (purifié au laboratoire, cf. *chapitre VI*) ou 30µg/ml d'IgG monoclonal anti-TSP-1 neutralisant (3F355) provenant de la souris (US Biological, ref. T5100-06FX), 500 nM de *Receptor-Associated Protein* recombinant (RAP, une protéine chaperonne de LRP, qui agit comme antagoniste) ou 25µg/ml d'IgG polyclonales anti-LRP provenant du lapin (#R2629) (tout deux gracieusement fournis par le

Dr D.K. Strickland). Des IgG de lapin et de souris provenant de chez Calbiochem ont été utilisées comme contrôles pour les traitements aux IgG. Les traitements sont stoppés par abaissement de la température à 4°C et récupération des milieux ainsi conditionnés.

## II-4 Test d'invasion en Transwell™

Les tests d'invasion mesurent la capacité des cellules FTC à pénétrer une membrane de polycarbonate insérée dans un puits de 6,5mm (Transwell, Costar) et recouverte de Matrigel (40µg/ml), à travers des pores de 8µm de diamètre. Le Matrigel (ECM Gel, Sigma) est un gel qui contient les principaux composants de la MEC, tel que la laminine, le collagène de type IV, des protéoglycannes à héparane sulfate, l'entactine et d'autres composants mineurs. Polymérisé, le Matrigel reconstitue la membrane basale.

Les cellules FTC ( $2 \times 10^4$ ) sontensemencées dans le compartiment supérieur du puits dans 100µl de milieu D-MEM/Ham's F12 supplémenté avec 0,2% (W/V) de sérum albumine bovine. Ce compartiment contient également les effecteurs utilisés pour les différents essais : RAP 500nM (décrit ci-dessus), IgG anti-LRP 25µg/ml (décrit ci-dessus), TSP-1 50µg/ml (purifié au laboratoire, cf. *chapitre VI*), IgG anti-TSP-1 neutralisant (3F355) 30µg/ml, uPA 100U/ml (Merck Bioscience), IgG anti-uPA neutralisant 25µg/ml (réf.394OA, American Diagnostica Inc.), PAI-1 10µg/ml (France Biochem), TIMP2 20ng/ml (Calbiochem) et Galardin  $10^{-9}$ M (Calbiochem). Des IgG de lapin et de souris provenant de chez Calbiochem ont été utilisées comme contrôles pour les traitements aux IgG. Le compartiment inférieur contient 800µl de milieu contenant 10% de SVF et supplémenté de 2% de sérum albumine bovine. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures, puis les cellules associées à la face supérieure de la membrane sont retirées à l'aide de coton-tiges. Les cellules qui ont pénétré à travers le Matrigel dans la partie inférieure du Transwell sont fixées avec 10% (v/v) de méthanol puis coloré au Crystal Violet. Chaque point est fait en triplicata et 3 champs par puit sont photographiés à l'aide d'un microscope inversé à contraste de phase à l'objectif x20 (Nikon TE300). Les cellules invasives sont ensuite comptées et les résultats sont exprimés sous forme de pourcentage de cellules invasives par champ par rapport au contrôle correspondant.

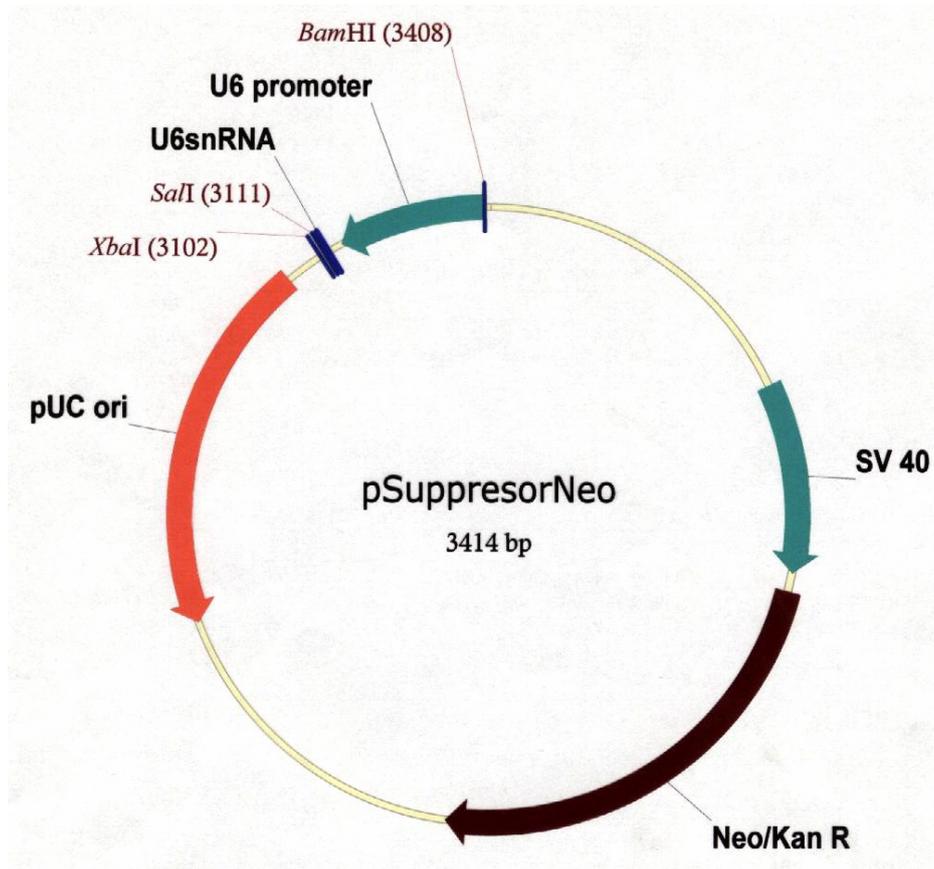
### **III TRANSFECTIONS DES CELLULES FTCs : EXTINCTION DE LRP PAR RNAi.**

La technique de "*RNA interference*" (RNAi) a été choisie afin d'inhiber l'expression endogène de LRP dans les cellules FTCs. Cette technique de "*silencing*" post-transcriptionnelle est simple et facile à mettre en œuvre, se montre plus efficace que celle des anti-sens et moins laborieuse que celle de l'inactivation génique. Elle consistait au départ à transférer, à l'aide de liposomes cationiques, de longs oligonucléotides d'ARN double brins (dsRNA) spécifiques des séquences du gène dont on veut réprimer l'expression. Le principe exact de fonctionnement reste encore mal connu, cependant différents auteurs s'accordent à dire que le long brin d'ARN est tout d'abord clivé en petits ARN double brins (*small interfering RNA* ou siRNA) de 19 à 21 pb, par une ribonucléase III ATP-dépendante (Dicer) spécifique des dsRNA. Les siRNA se lient ensuite à un complexe connu sous le nom de complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Cette association est ATP-dépendante. Une fois le complexe RISC activé, il va s'apparier avec le transcrite homologue cible et le cliver à environ 12 nucléotides à partir de l'extrémité 3' du siRNA [Hammonnd et coll., 2001 ; Hutvagner et Zamore, 2002 ; Nykanen et coll., 2002]. Dans les cellules de mammifères, cependant, la transfection d'un long dsRNA provoque une réponse cytotoxique non-spécifique. Pour palier à ce problème, il faut utiliser des segments courts de dsRNA d'une vingtaine de bp, c'est à dire des siRNA [Elbashir et coll., 2001]. Il existe plusieurs techniques pour cela : on peut soit transférer directement les cellules avec des siRNA synthétisés chimiquement, soit faire exprimer les siRNA par les cellules, en les transfectant avec un plasmide d'expression possédant un promoteur de la classe des promoteurs pol III. C'est pour cette seconde stratégie que nous avons opté. Celle-ci a en effet l'avantage d'inhiber l'expression du gène d'intérêt sur un long terme, dans la mesure où les siRNA peuvent être exprimés par les cellules de manière stable.

#### **III-1 le plasmide pSuppressorNeo**

Ce vecteur plasmidique non viral de 3414 pb (IMGENEX, ref.IMG-800) permet d'exprimer de manière stable, dans une cellule eucaryote, un siRNA choisi, correspondant à une portion de la séquence du gène à éteindre. La transcription intracellulaire du siRNA est

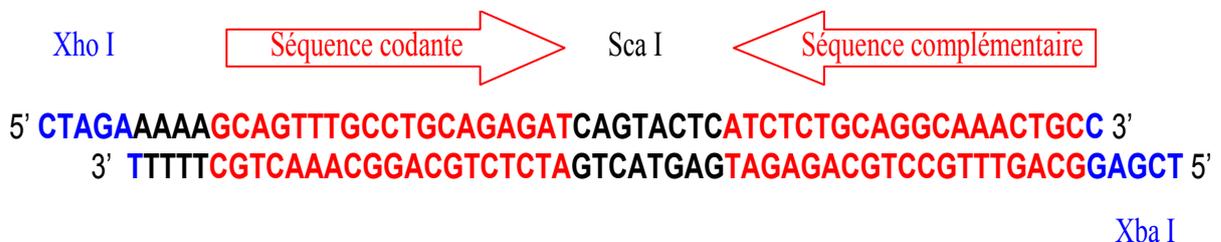
possible en le clonant au sein d'une unité de transcription ARN pol III, qui normalement encode U6snRNA (smaller nuclear RNA). Les siRNAs sont synthétisés en une structure tige-boucle repliable sur elle-même. Le promoteur U6 est un membre des promoteurs de pol III. Le signal de terminaison de ce promoteur est défini par 5 thymidines et le transcrit est typiquement clivé après la seconde uridine. Ce vecteur possède également un gène de résistance à la néomycine, qui permettra la sélection des cellules eucaryotes ayant intégré le vecteur (figure 20).



**Figure 20 :** carte du vecteur plasmidique pSuppressorNeo (IMGENEX IMG-800)

### III-2 l'insert codant pour le siRNA

L'oligonucléotide double brin utilisé pour créer le vecteur siRNA hLRP est constitué d'une séquence de 19 nucléotides correspondant à une région codante de LRP. Celle-ci démarre en position 88, en aval du codon *start* ATG de l'ARNm de LRP. Il est également constitué d'une autre séquence de 19 nucléotides correspondant à la séquence complémentaire (ou séquence inverse). Ces deux motifs sont séparés par une séquence de 8 nucléotides, incluant le site de restriction Sca I, et qui formera la boucle du siRNA transcrit. Le site de terminaison de la transcription 5T est ajouté à l'extrémité 3' de la séquence inverse. Enfin, l'oligonucléotide est flanqué des sites de restriction Xho I en 5' et Xba I en 3' (figure 21).



**Figure 21** : séquence de l'insert double brin codant pour le siRNA hLRP en structure tige-boucle.

Cet oligonucléotide est inséré au sein de l'unité transcriptionnelle de l'ARN pol III U6 du vecteur pSuppressorNeo, entre les sites Sal I et Xba I (figure 20). Le site de restriction Xho I est compatible avec le site Sal I, toutefois, après le clonage en Sal I, ces deux sites disparaissent. Cette particularité permet un criblage rapide des plasmides recombinants. Lorsque l'insert sera transcrit, les deux séquences complémentaires s'hybrideront entre elles, mimant ainsi un ARN double brin.

En contrôle négatif, la séquence de l'oligonucléotide double-brin, inséré dans le vecteur pSuppressorNeo, a été modifiée au niveau de 4 paires de bases au cœur de chacune des deux séquences, codante et complémentaire (5'-CCTG-3' remplacé par 5'-TGCC-3').

### **III-3 Transfection stable des cellules FTCs**

La technique utilisée est celle de lipofection. Le réactif lipidique utilisé est celui du kit IMGENEX livré avec le vecteur pSuppressorNeo. C'est une émulsion lipidique polycationique associée à des lipides neutres. Ces derniers vont former des liposomes unilamellaires en milieu aqueux dont la surface est chargée positivement. La construction d'ADN présente va s'associer à la surface de ces structures par des liaisons de type électrostatique et pourra ainsi être internalisée lors de la fusion des liposomes avec la membrane plasmique.

Les transfections s'effectuent dans des plaques 6 puits, dans lesquelles  $5.10^5$  cellules par puits sontensemencées et cultivées pendant 24 heures dans leur milieu avec 10% de SVF. Ensuite, 5 $\mu$ g de vecteur pSuppressorNeo-hLRP linéarisé par BamH I sont placés dans 500 $\mu$ l de milieu sans SVF d'un côté et 10 $\mu$ l de produit de transfection dans 500 $\mu$ l de milieu sans SVF, de l'autre. Ces deux solutions sont mélangées puis les complexes ADN-liposomes sont mis en contact avec les cellules à un taux de confluence d'environ 80%, à raison de 1ml/puit, pendant 6 heures. Le milieu de transfection est alors retiré et remplacé par du milieu contenant 10% SVF. Au bout de 24 heures, le milieu est renouvelé afin d'éliminer les cellules mortes dues à la lipofection.

24 heures plus tard, les cellules ainsi transfectées sont cultivées en présence de 300 $\mu$ g/ml de généticine (G418, Invitrogen), afin de commencer la sélection des cellules ayant intégré le vecteur dans leur génome. En effet, seules celles-ci auront la capacité d'exprimer durablement le gène de résistance au G418 présent dans le vecteur, et donc de survivre à cet antibiotique. Notons que des tests préalables de sensibilité, effectués sur les deux lignées cellulaires sauvages, ont montré que 5 jours de traitement à cette concentration de généticine suffisaient à tuer toutes les cellules. Durant 1 semaine, le milieu contenant 10% SVF et 300 $\mu$ g/ml de G418 est renouvelé toutes les 48 heures, puis les cellules résistantes formant des colonies isolées sont trypsinisées et repiquées dans des plaques à 96 puits, à raison d'une colonie/puit. Plusieurs colonies sont ensuite testées par Western blot pour observer l'inhibition d'expression de LRP et les clones dont l'extinction est la plus forte, sont utilisés pour les différentes expériences à suivre.

## **IV ETUDE DE L'EXPRESSION DES ARN MESSAGERS**

### **IV-1 Extraction des ARNs totaux**

Les ARNs sont extraits et purifiés à partir des cellules FTC 133 et 238 à l'aide du kit d'isolation RNeasy (Qiagen), selon les instructions du fabricant. La quantité et la qualité des ARNs sont évaluées par spectrophotométrie. Les ADNc simple brin sont synthétisés à partir de 1µg d'ARNs totaux en utilisant un système de transcription inverse (Promega Bioscience Inc.).

### **IV-2 Analyse par Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

#### **IV-2-1 Transcription inverse et choix des amorces**

Les ARNs sont tout d'abord soumis à une dénaturation pendant 10 min à 65°C. La transcription inverse est ensuite réalisée à 42°C pendant 1 heure dans un volume réactionnel final de 20µl en présence de transcriptase inverse du virus aviaire myéloblastique ou AMV-RT (5U) et 500ng de primers oligo-dT. Cette étape est suivie d'une incubation de 5 min à 95°C, entraînant la dénaturation des hétéroduplexes ADN/ARN.

Les amorces pour uPAR, uPA et PAI-1 ont été précédemment décrits dans [Smit et coll., 1999]. Les amorces sens et anti-sens pour LRP, TSP-1, MMP2, TIMP2, GAPDH et S26 ont été synthétisées par Invitrogen et ont été choisies comme suit :

**LRP** : 5'-TCAATGGGTGGATGTAAGTGA-3' et 5'-AATCTTCCGGTCTGTGCCAT-3'

**TSP-1** : 5'-CTCAGGAACAAAGGCTGCTC-3' et 5'-ACTCCTGAATGTGGCAGGTC-3'

**MMP2** : 5'-GTGCTGAAGGACACCCTCAAGAAGA-3' et  
5'-TTGCCGTCCTTCTCAAAGTTGTACG-3'

**TIMP2**: 5'-GTCATCTTGATCTCATAACGCTGG-3' et  
5'-AGCCCATCTGGTACCTGTGGTTCA-3'

**GAPDH** : 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' et 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'

**S26** : 5'-GTGCGTGCCCAAGGATAAGG-3' et 5'-ATGGGCTTTGGTGGAGGTCG-3'

#### **IV-2-2 Réaction de polymérisation en chaîne**

Des aliquotes de 0,5µl d'ADNc sont amplifiées dans un volume réactionnel final de 50µl contenant 2mM MgCl<sub>2</sub> et un mélange de dNTP à 400µM chacun. La réaction est initiée par l'ajout de 2,5U d'ADN Taq polymérase (kit PCR Core System I, Promega). L'amplification comprend 30 cycles (ce nombre a été ajusté de façon à ce que les amplifications restent dans la phase exponentielle) d'1 minute de dénaturation à 95°C, d'1 minute d'hybridation à une température qui dépend de la T<sub>m</sub> des amorces utilisées, et de 2 minutes d'extension à 72°C (Mastercycler® gradient Eppendorf™). Les gènes codant pour la protéine ribosomique S26 et pour la protéine glycéraldehyde-3 phosphate déshydrogénase (GAPDH) sont utilisés comme contrôles invariants pour respectivement les amplifications de uPAR, uPA, PAI-1, MMP2 et TIMP2 dont la T<sub>m</sub> est de 55°C et les amplifications de LRP et TSP-1, dont la T<sub>m</sub> est de 60°C. Les produits de RT-PCR sont analysés sur un gel d'agarose 1,2% (p/v) contenant du bromure d'éthidium et visualisé sous UV. Les tailles attendues des produits d'amplification des ARNm endogènes sont : uPAR = 406 pb, uPA = 417 pb, PAI-1 = 320 pb, MMP2 = 595 pb, TIMP2 = 261 pb, S26 = 261 pb, LRP = 233 pb, TSP-1 = 604 pb, et GAPDH = 565 pb.

### **V ANALYSE DES PROTEINES**

#### **V-1 Prélèvement des milieux de cultures conditionnés**

Les milieux de culture conditionnés sont collectés et sont ensuite centrifugés à 4000trs/min pendant 20 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Ils sont alors concentrés à l'aide de concentrateurs Vivaspin (Vivascience), dont le seuil de coupure est de 10 kDa. Après dosage de leur concentration protéique, ils sont congelés à -80°C.

#### **V-2 Préparation des extraits protéiques totaux**

Après avoir récupéré (ou éliminé) le milieu de culture, les cellules sont placées à 4°C et sont lavées 2 fois avec du PBS froid. Elles sont ensuite grattées à l'aide d'un "cell scraper" dans 5ml de PBS froid pour environ 10<sup>7</sup> cellules, puis centrifugées 10 min à 1500 rpm et à 4°C. Le culot cellulaire est alors lysé par addition de 5 volumes de tampon Laemmli 5X, puis

porté à ébullition pendant 5 min. Le lysat est enfin soumis aux ultrasons 2 fois 10 sec et congelé à -20°C avant analyse.

### **V-3 Préparation des extraits protéiques membranaires**

Après avoir récupéré (ou éliminé) le milieu de culture, la couche cellulaire est placée à 4°C et est lavée 2 fois avec du PBS froid. Puis les cellules sont grattées à l'aide d'un "cell scraper" dans 5ml de PBS froid pour environ  $10^7$  cellules. Elles sont ensuite centrifugées 10 min à 1500 rpm et à 4°C, puis reprises dans 1 ml de tampon Tris-HCl 20mM pH 7,4, Saccharose 250mM, dithiothréitol (DTT) 0,1mM et un cocktail d'inhibiteur de protéases (PIC, Sigma) au 1:1000<sup>e</sup>. La suspension cellulaire est alors homogénéisée au Potter Dounce dans la glace et le lysat est ultracentrifugé à 105 000g pendant 20 min à 4°C (Ultracentrifugeuse Optima TL100 Beckman™). Le surnageant, qui correspond à la fraction cytosolique, est prélevé et le culot membranaire remis en suspension dans 500µl de tampon beta-glycérophosphate 80mM, EGTA 20mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, Triton X100 0,5%, Glycérol 10% et PIC au 1:1000<sup>e</sup>. La suspension est soumise à sonication puis centrifugée 20 min à 4000 rpm et à 4°C, afin d'éliminer les débris insolubles. Le surnageant obtenu est désigné comme fraction particulaire, et outre les membranes, il contient également les organites cytoplasmiques et les noyaux. Le contenu protéique des différentes fractions est alors dosé et les fractions sont conservées à -80°C.

### **V-4 Immunoprécipitation**

Après élimination du milieu de culture, la couche cellulaire est lavée 2 fois avec du PBS froid, puis les cellules sont incubées pendant 15 min sous agitation avec du tampon de lyse froid, constitué de Tris/HCl 50mM pH 7,5, NaCl 150mM, Brij 98 1% (Sigma) et PIC au 1:1000<sup>e</sup> (1ml de tampon pour environ  $10^7$  cellules). Les cellules sont ensuite grattées à l'aide d'un Cell Scraper et homogénéisées au Potter Dounce. Le lysat est alors centrifugé à 4000g pendant 20 min et le surnageant est récupéré, dosé et utilisé immédiatement ou congelé à -80°C. [A noter que certaines immunoprécipitations ont été effectuées à partir des protéines du milieu de culture. Dans ce cas, celles-ci sont dialysées sur des cellules Vivaspin, afin

d'éliminer le milieu de culture (et notamment le rouge de phénol), et reprises dans le tampon de lyse.]

Pour limiter les liaisons non-spécifiques, les échantillons protéiques sont soumis à un "pre-clearing". Ils sont incubés 1 heure à 4°C, sur agitateur rotatif avec 50µL de billes de protéine G-Sépharose™ 4 Fast Flow (Amersham) préalablement lavées avec du tampon de lyse froid. Le mélange est alors centrifugé à 2000g pendant 30 sec à 4°C et le surnageant est récupéré. Celui-ci est ensuite incubé en présence de 2 à 5µg d'anticorps pendant 2 heures à 4°C sous agitation. Les complexes antigène-anticorps ainsi formés sont précipités par incubation avec 50µl de protéine G-Sépharose pendant 2 heures à 4°C sous agitation rotative, puis lavés quatre fois avec le tampon de lyse et une fois avec du tampon de lavage (Tris/HCl 50mM pH 7,5). L'utilisation de Brij98, détergent ionique doux, permet de conserver les liaisons intermoléculaires, et ainsi de co-immunoprécipiter les protéines liées à la protéine cible de l'anticorps utilisé. Les protéines immunoprécipitées sont solubilisées dans du tampon Laemmli 2X puis portées à ébullition 5 min. Après centrifugation à 2000g pendant 30 sec, le surnageant est prélevé et analysé par western blot ou par zymographie.

## **V-5 Electrophorèse SDS-PAGE**

### **V-5-1 Principe**

L'électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide est réalisée en présence de SDS 0,1% (p/v), détergent anionique capable de se fixer le long des chaînes polypeptidiques et donc de modifier la charge et la conformation des protéines (déroutement de leur structure tertiaire). Leur migration électrophorétique est alors uniquement fonction de leur masse moléculaire respective. La masse moléculaire apparente des différentes protéines séparées est estimée d'après la migration de protéines de référence (Benchmark Pre-stained protein ladder, Invitrogen) allant de 6 à 180 kDa.

Avant d'être déposés, les échantillons normalisés en quantité de protéine sont mélangés à du tampon Laemmli réducteur ou non et portés 3 min à 95°C selon le cas.

## **V-5-2 Protocole expérimental**

### V-5-2-1 Composition des solutions

- Tampon de séparation (A) : Tris/HCl 1,5M, SDS 0,1% (p/v) pH 8,8
- Tampon de concentration (B) : Tris/HCl 0,5M, SDS 0,1% (p/v) pH 6,8
- Tampon de migration : Tris/HCl 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1% (p/v) pH 8,3
- Solution d'acrylamide/bisacrylamide 40% (37,5/1) (Euromedex)
- SDS 10% (p/v)
- TEMED (N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine)
- Persulfate d'ammonium (APS) 10% (p/v)
- Glycérol 75% (v/v)
- Tampon Laemmli 2X: Tris/HCl 250mM, Bleu de Bromophénol 0,1% (p/v), SDS 2% (p/v), Saccharose 4% (p/v) pH 6,8 [+ 2 β-mercaptoéthanol 2% (v/v), si réducteur]
- Tampon de migration : Tris/HCl 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1% (p/v)

### V-5-2-2 Etablissement d'un gradient

L'utilisation d'un gradient linéaire de concentration d'acrylamide permet d'obtenir sur un même gel, la séparation de protéines de haut et de bas poids moléculaire. L'établissement d'un gradient 5-15% est la solution choisie pour analyser les co-immunoprécipitations.

L'établissement d'un gradient de concentration est réalisé grâce à l'utilisation d'un appareil à gradient (Model 385 Gradient Former Bio-Rad™). Ce système est composé de deux chambres : une chambre de mélange, contenant la solution la plus concentrée (15%) et une chambre dite "réservoir", contenant la solution la moins concentrée (5%). Le volume des deux solutions est identique soit 20ml. Le gel est coulé par le haut grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique réglée sur une vitesse comprise entre 5 à 10ml/min.

Lorsque l'utilisation d'un gradient n'est pas requise, le pourcentage du gel de séparation est fixé selon la masse moléculaire de la (ou des) protéine(s) recherchée(s).

Après polymérisation du gel de séparation, le gel de concentration à 5% est coulé. Les échantillons sont déposés dans les puits de ce gel de concentration et la migration est initiée dans le tampon adéquat sous une intensité de 12mA sur 16 heures.

	Gel de séparation à 5%	Gel de séparation à 15%	Gel de concentration à 5%
<b>Tampon (ml)</b>	(A) 5	(A) 5	(B) 5
<b>H2O (ml)</b>	10	0	12
<b>Acrylamide 40% (ml)</b>	2	6	2
<b>Glycérol à 75% (ml)</b>	0	6	0
<b>TEMED (µl)</b>	8	8	4
<b>APS 10% (µl)</b>	50	50	25

**Tableau 6 :** Composition des gels nécessaires à la réalisation d'un gradient linéaire de concentration d'acrylamide.

### V-5-3 Coloration des gels au nitrate d'argent

Cette technique de coloration est très sensible (détection de l'ordre du ng) et permet ainsi l'analyse d'échantillons peu concentrés.

#### V-5-3-1 Composition des solutions

**-Tampon de fixation :** Acide Acétique glacial : 12%  
 Ethanol : 50%  
 Formaldéhyde 37% : 0.05% v/v  
 H<sub>2</sub>O qsp

**-Tampon de prétraitement :** Thiosulfate de sodium : 0.02% p/v, dans H<sub>2</sub>O

**-Tampon de coloration :** Nitrate d'argent : 0.1% (p/v)  
 Formaldéhyde : 0.075% (v/v)

**-Tampon de développement :** Carbonate de Potassium : 2% (p/v)  
 Formaldéhyde 37% : 0.05%

**-Tampon d'arrêt :** Acide Acétique : 12%  
 Ethanol : 50%  
 H<sub>2</sub>O qsp

### V-5-3-2 Mode opératoire

Toutes les étapes du protocole sont réalisées à température ambiante sur plateau agitateur. Après séparation des protéines sur SDS-PAGE, le gel est immergé dans le tampon de fixation pendant au minimum 1 heure, puis est rincé quatre fois 10 min à l'eau distillée. Il est ensuite incubé pendant 1 min dans le tampon de prétraitement puis à nouveau rincé pendant 1 min dans l'eau distillée. Le gel est alors placé pendant 20 min dans le tampon de coloration. Après l'avoir rincé brièvement dans de l'eau distillée, il est plongé dans le tampon de développement jusqu'à visualisation des bandes protéiques et enfin immergé dans le tampon d'arrêt pour stopper le développement.

## **V-6 Immunotransfert en milieu liquide (Western blot)**

### **V-6-1 Electro-transfert des protéines**

A l'issue de leur migration électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) à l'aide d'un appareil de transfert Bio-Rad. Le transfert est réalisé à 4°C dans un tampon Tris/HCl 25mM, Glycine 192mM, SDS 0,1% (p/v) et méthanol 20% (v/v) et à 70V pour une durée allant de 2 à 5 heures selon la taille de la protéine d'intérêt. Une coloration réversible des protéines au Rouge Ponceau (rouge Ponceau S 0,2% (p/v), TCA 3% (p/v)) permet de contrôler l'efficacité du transfert.

### **V-6-2 Immunodétection des protéines**

La membrane de nitrocellulose est saturée pendant 2 heures à température ambiante dans du tampon TBS-t (Tris Buffered Saline-tween : Tris/HCl 50mM, NaCl 150mM, Tween® 20 0,1%) contenant 5% (p/v) de lait écrémé (Merck). Elle est ensuite incubée une nuit à 4°C sous agitation dans une solution de TBS-t/lait 5% contenant l'anticorps primaire à la concentration optimale d'utilisation (Tableau 7). Elle est alors lavée 3 fois 15 min avec du TBS-t puis incubée 2 heures à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire adéquate couplé à la peroxydase et toujours dilué dans une solution TBS-t/lait. Après 3 lavages de 15 min au TBS-t et un lavage supplémentaire de 15 min au TBS, les protéines sont révélées par chimiluminescence (kit ECL, Amersham Pharmacia Biotech.).

Après révélation, la membrane peut, au besoin, être lavée et conservée à 4°C dans du TBS-t contenant 0,02% (p/v) d'azote de sodium ( $\text{NaN}_3$ ). Un nouvel anticorps primaire peut

alors être testé après un "stripping" de la membrane, que l'on incube 30 min à 50°C dans une solution contenant Tris/HCl 62,5mM,  $\beta$ -mercaptoéthanol 100mM et SDS 2% (p/v). Après de multiples lavages dans du TBS-t, permettant d'éliminer le  $\beta$ -mercaptoéthanol, la membrane est saturée puis de nouveau couplée avec le nouvel anticorps.

<b>Anticorps primaire</b>	<b>Type</b>	<b>Espèce</b>	<b>Dilution</b>	<b>Origine</b>
Anti-LRP	Polyclonal	Lapin	1/1000	Don du Dr D.K. Strickland University of Maryland School of Medicine, Rockville, USA #R2629
Anti-TSP1	Polyclonal	Lapin	1/4000	Laboratoire de Biochimie UFR Sciences de Reims
Anti-uPA	Monoclonal	Souris	1/100	Calbiochem réf. IM13L (Ab-1)
Anti-MMP2	Monoclonal	Souris	1/1000	Calbiochem réf IM33L (Ab-3)
Anti-PAI1	Polyclonal	Mouton	1/500	Boehringer Ingelheim Bioproducts
Anti-TIMP2	Monoclonal	Souris	1/1000	Calbiochem réf. IM11L (Ab-1)
Anti-VLDLR	Monoclonal	Souris	1/1000	Santa Cruz Biotech. réf. sc-18824 (6A6)

**Tableau 7: Caractéristiques des anticorps primaires utilisés**

Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase utilisés sont les IgG anti-lapin (Cell Signaling, réf. 7074, dilution au 1/2000), les IgG anti-souris (Amersham Bioscience, réf. RPN4201, dilution au 1/2000) et les IgG anti-mouton (Sigma, réf. A3415, dilution au 1/5000).

## **V-7 Analyses zymographiques**

### **V-7-1 Détection des gélatinases par zymographie sur gel de gélatine**

Cette technique permet de détecter la présence des formes latentes et actives des gélatinases A et B (ou MMP-2 et MMP-9) en incorporant de la gélatine, qui est le substrat de l'enzyme, dans un gel SDS-PAGE. Après séparation électrophorétique selon leur masse moléculaire et élimination du SDS, les protéases renaturées sont alors capables, en présence de calcium, de digérer la gélatine au niveau de leur site de migration. Les zones d'activités

gélatinolytiques apparaissent en clair sur fond bleu après coloration au bleu de Coomassie. Les formes latentes des enzymes peuvent être visualisées suite à l'action du SDS, qui permet de rendre accessible leur site actif sans provoquer le clivage de leur domaine N-terminal.

Quatre volumes d'échantillon sont mélangés à un volume de tampon Laemmli 5X non réducteur (sans  $\beta$ -mercaptoéthanol), puis déposés sur un gel SDS-PAGE à 10%, dont le gel de séparation contient 0,1% (v/v) de gélatine (Sigma). La migration est effectuée sous voltage constant de 120V à 4°C afin de préserver les activités protéolytiques. Après l'électrophorèse, le gel est rincé 2 fois 30 min dans une solution de Triton X-100 2,5% (v/v) afin d'éliminer le SDS présent et donc de renaturer les protéines. Il est ensuite incubé environ 16 heures à 37°C dans un tampon dit d'activation, contenant du calcium (Tris/HCl 50mM, NaCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM, Triton X-100 0,01% (v/v) pH 7,6). Le gel est enfin coloré au bleu de Coomassie (Bleu brillant de Coomassie R-250 0,5% (p/v), méthanol 45% (v/v), acide acétique 10% (v/v)) puis décoloré dans du tampon de décoloration (méthanol 25% (v/v), acide acétique 10% (v/v)) et fixé dans un tampon de fixation (acide acétique 5% (v/v), glycérol 5% (v/v)).

#### **V-7-2 Détection des activateurs du plasminogène par zymographie sur gel de fibrine/agarose**

La sécrétion des activateurs de plasminogène tPA et/ou uPA dans les milieux de culture conditionnés a été mise en évidence par une technique de zymographie sur gel d'empreinte décrite par Granelli-Piperno et Reich (1978) et plus récemment par Rondeau et coll. (1989). Deux gels sont réalisés successivement et posés l'un sur l'autre : un gel SDS-PAGE 10% dans lequel les échantillons ont migré et un gel de fibrine/agarose. Le fibrinogène incorporé dans le gel d'agarose est converti en fibrine sous l'action de la thrombine. La fibrine, additionnée de plasminogène, constitue le substrat des enzymes analysées. Le dispositif est placé dans une étuve à 37°C en atmosphère humide. Les zones de digestion de la fibrine apparaissent alors progressivement et leurs emplacements correspondent à l'activité fibrinolytique des activateurs du plasminogène.

Quatre volumes d'échantillon sont mélangés à un volume de tampon Laemmli 5X non réducteur, puis déposés sur un gel SDS-PAGE 10%. Après séparation électrophorétique et renaturation des protéines, le gel est rapidement lavé 3 fois à l'eau distillée puis déposé sur un gel de fibrine/agarose préparé au moins 1 heure à l'avance. Ce gel de fibrine/agarose est coulé entre 2 plaques de verre séparées par des espaceurs exactement comme un SDS-PAGE. Pour

le réaliser, d'un côté, 75mg de fibrinogène sont dissous dans 3,75mg d'eau, et de l'autre, 75mg d'agarose "Low Gelling Temperature" (Sigma) sont dissous dans 3,75mg d'eau sur une plaque chauffante et maintenus à 56°C dans un bain-marie. Dans le fibrinogène dissous sont ajoutés dans l'ordre, 5µl de Triton X-100 10% (v/v) pour faciliter le démoulage, et 50µl de Lys-plasminogène (Calbiochem) à 1mg/ml. Le fibrinogène est alors versé dans l'agarose à 56°C puis sont ajoutés 8,4µl de thrombine (Sigma) à 250U/ml. Le mélange est coulé rapidement entre 2 plaques, avant qu'il ne prenne en masse. L'agarose doit impérativement être gardé à 56°C : plus chaud, le fibrinogène coagule et plus froid, le mélange prend en masse trop vite. Après avoir été placé 30 min à température ambiante puis 30 min à 4°C, le gel de fibrine/agarose est démoulé de façon à ne reposer que sur une seule plaque de verre. Cette plaque est déposée sur du papier absorbant humidifié dans une boîte hermétique, le gel SDS-PAGE étant lui-même déposé sur celui de fibrine. Le dispositif est placé à 37°C pour laisser se développer la lyse. L'observation est effectuée sur un fond noir, les zones de digestion apparaissent translucides par rapport au reste du gel qui est opaque. Des témoins positifs tPA et uPA humain (Calbiochem) ont été déposés en parallèle.

## **VI- PURIFICATION DE TSP-1 A PARTIR DE PLAQUETTES SANGUINES HUMAINES**

L'utilisation de TSP-1 humaine purifiée nous a été nécessaire pour certains traitements cellulaires ou pour les tests d'invasion. Sachant que la thrombospondine-1 est sécrétée en grande quantité par les plaquettes du sang, activées par la thrombine, nous avons donc signé une convention avec le Centre de Transfusion Sanguine de la région Champagne-Ardenne afin de récupérer les lots de plaquettes humaine périmées et donc inutilisables pour la transfusion.

L'obtention de TSP-1 purifiée à partir des plaquettes se fait en 2 étapes : la première est le lavage et l'activation des plaquettes par la thrombine et la seconde est la purification de TSP-1 sur colonne d'affinité, à partir du surnageant d'activation.

Aussitôt reçues du Centre de Transfusion Sanguine, 10 volumes de plaquettes humaines sont mélangées dans 1 volume de tampon anti-coagulant (Acide citrique 38mM,

Citrate trisodique 75mM et Glucose 136mM, pH 5). Elles sont ensuite lavées 2 fois dans un tampon Acide citrique 35mM, Glucose 5mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Apyrase (Sigma) 25µg/ml et Prostaglandine E1 (Sigma) 100mM, pH 6,5). Les centrifugations sont effectuées à 1200g pendant 15 min à température ambiante et sans l'utilisation du frein. Le nombre de plaquettes est alors ajusté à  $2 \times 10^9$  par ml dans un tampon d'activation (Tris/HCl 20mM, NaCl 150mM et CaCl<sub>2</sub> 2mM, pH 7,6). L'agrégation plaquettaire est induite par l'addition de thrombine (Sigma) à 0,5mU/ml pendant environ 10 min, selon la rapidité de la réaction, à 37°C. La réaction est alors arrêtée grâce à un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Sigma) utilisé au 1/1000. Le mélange est placé à 4°C et 150mM de NaCl y sont ajoutés, en vue de la purification sur la colonne d'affinité. Enfin, les plaquettes agrégées sont sédimentées par centrifugation à 29 000g pendant 45 min à 4°C et le surnageant est soit immédiatement utilisé pour la purification de TSP-1, soit congelé à -80°C.

Dans une seconde étape, le surnageant d'activation ainsi obtenu est tout d'abord filtré à travers une membrane 0,45µm (Schleicher and Schull) et le filtrat est concentré à l'aide d'une membrane d'ultra-filtration ayant un seuil de coupure à 300 kDa (VWR International). Le filtrat concentré est alors injecté dans une colonne à héparine-sépharose HiTrap™ (Amersham Pharmacia Biotech). Cette colonne a été préalablement équilibrée avec un tampon Tris/HCl 20mM, NaCl 300mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, pH 7,6 et la TSP-1 est éluée avec le même tampon contenant 640mM NaCl. Les fractions du pic d'éluion sont rassemblées, concentrées sur une membrane possédant un seuil de coupure à 100 kDa et simultanément dialysées avec du PBS contenant 2mM NaCl. Toutes ces étapes sont effectuées à 4°C. Le degré de pureté est estimé par analyse sur SDS-PAGE et Western blot. L'absence de MMP-2 associée est vérifiée par analyse zymographique.

## VII- DOSAGE DE L'ACTIVITE PLASMINE

L'activité enzymatique *in vitro* de uPA dans les milieux de culture conditionnés des cellules, incubées en présence ou non de RAP, est déterminé par un test colorimétrique utilisant un substrat synthétique chromogène : le S-2251™ ou D-Val-Leu-Lys-p-Nitroanilide (Chromogenix). Les tests sont effectués dans un volume final de 200µl d'un milieu d'incubation Tris/HCl 100mM, Lys-plasminogène (Calbiochem) 30nM et le substrat S-2251™ 0,3mM, pH 7,8. La réaction est initiée par l'ajout d'une aliquote de milieu

conditionnés préalablement débarrassés du rouge de phénol par dia-filtration sur des cellules concentratrices Vivaspin™ (Vivascience AG) et l'ensemble est incubé à 37°C. Dans ce test, le clivage du substrat S-2251™ aboutit à la libération d'une molécule de p-Nitroaniline absorbant à 405nm. La variation d'absorbance est ainsi mesurée toutes les 10 min (model 550 Microplate Reader Bio-Rad™) jusqu'à la phase plateau, correspondant à l'épuisement du substrat. Les valeurs de DO ont été choisies à  $t = 90$  min d'incubation, dans la phase exponentielle.

## **VIII- IMMUNOMARQUAGE DE LRP ET TSP-1 A LA SURFACE DES CELLULES FTCs**

Des lamelles de microscopie (22x22mm) sont stérilisées à l'alcool 70° et passées à la flamme, puis sont placées dans plaques 6 puits. Chaque puits estensemencé à raison de  $5.10^5$  cellules (FTC-133) et  $2,5.10^5$  cellules (FTC-238). Les cellules sont ensuite incubées 24 heures dans leur milieu de culture avec sérum, puis lavées avec du PBS à 37°C et incubées avec du milieu sans sérum pendant 16 heures. Elles sont alors lavées 3 fois avec du PBS froid, puis fixées pendant 15 min à 4°C avec du paraformaldéhyde à 4% (p/v) dilué dans du PBS. Après 3 lavages de 5 min avec du PBS, la couche cellulaire est saturée pendant 30 min à température ambiante grâce à une solution de BSA à 3% (p/v) dilué dans du PBS. Là, dans un premier temps, les cellules sont incubées pendant 90 min à température ambiante avec un anticorps de lapin dirigé contre LRP (cf. tableau 7) dilué au 1/100 (10µg/ml) dans du PBS-BSA 3%, puis lavées 3 fois avec du PBS. Dans un second temps, elles sont incubées avec un anticorps de souris dirigé contre TSP-1 (Calbiochem, réf. BA24) dilué au 1/10 (10µg/ml) dans du PBS-BSA 3% et à nouveau lavées 3 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure et à l'abri de la lumière avec un anticorps anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 568 (fluorescent dans le rouge, Molecular Probes, réf. A-11036) dilué au 1/500 (4µg/ml) dans du PBS-BSA 3%. Après 3 lavages au PBS, elles sont incubées à nouveau pendant 1 heure et dans l'obscurité avec un anticorps anti-souris couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 488 (fluorescent dans le vert, Molecular Probe, réf. A-11001) dilué au 1/500 (4µg/ml), puis lavées 3 fois au PBS.

Quelques gouttes de Citifluor® AF1 (Agar Scientific) sont déposées sur des lames de microscope. Cet agent permet de ralentir la perte de fluorescence des fluorophores. Puis,

chaque lamelle est extraite des puits de plaques de culture et est placée sur une lame de façon à avoir la face comprenant les cellules au contact du Citifluor AF1. Cette lame est lutée avec du vernis à ongles et les cellules sont observées par fluorescence avec un microscope confocal Bio-Rad 1024S.

## **IX- ZYMOGRAPHIE IN SITU AVEC SUBSTRATS FLUOROGENIQUES**

Les activités gélatinase et plasmine sont mises en évidence *in situ* sur les cellules non fixées, en utilisant respectivement la DQ-gélatine ou la BODIPY TR-X caséine, comme substrat (EnzChek ; Molecular Probes, Eugene, OR). [Frederiks et Mook, 2004]

Des lamelles de microscopie (22x22mm) sont stérilisées à l'alcool 70° et passées à la flamme, puis sont placées dans les plaques 6 puits. Chaque puits estensemencé à raison de  $5.10^5$  cellules (FTC-133) et  $2,5.10^5$  cellules (FTC-238). La DQ-gélatine et la BODIPY TR-X caséine sont dissoutes à la concentration de 1mg/ml dans de l'eau distillée, puis diluées au 1/10 dans 1% (p/v) d'agarose "Low Gelling Temperature" dans du PBS. Quelques gouttes de ce mélange (40µl) sont déposées sur des lames de verre. Chaque lamelle est extraite des puits de plaque de culture et est placée sur la lame de verre de façon à avoir la face comprenant les cellules au contact du mélange agarose-substrat. Après la gélification de l'agarose à 4°C, le montage est incubé à 37°C pendant 1 heure. Les produits de dégradation fluorescents sont observés grâce à un microscope inversé Nikon TE300 à un objectif x40.

La fluorescence de la FITC (pour la DQ-gélatine) est détectée avec une excitation à 460-500nm et une émission à 512-542nm (vert). Le Texas Red (pour la TR-X caséine) est détecté approximativement avec une excitation à 590nm et une émission à 620nm (rouge foncé).

La spécificité de l'activité gélatinase, conséquence de l'activité de MMP2, est déterminée par l'utilisation de 20nM EDTA (Sigma) ou 20ng/ml TIMP2 (Calbiochem). Celle de l'activité caséinolytique, conséquence de l'activité d'uPA, est déterminée par l'utilisation de 100µg/ml d'aprotinine (Sigma) ou 20µg/ml d'anti-uPA neutralisant (American Diagnostica Inc.). C'est à dire que les cellules sont pré-incubées 1 heure à 37°C, en présence des différents inhibiteurs dilués dans du PBS. Ensuite, les incubations avec les substrats fluorescents sont réalisées comme précédemment décrit en présence des inhibiteurs.

La présence d'auto-fluorescence dans les cellules est testée en les incubant dans de l'agarose dépourvue de substrats fluorescent.

## **X- EXPRESSION DES RESULTATS**

Pour les expériences de RT-PCR ou de Western blot, l'intensité des signaux fluorescents ou autoradiographiques est mesurée par densitométrie (GS-670 Imaging Densitometer, Bio-Rad). Les valeurs sont obtenues à partir de trois expériences indépendantes au minimum.

Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne des données obtenues à partir de trois expériences indépendantes au minimum. Les valeurs moyennes sont exprimées avec l'écart standard à la moyenne (SEM). Le test Student a été utilisé pour l'étude statistique des résultats obtenus ( $p < 0,01$ )

Les images montrées sont représentatives des triplicatas que nous avons réalisés.

# *Résultats*

**A-Etude du rôle de TSP-1 dans le  
potentiel invasif des cellules FTC.**

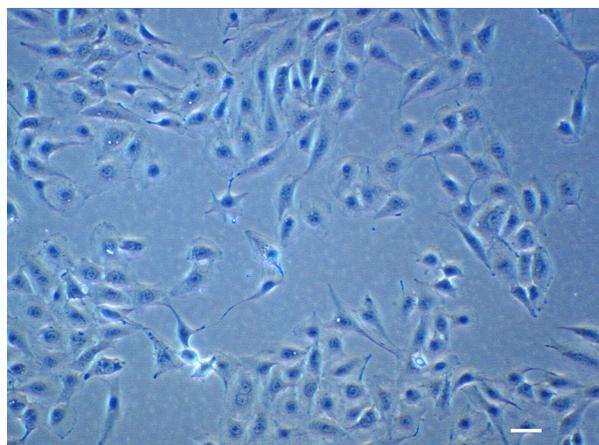
## **I-Corrélation de l'expression de TSP-1 par les cellules FTC avec leur potentiel invasif.**

### **I-1 Le pouvoir invasif différentiel des cellules FTC-133 et FTC-238.**

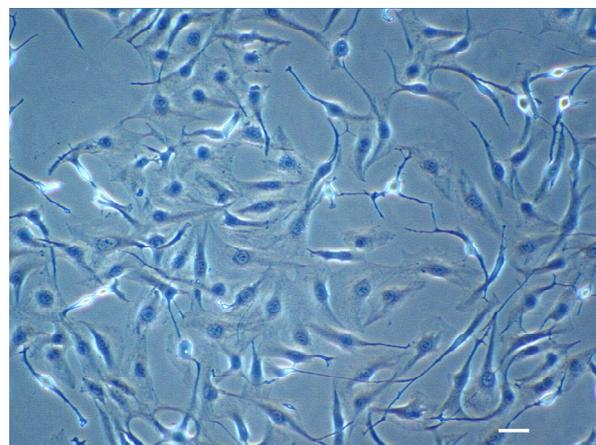
Nous avons choisi d'utiliser pour notre analyse des mécanismes de la progression tumorale, deux lignées cellulaires issues d'un même patient mais possédant des potentiels métastatiques, et donc invasifs, différents. Les cellules FTC-133 ont été décrites dans la littérature comme étant moins invasives *in vitro* que les FTC-238 (Cf. *Matériel et Méthodes, paragraphe I*).

Lorsqu'on observe ces deux lignées cellulaires par microscopie inverse en contraste de phase, on distingue aussitôt une nette différence de morphologie (figure 22). En effet, les cellules FTC-133 sont de plus petite taille, avec un noyau relativement volumineux et peu de cytoplasme. De plus, elles présentent une forme polygonale de type épithéliale. Les cellules FTC-238 sont de plus grande taille et possèdent une forme plus étoilée. Elles projettent, en effet, de nombreux pseudopodes laissant présager un pouvoir migratoire plus important.

**FTC-133**



**FTC-238**

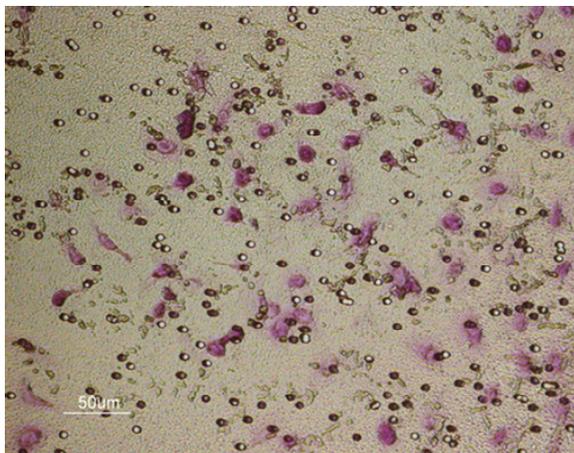


**Figure 22 :** Observation des cellules FTC-133 et FTC-238 en microscopie inverse à contraste de phase. Les cellules ont été micro-photographiées à l'objectif x10. La barre blanche représente 20µm.

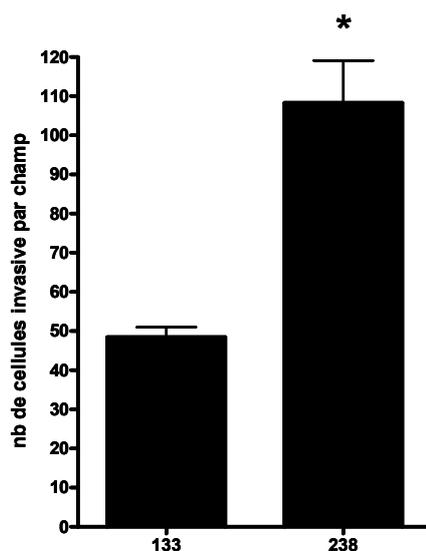
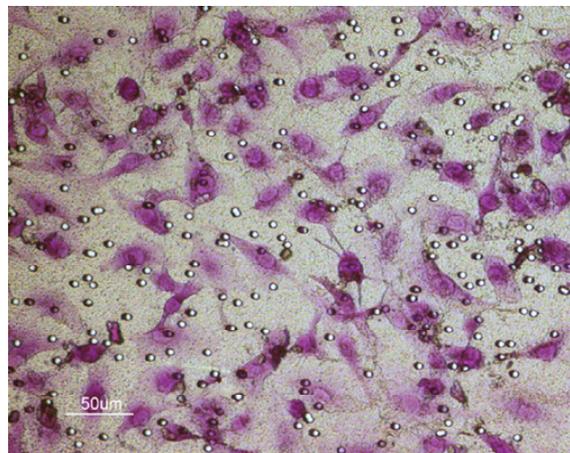
Nous avons voulu vérifier si la différence de propriété invasive préalablement décrite entre les deux lignées cellulaires pouvait également être observée dans nos conditions expérimentales et surtout connaître quel était l'amplitude de l'écart du pouvoir invasif entre

ces deux lignées. Pour cela, nous avons réalisé des tests d'invasion en chambres de Boyden modifiées, appelées Transwell™ (figure 23).

FTC-133



FTC-238



**Figure 23 :** Le pouvoir invasif des cellules FTC-133 et FTC-238. Les cellules ( $2.10^4$ ) sont ensemencées dans la partie supérieure de puits de Transwell recouverts avec  $40\mu\text{g/ml}$  de Matrigel, puis sont incubées en étuve à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24h. Les cellules n'ayant pas traversé la membrane sont retirées. Les cellules ayant pénétré à travers le Matrigel et traversé la membrane sont alors fixées au méthanol et colorées au Crystal violet. Les cellules sont microphotographiées à l'objectif x20, puis comptées à raison de 3 champs par puits et chaque expérience est réalisée en triplicata. Les résultats sont présentés sous forme de la moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0,01$  vs cellules FTC-133.

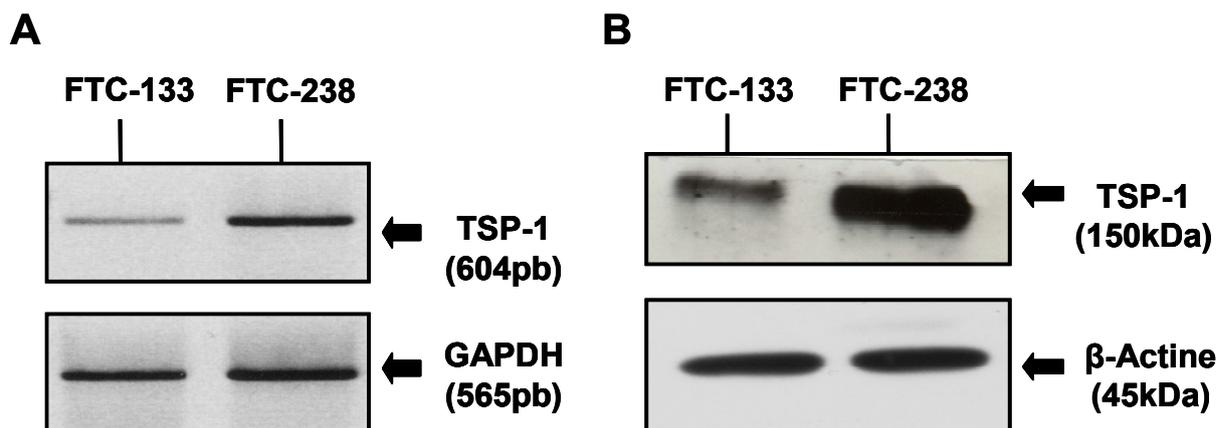
Les cellules sont ensemencées dans le compartiment supérieur des Transwell, puis sont incubées à 37°C pendant la durée du test, c'est à dire 24h. L'analyse par microscopie inversée à contraste de phase montre que les cellules FTC-238 sont effectivement sensiblement plus invasives que les FTC-133. En effet, après comptage, deux fois plus de cellules FTC-238 ont traversé le Matrigel que de cellules FTC-133 ( $48,5 \pm 2,5$  cellules FTC-133 par champ contre  $108,3 \pm 10,7$  cellules FTC-238).

### **I-2 L'expression différentielle de TSP-1 par les cellules FTC-133 et FTC-238.**

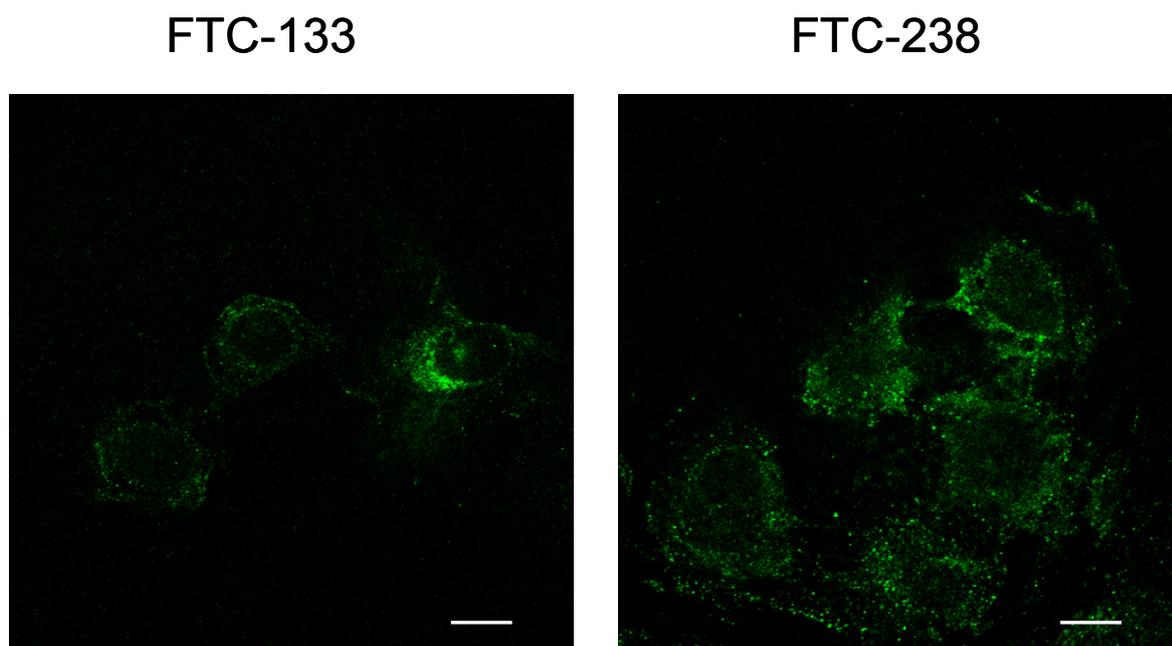
Comme précédemment décrit dans l'introduction, le rôle de TSP-1 reste à ce jour assez controversé dans l'adhérence et l'invasion cellulaire. Par exemple, divers travaux ont décrit des propriétés adhésives [Tuszynski et Kowalska, 1991] et anti-adhésives [Lahav, 1988] de TSP-1 sur les plaquettes. Selon Murphy-Ullrich en 2001, un fort état adhésif caractérise des cellules différenciées et quiescentes, alors qu'une faible adhérence caractérise la cicatrisation ou le remodelage tissulaire dans les situations pathologiques.

Nous avons observé une nette différence de morphologie entre les cellules FTC-133, peu invasives, et les cellules FTC-238, hautement invasives (figure 22). Or, TSP-1 possède justement des propriétés de régulation du cytosquelette d'actine. En effet, la propagation et la migration cellulaire sur substrat de TSP-1 sont clairement associées avec une organisation distincte du cytosquelette cortical, qui implique la formation de grands lamellipodes avec des prolongements riches en fascine [Adams, 1995, 1997]. Aucune étude n'ayant été publiée sur notre modèle cellulaire, nous nous sommes donc intéressés au profil d'expression de cette protéine matricellulaire dans nos deux lignées cellulaires, aussi bien au niveau des ARNm qu'au niveau protéique (figure 24).

L'analyse par RT-PCR montre une quantité supérieure de transcrits codant pour TSP-1 dans les cellules hautement invasives FTC-238 (figure 24A). Cette augmentation est accompagnée d'une accumulation encore plus nette de la protéine dans le milieu conditionné de ces cellules (figure 24B). Ainsi, les cellules FTC-238 expriment et accumulent sur 24h, dans leur milieu de culture, beaucoup plus de TSP-1 que les cellules FTC-133.



**Figure 24 :** La différence d'expression de TSP-1 dans les cellules FTC-133 et FTC-238. (A), analyse par RT-PCR de l'expression des ARNm codant pour TSP-1 et GAPDH par les cellules FTC. (B), des quantités égales de protéines de milieux conditionnés 24h sans SVF sont analysées par western blot avec un anticorps dirigé contre TSP-1. Les cellules, desquelles proviennent les milieux conditionnés, sont lysées et un volume égal est analysé par western blot avec un anticorps anti- $\beta$ -actine. Ceci servant de contrôle de charge.



**Figure 25 :** Analyse en microscopie confocale du marquage immunofluorescent de TSP-1. Après une mise au repos de 16h, les cellules FTC sont fixées au paraformaldéhyde puis le marquage de TSP-1 (grâce à un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 488, fluoresceant dans le vert) est étudié par microscopie confocale. La barre blanche représente 10 $\mu$ m.

Ces observations sont confirmées par immunofluorescence (figure 25). L'analyse par microscopie confocale des cellules immunomarquées à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris dirigé contre TSP-1 permet de mettre en évidence une plus forte expression de la protéine TSP-1 au sein des cellules FTC-238.

Les cellules les plus invasives présentent donc un plus grand taux de transcription des ARNm codant pour TSP-1 et une plus grande synthèse de la protéine, ainsi qu'une plus grande sécrétion de celle-ci dans leur milieu péricellulaire. Nous pouvons imaginer que cette différence d'expression et de sécrétion de TSP-1 entraîne une modification des propriétés adhésives et migratoires des cellules FTC-238. Cette différence est-elle un des phénomènes responsables du caractère invasif de cette lignée cellulaire ? C'est ce que nous allons tenter de mettre en évidence au cours de cette étude.

## **II-Rôle de TSP-1 dans le pouvoir invasif des cellules FTC.**

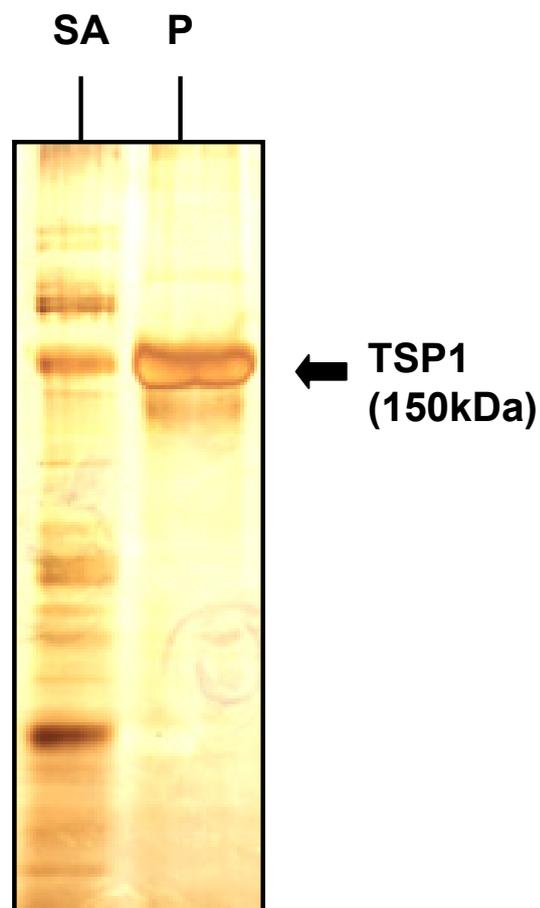
Afin de savoir si TSP-1 est impliquée dans le potentiel invasif des cellules FTC, nous devons procéder à des tests d'invasion *in vitro* en Transwell, dans lesquels nous traiterions les cellules avec de la TSP-1 en solution. Nous avons ainsi choisi de purifier la TSP-1 à partir de plaquettes humaines afin d'en disposer en assez grande quantité.

### **II-1 Purification de TSP-1.**

Une convention signée entre le laboratoire et le Centre de Transfusion Sanguine de la région Champagne-Ardenne nous a permis de récupérer des poches de plaquettes humaines devenues inutilisables pour la transfusion sanguine.

Ces plaquettes sont lavées puis activées par de la thrombine afin qu'elles libèrent de la TSP-1. Elles sont ensuite éliminées par centrifugation et le surnageant d'activation contenant de la TSP-1 est chargé sur une colonne d'héparine-sépharose. La TSP-1 retenue sur cette colonne d'affinité est alors éluée avec 640mM de NaCl.

Le surnageant d'activation avant purification et la fraction purifiée sur héparine-sépharose sont analysés par SDS-PAGE (figure 26). Nous nous sommes également assurés, par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre TSP-1, de la spécificité de la protéine purifiée. Cette fraction purifiée sera utilisée pour tous les futurs traitements cellulaires à TSP-1.



**Figure 26 :** Purification de TSP-1 sur colonne d'affinité à partir du surnageant d'activation plaquettaire. La TSP-1 est purifiée sur colonne d'héparine-sépharose à partir de plaquettes humaines activées à la thrombine, puis est analysée sur gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent. SA, surnageant d'activation brut ; P, fraction purifiée.

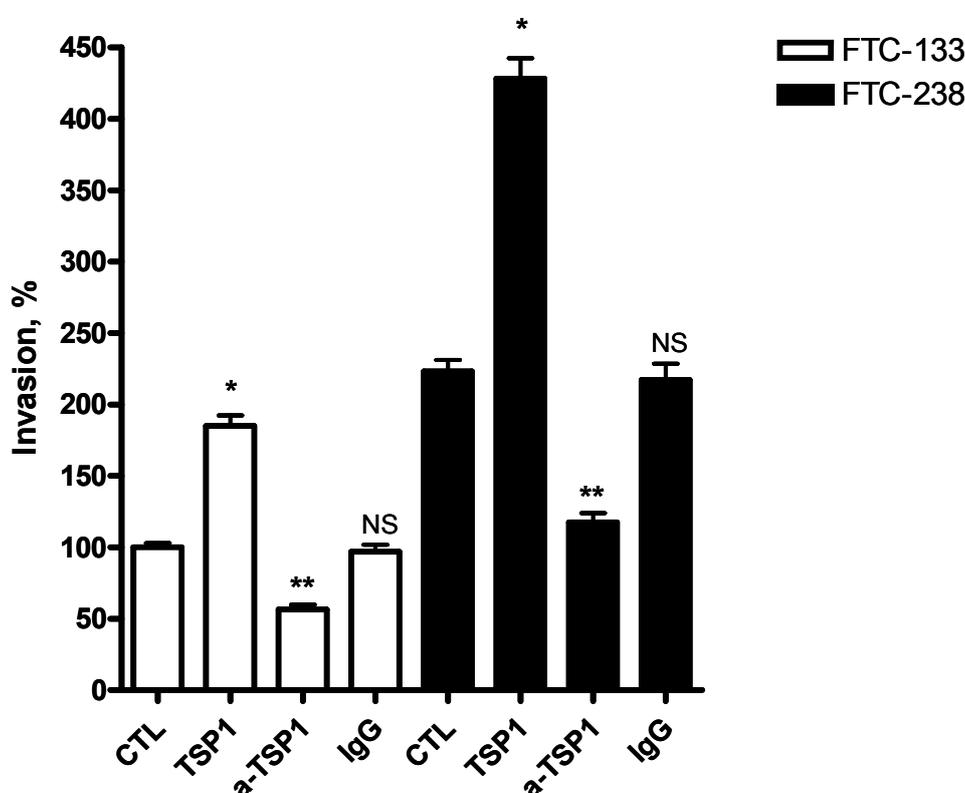
## II-2 Tests d'invasion *in vitro*.

Afin de mettre en évidence le rôle de TSP-1 dans la régulation du potentiel invasif des cellules FTC, nous avons procédé à des tests d'invasion en Transwell sur 24h, au cours desquels nous avons traité les cellules avec de la TSP-1 en solution (50µg/ml) ou avec l'anticorps monoclonal neutralisant dirigé contre TSP-1 (30µg/ml) (figure 27). Des IgG de souris sont utilisés comme contrôle de spécificité des traitements anti-TSP-1.

Le traitement des cellules FTC par de la TSP-1 en solution induit une augmentation du pouvoir invasif d'un facteur 2 pour les deux lignées cellulaires. En revanche, lorsque ces

cellules sont traitées avec l'anticorps neutralisant dirigé contre TSP-1, leur pouvoir invasif est inhibé d'un facteur 2 également par rapport à leur contrôle respectif, c'est à dire les cellules traitées avec des IgG de souris non spécifiques.

Ainsi, TSP-1 induit une augmentation du potentiel invasif des cellules FTC, alors que sa neutralisation entraîne une diminution de ce potentiel. TSP-1 semble donc bien jouer un rôle effectif dans la régulation du pouvoir invasif des cellules FTC. L'augmentation d'expression de TSP-1 pourrait donc constituer un des événements majeurs impliqués dans l'acquisition du phénotype hautement invasif des cellules FTC-238.



**Figure 27 :** Effet de TSP-1 sur le potentiel invasif des cellules FTC. Les cellules ( $2.10^4$ ) sontensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec  $40\mu\text{g/ml}$  de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h avec  $50\mu\text{g/ml}$  de TSP-1,  $30\mu\text{g/ml}$  d'IgG anti-TSP-1 ou d'IgG non spécifiques (contrôle IgG). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes exprimées en pourcentages  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, par rapport au contrôle FTC-133 non traitées, étalonné à 100%. \*,  $P < 0,01$  vs cellules non traitées (CTL). \*\*,  $P < 0,01$  vs cellules traitées aux IgG. NS, non significatif vs cellules non traitées (CTL).

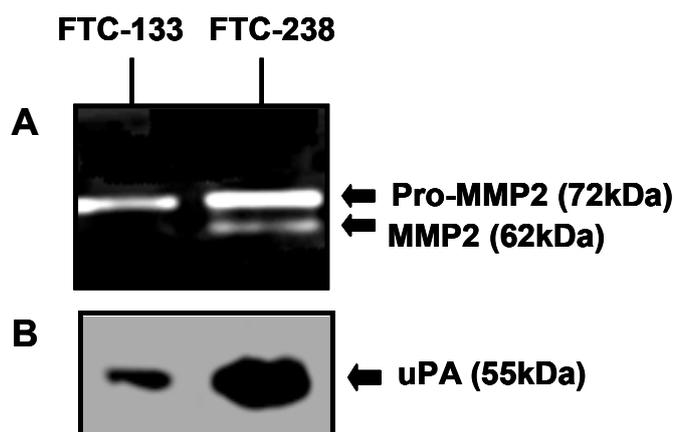
### **III-Analyse des profils d'expression et d'activité des protéases MMP2 et uPA ainsi que de leurs inhibiteurs.**

La fonction adhésive et migratoire de TSP-1 est fortement reliée à son implication dans la protéolyse péricellulaire associée à l'invasion tumorale. TSP-1 est capable de lier différentes protéases, telles qu'uPA [Silverstein et coll., 1990] et MMP2 [Bein et Simons, 2000]. Elle inhibe les activités plasmine et urokinase [Hosokawa et coll., 1993], mais les complexes formés avec ces enzymes peuvent aussi être actifs. Ainsi, TSP-1 produite dans les cellules tumorales mammaires induit l'invasion tumorale en stimulant l'expression de uPA et de son récepteur uPAR [Albo et coll., 1997 ; Albo et coll., 2000]. D'autre part, il a été également démontré la nature inhibitrice de l'interaction TSP-1 et MMP2.

En vertu du rôle important de TSP-1 dans la régulation de ces cascades protéolytiques matricielles, et afin de comprendre par quels mécanismes cette protéine matricellaire pourrait influencer le caractère invasif des cellules FTC, nous avons décidé d'analyser et de comparer, dans nos deux lignées cellulaires, les niveaux d'expression des deux principaux systèmes enzymatiques de la matrice, à savoir les gélatinases et les activateurs de plasminogène. En effet ceux-ci sont fortement impliqués dans le remaniement matriciel lors de la tumorigenèse.

#### **III-1 Analyse protéolytique des milieux conditionnés par zymographie.**

L'analyse par zymographie sur gel de gélatine montre une accumulation plus importante de MMP2 (ou gélatinase A) dans le milieu conditionné des cellules FTC-238 (figure 28A). De plus, la forme active de MMP2 y est révélée, alors qu'elle est difficilement détectable dans celui des cellules FTC-133 moins invasives. La seconde gélatinase, à savoir MMP9 (ou gélatinase B), reste en revanche indétectable, dans nos conditions expérimentales, dans les milieux de culture des deux lignées cellulaires.



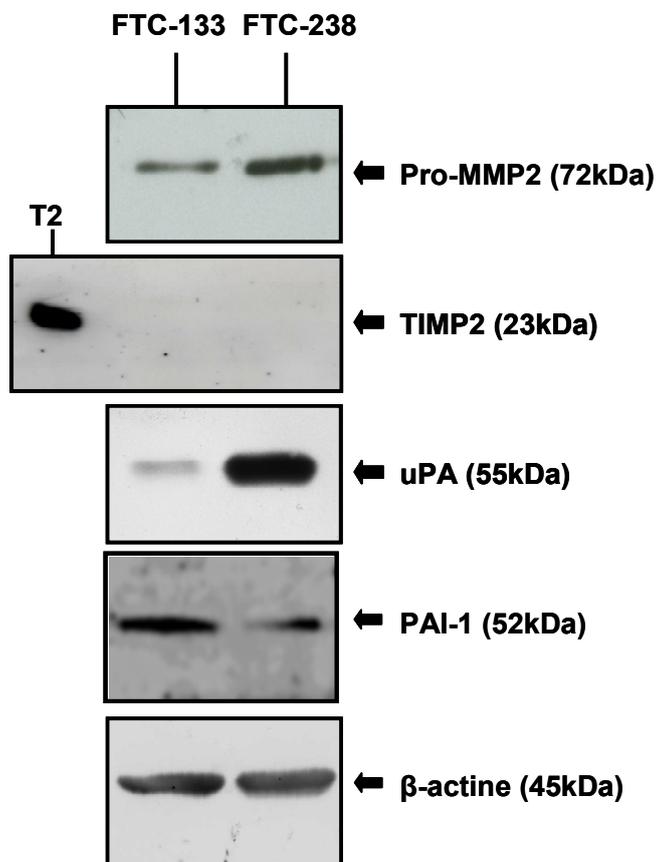
**Figure 28 :** Analyse protéolytique des milieux conditionnés des cellules FTC par zymographie. Des quantités égales de protéines des milieux conditionnés 24h sans SVF sont analysées par zymographie sur gel de gélatine (A) ou de fibrine/agarose (B) en conditions non-réductrices, afin de mettre en évidence, respectivement, les gélatinases et les activateurs de plasminogène, dans les deux lignées cellulaires.

L'analyse par zymographie sur gel de fibrine/agarose montre également une nette augmentation de l'accumulation d'uPA dans le milieu conditionné des cellules FTC-238, comparé à celui des FTC-133 (figure 28B). Les formes zymogène et active d'uPA étant de la même masse moléculaire, il est malheureusement impossible par cette technique de connaître les proportions de chacune de ces formes. Il convient de remarquer qu'aucune de ces deux lignées cellulaires n'exprime, ou du moins, ne sécrète la forme tPA.

### III-2 Analyse protéique des milieux conditionnés par western blot

Afin de confirmer les précédentes observations, fondées exclusivement sur la mise en évidence des activités protéolytiques de MMP2 et d'uPA, nous avons voulu également caractériser ces deux protéases, ainsi que leurs inhibiteurs respectifs TIMP2 et PAI-1, par immuno-détection (figure 29).

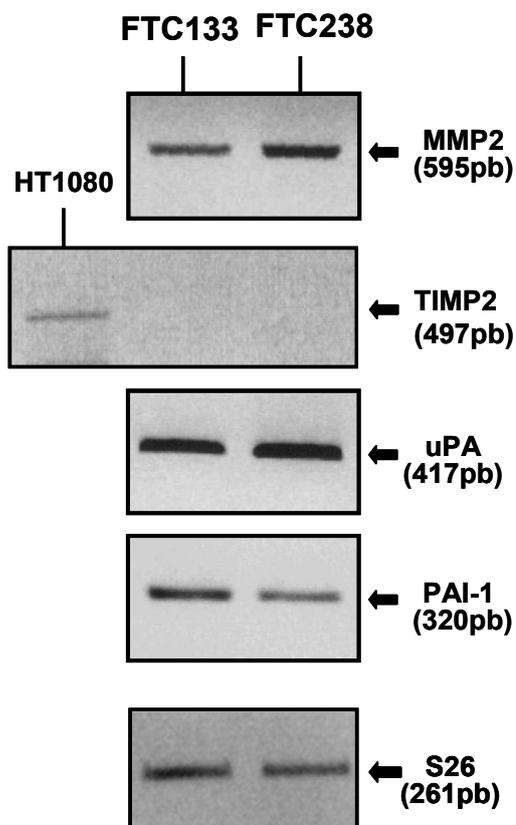
Les expériences de western blot utilisant les anticorps anti-MMP2 et anti-uPA confirment ce que nous avons observé grâce aux expériences de zymographie, à savoir que les cellules FTC-238 présentent une accumulation plus importante de MMP2 et surtout d'uPA dans leur milieu conditionné. En ce qui concerne les inhibiteurs respectifs de ces protéases, nous ne détectons pas la présence de TIMP2 dans les milieux conditionnés des deux lignées cellulaires. En revanche, nous parvenons à mettre en évidence que les cellules FTC-238 sécrètent sensiblement moins de PAI-1, comparées aux cellules FTC-133.



**Figure 29 :** Analyse des niveaux de sécrétion des protéases MMP2 et uPA, ainsi que de leurs inhibiteurs respectifs TIMP2 et PAI-1. Des quantités égales de protéines de milieu conditionnés 24h sans SVF sont analysées par western blot avec des anticorps dirigés contre MMP2, TIMP2, uPA et PAI-1. La piste "T2" du film TIMP2 correspond au dépôt de la protéine TIMP2 recombinante et sert de témoin positif. Les cellules, qui correspondent aux différents milieux conditionnés étudiés, sont lysées et un volume égal est analysé par western blot avec un anticorps anti- $\beta$ -actine, servant de contrôle de charge.

### III-3 Analyse de l'expression des ARNm par RT-PCR.

Afin de savoir s'il y a une corrélation entre les taux de protéines sécrétées et l'expression des gènes codant pour celles-ci, nous avons procédé à des expériences de RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de MMP2, TIMP2, uPA et PAI-1 (figure 30).



**Figure 30 :** Analyse du profil d'expression des ARNm codant pour MMP2, TIMP2, uPA et PAI-1 dans les cellules FTC-133 et FTC-238. La piste HT1080 correspond à l'analyse d'ARNm extrait de cellules fibroblastiques HT1080 et sert de contrôle positif. L'utilisation de primers spécifiques de S26 sert de contrôle interne.

Il apparaît que les cellules FTC-238 présentent un taux d'expression d'ARNm codant pour la MMP2 plus élevé que celui des cellules FTC-133. En ce qui concerne son inhibiteur TIMP2, tout comme au niveau protéique, il nous a été impossible de mettre en évidence la présence de transcrits dans ces deux lignées. Il semble donc que ni les cellules FTC-133, ni les cellules FTC-238 n'expriment TIMP2 dans nos conditions expérimentales.

Pour uPA et son inhibiteur PAI-1, la situation apparaît bien différente. En effet, contrairement à MMP2, dont la sécrétion dans le milieu de culture semble être directement corrélée à son taux de transcription, l'expression des ARNm codants pour uPA reste sensiblement identique entre les deux lignées cellulaires. Ainsi, la nette accumulation de la protéase dans le milieu conditionné des cellules FTC-238 ne semble pas due à une

augmentation de son expression. Elle pourrait plutôt être la conséquence d'un déficit de son catabolisme. En revanche, l'expression des messagers codant pour PAI-1 est bien corrélée aux taux de protéine observés dans les milieux conditionnés des lignées cellulaires : les cellules FTC-238 expriment moins de PAI-1 que les cellules FTC-133.

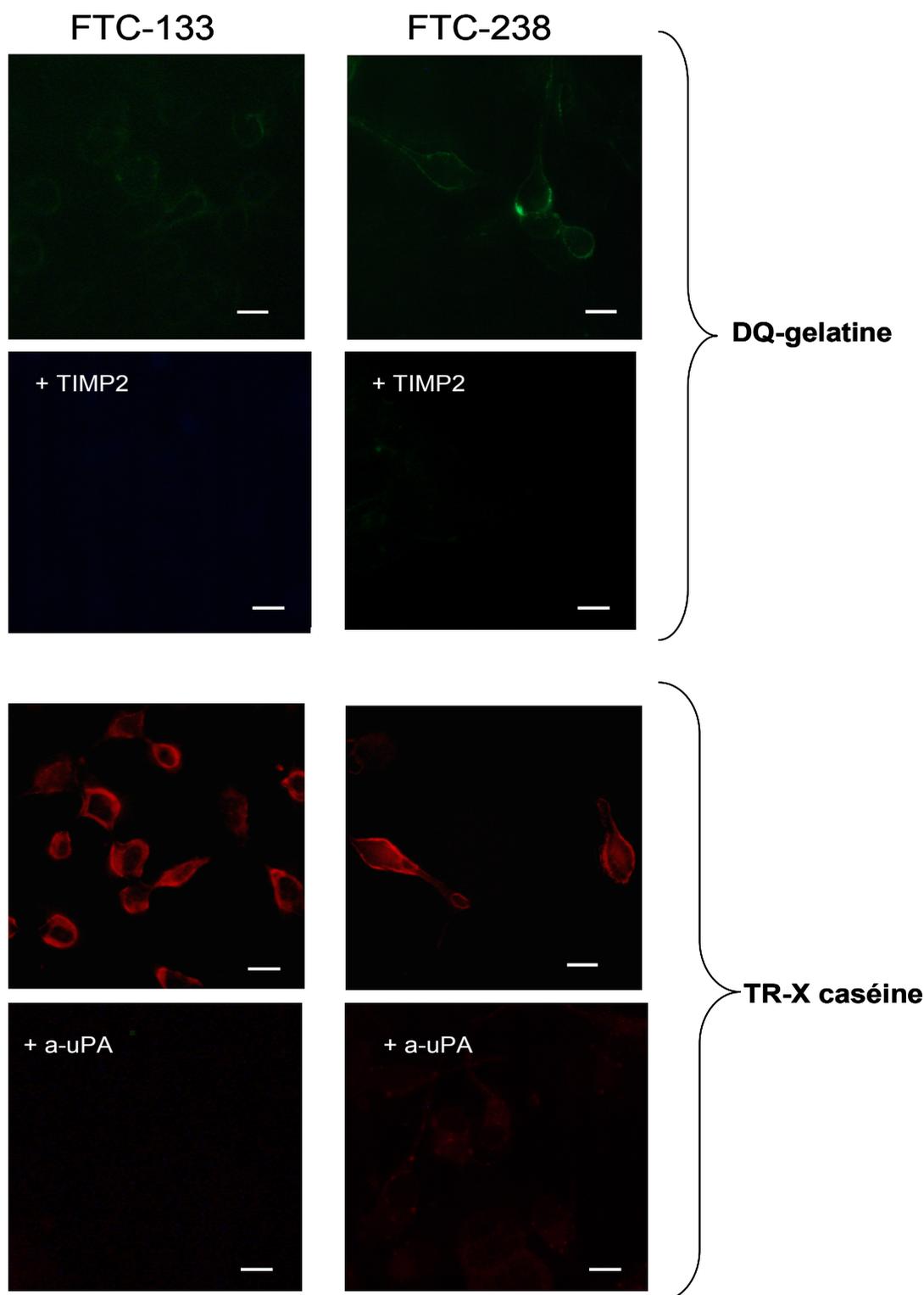
#### **III-4 Localisation *In Situ* des activités gélatinase et plasmine.**

Afin d'effectuer une analyse microscopique cellulaire des activités protéolytiques de MMP2 et uPA, nous avons procédé à des expériences de zymographie *in situ* en utilisant des substrats marqués par fluorescence (figure 31).

Les cellules non fixées sont incubées soit avec de la DQ-gélatine, soit avec de la TR-X-caséine additionnée de Lys-plasminogène. Les produits de dégradation de la DQ-gélatine issus de l'activité gélatinase des cellules présente une fluorescence verte, alors que ceux de la TR-X-caséine issus de l'activité plasmine (reflet de l'activité uPA) présentent une fluorescence rouge. Dans le but de s'assurer de la spécificité des signaux obtenus, les cellules ont également été co-incubées avec des inhibiteurs spécifiques des deux protéases étudiées, à savoir soit TIMP2 pour l'activité gélatinase, soit l'anticorps neutralisant anti-uPA (cf. *Résultats, Chap. V-1*) pour l'activité plasmine (Cf. *Matériel et Méthodes, chap. IX*).

Conformément à ce que nous avons pu observer par zymographie sur gel de gélatine (figure 25A), les cellules FTC-133 présentent une très faible activité gélatinase. Le signal est difficilement détectable. En revanche, les cellules FTC-238 montrent un signal plus fort et très localisé en certains endroits de la membrane plasmique. En ce qui concerne les activités uPA, alors que les cellules FTC-133 présentent un signal plutôt diffus au niveau de la membrane plasmique et dans le cytoplasme, les cellules FTC-238 présentent une répartition de l'activité uPA plus localisée et intense au niveau péricellulaire.

En conclusion, les cellules FTC-133 présentent une très faible activité MMP2 et une activité uPA assez diffuse, alors que les cellules FTC-238 présentent des activités MMP2 et uPA plus importantes et plus localisées à leurs surfaces cellulaires.

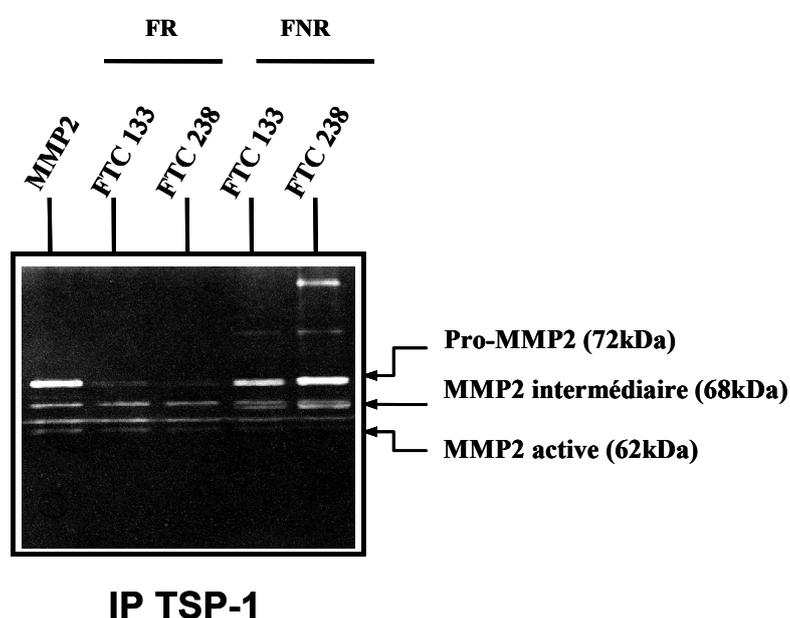


**Figure 31 :** Analyse microscopique de la localisation in situ des activités gélatinase et plasmine dans les cellules FTC. Les activités gélatinase et plasmine sont mises en évidence sur les cellules FTC-133 (panel de gauche) et FTC-238 (panel de droite) non fixées, en utilisant respectivement la DQ-gélatine (haut) et le TR-X-caséine (bas) comme substrats fluorogéniques. La fluorescence verte générée par l'activité gélatinase et la fluorescence rouge générée par l'activité plasmine sont concentrées aux membranes plasmiques des cellules FTC. Les lamelles co-traitées avec TIMP2 ou anti-uPA servent de contrôle de spécificité. La barre blanche représente 10 $\mu$ m.

#### **IV-Etude des interactions moléculaires entre TSP-1, MM2 et uPA.**

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre précédent, MMP2 et uPA sont décrits dans la littérature comme étant capables d'interagir directement avec TSP-1. Ces interactions ont la particularité de réguler positivement ou négativement l'expression et l'activité de ces protéases matricielles selon le modèle et le contexte cellulaire. Afin d'approfondir notre étude sur le rôle de TSP-1 dans l'expression, l'accumulation et l'activation, observée précédemment des deux protéases, nous avons voulu nous assurer que ce type d'interactions existait dans notre modèle cellulaire.

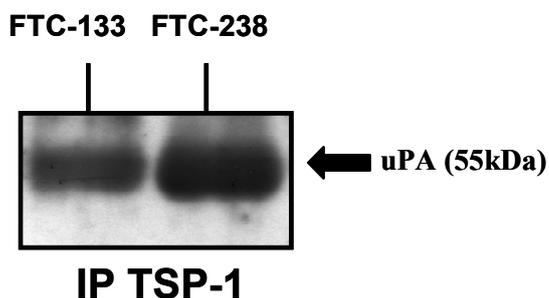
Pour cela, nous avons procédé à des expériences d'immunoprécipitation. A l'aide de l'anticorps de lapin anti-TSP-1, nous avons immunoprécipité la protéine matricellulaire dans des conditions permettant de sauvegarder les interactions moléculaires. Puis nous avons analysé par zymographie sur gel de gélatine les fractions protéiques retenues et non retenues avec le complexe immun (figure 32).



**Figure 32 :** Les formes active et intermédiaire de MMP2 sont en interaction avec TSP-1 dans les milieux conditionnés des cellules FTC. Des extraits de milieux conditionnés sont assujettis à des expériences de co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-TSP-1. Les fractions retenues (FR) et non retenues (FNR) sont analysées par zymographie sur gel de gélatine.

Nous montrons ainsi que la forme active et intermédiaire de MMP2 est partiellement co-précipitée avec TSP-1. En effet, nous retrouvons cette forme active et intermédiaire dans la fraction retenue (FR) et dans la fraction non retenue (FNR). Par contre, la forme zymogène est très faiblement retenue avec le complexe immun. Nous ne la retrouvons essentiellement que dans la fraction non retenue. Ainsi, seules les formes mature et intermédiaire de MMP2 sont capables d'interagir efficacement avec TSP-1 dans nos conditions expérimentales. Il est à noter que la forme intermédiaire de MMP2 n'est pas systématiquement observée dans les milieux conditionnés des cellules FTC. En effet, elle apparaît parfois selon des conditions que nous ne contrôlons pas.

Nous avons ensuite analysé la fraction protéique retenue par western blot en utilisant un anticorps de souris dirigé contre uPA (figure 33). Nous montrons que cette protéase matricielle est co-précipitée avec TSP-1. uPA est donc également capable d'interagir avec la protéine matricellaire dans le milieu de culture.



**Figure 33:** uPA est capable de former un complexe moléculaire avec TSP-1 dans les milieux de culture des cellules FTC. Des extraits de milieux conditionnés sont assujettis à des expériences de co-immunoprécipitation avec un anticorps de lapin anti-TSP-1. Les fractions retenues sont analysées par western blot avec un anticorps de souris anti-uPA.

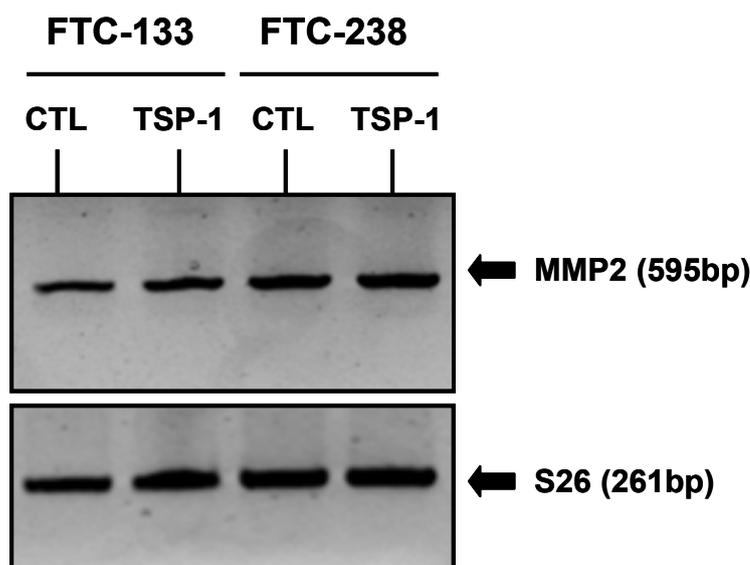
Ainsi, conformément à ce qui avait été décrit dans la littérature pour d'autres modèles cellulaires, TSP-1 est capable de former des complexes avec MMP2 et uPA dans les milieux conditionnés de nos deux lignées cellulaires. Ces observations peuvent nous laisser penser que TSP-1 jouerait un rôle dans le potentiel invasif des cellules FTC en régulant l'expression et/ou l'activation d'une ou de ces deux protéases matricielles.

## V-Rôle de TSP-1 dans l'expression et l'activation de MMP2.

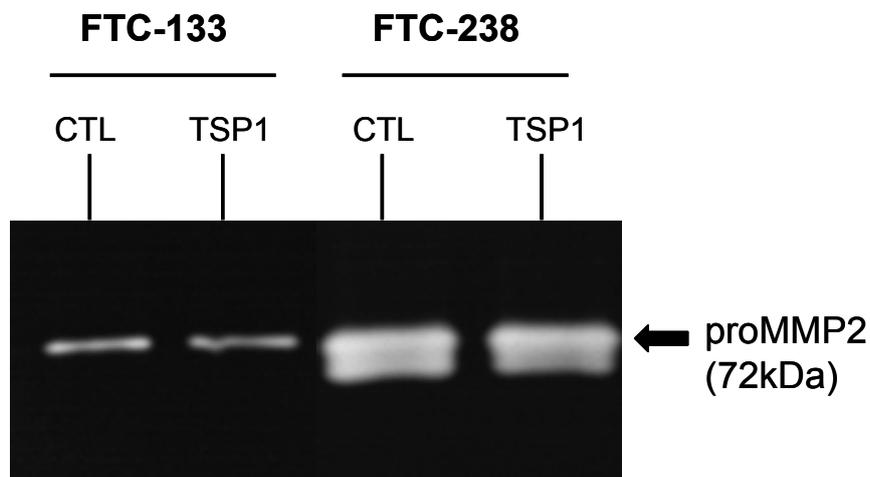
### V-1 Effet de TSP-1 exogène sur l'expression et l'activation de MMP2 des cellules FTC.

Nous avons observé une plus forte accumulation et activation de MMP2 dans le milieu conditionné des cellules FTC-238 (figures 28-29), en comparaison à celui des cellules FTC-133, ainsi qu'une plus grande expression génique (figure 30). Afin de déterminer si cette différence d'expression et d'activation de MMP2 est une conséquence de la plus forte expression de TSP-1 par ces cellules, nous avons traité les deux lignées cellulaires avec 50µg/ml de TSP-1 en solution, pendant 24h, puis avons analysé l'expression des transcrits MMP2 par RT-PCR (figure 34) ainsi que l'accumulation de la protéase dans les milieux conditionnés par zymographie sur gel de gélatine (figure 35).

Le traitement par TSP-1 n'a aucun effet ni sur la transcription du gène ni sur l'accumulation de la protéine dans les milieux conditionnés des deux lignées cellulaires. En effet, les niveaux de transcrits et de protéases dans les milieux sont sensiblement identiques avec ou sans traitement à la TSP-1. De plus, l'analyse par zymographie ne montre également aucune différence dans l'activation de MMP2. La plus forte expression et activation de MMP2 chez les cellules FTC-238 n'est donc pas une conséquence de la plus grande accumulation de TSP-1 dans leur milieu conditionné.



**Figure 34 :** Effet de TSP-1 sur l'expression de MMP2. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées ou non (CTL), durant 24h avec 50µg/ml de TSP-1. L'expression des ARNm codant pour MMP2 sont analysés par RT-PCR. L'utilisation d'amorces S26 sert de contrôle interne.



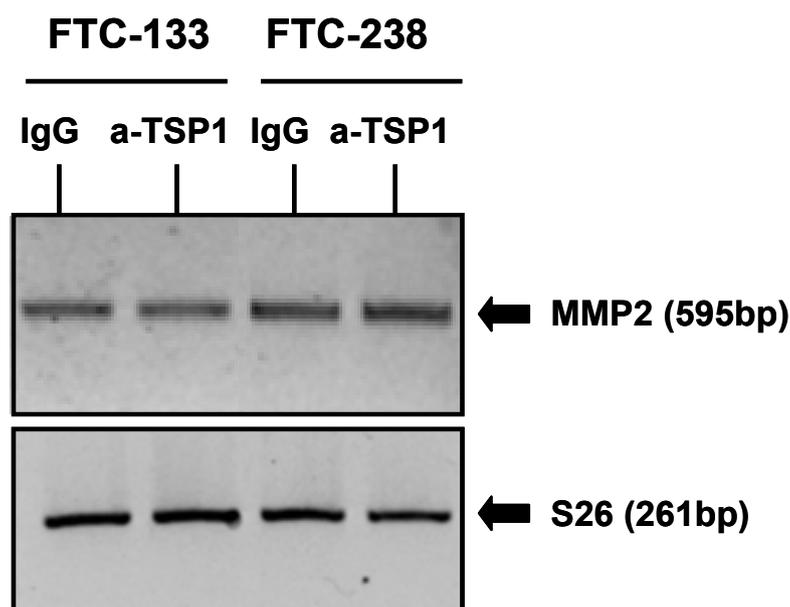
**Figure 35 : Effet de TSP-1 sur la sécrétion de MMP2.** Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, ou non (CTL), durant 24h avec 50 $\mu$ g/ml de TSP-1. Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés par zymographie sur gel de gélatine.

#### V-2 Effet de la neutralisation de TSP-1 sur l'expression et l'activation de MMP2 des cellules FTC.

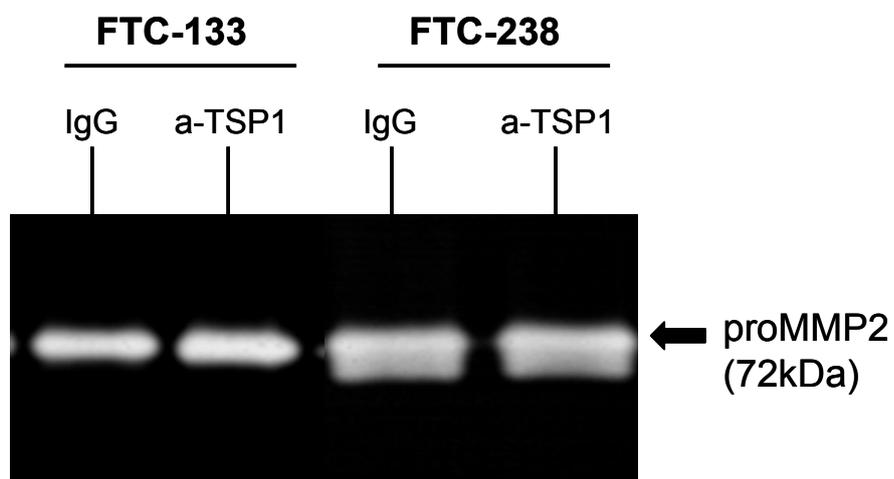
Afin de confirmer et renforcer les résultats précédemment obtenus avec l'utilisation de TSP-1 exogène, nous avons neutralisé la TSP-1 endogène en traitant pendant 24h les cellules avec 30 $\mu$ g/ml d'un anticorps monoclonal dirigé contre TSP-1, puis nous avons procédé aux mêmes analyses.

Les expériences de RT-PCR ne révèlent aucune variation significative de transcription d'ARNm codant pour MMP2 (figure 36). De même, l'analyse par zymographie sur gel de gélatine ne montre pas de variation de l'activité enzymatique, que les cellules soient traitées ou non avec l'anticorps (figure 37).

Ainsi, dans notre modèle cellulaire, TSP-1 ne semble pas influencer l'expression, la sécrétion ou encore l'activation de MMP2. Le rôle pro-invasif de TSP-1 observé précédemment pour les cellules FTC (figure 27) ne semble donc pas dépendant de l'activité de MMP2, bien que celle-ci soit augmentée pour les cellules FTC-238.



**Figure 36 :** Effet de la neutralisation de TSP-1 sur l'expression de MMP2. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, durant 24h avec 30 $\mu$ g/ml d'anticorps dirigés contre TSP-1 (a-TSP1) ou d'IgG non spécifique (IgG). L'expression des ARNm codant pour MMP2 sont analysés par RT-PCR. L'utilisation d'amorces S26 sert de contrôle interne.



**Figure 37 :** Effet de la neutralisation de TSP-1 sur la sécrétion de MMP2. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, durant 24h avec 30 $\mu$ g/ml d'anticorps dirigés contre TSP-1 (a-TSP1) ou d'IgG non spécifique (IgG). Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés par zymographie sur gel de gélatine.

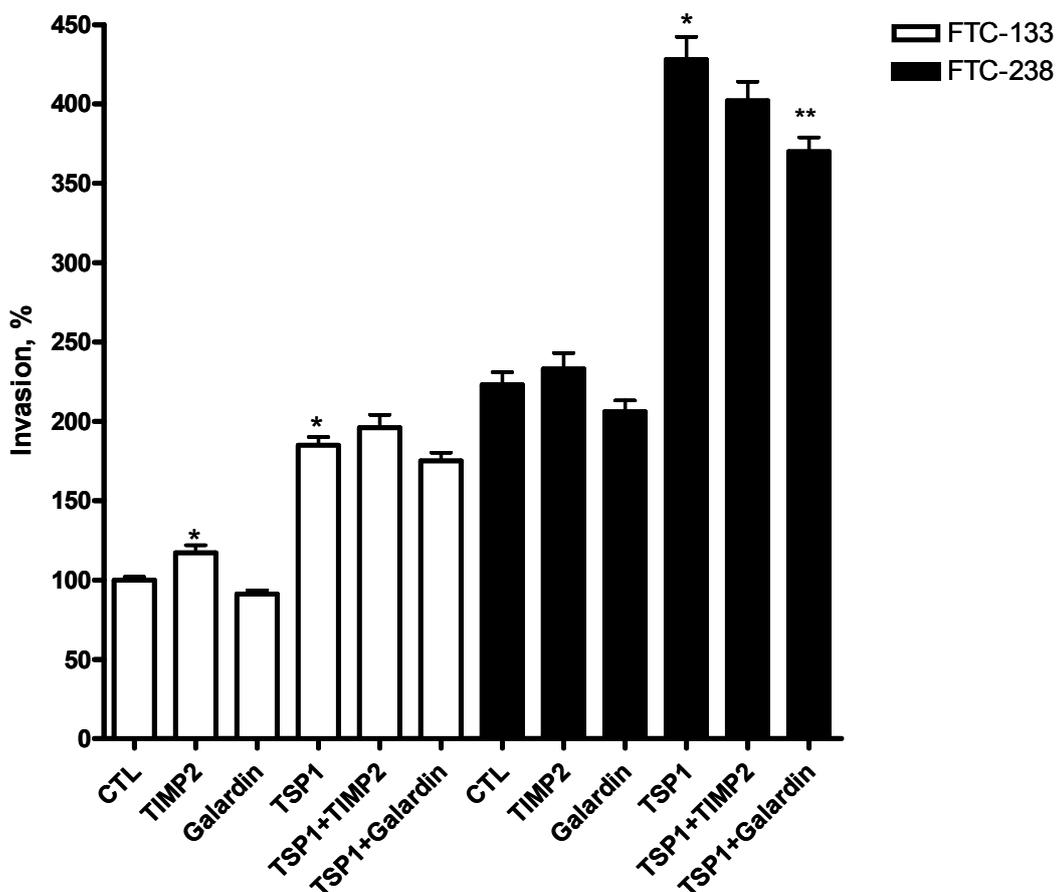
## **VI-Rôle de MMP2 dans le potentiel invasif régulé par TSP-1, des cellules FTC.**

L'augmentation de la synthèse de MMP2, ainsi que son accumulation dans le milieu de culture des cellules FTC-238 ne semble donc pas être la conséquence de l'augmentation d'expression de TSP-1 par ces cellules. Afin de déterminer si cette accumulation contribue néanmoins à leur comportement invasif, nous avons mesuré les capacités invasives des cellules FTC-238, dont l'activité de MMP2 est inhibée.

Pour cela, nous avons procédé à des tests d'invasion en Transwell, durant lesquels les cellules ont été incubées en présence de 20ng/ml TIMP2 exogène ou de l'inhibiteur synthétique à large spectre, la Galardin, utilisé à la concentration de 1nM [Agren et coll., 2001; Hao, Nagano et coll., 1999]. Les effets de cette inhibition d'activité ont non seulement été observés sur le pouvoir invasif basal des cellules FTC, mais également sur leur pouvoir invasif induit par TSP-1. Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans la figure 38.

Nous montrons que ni l'ajout de l'inhibiteur naturel TIMP2, ni celui de l'inhibiteur synthétique Galardin ne permettent de diminuer significativement le potentiel invasif des cellules FTC. Au contraire, nous observons une très légère augmentation de l'invasion lorsque les cellules FTC-133 sont traitées avec TIMP2. De la même façon, l'invasion induite par TSP-1 n'est pas significativement altérée par l'ajout des deux inhibiteurs de MMP2. Ces résultats suggèrent fortement que MMP2 ne peut être considéré comme un acteur majeur dans le contrôle de l'agressivité des cellules FTC 238.

Ainsi, non seulement son accumulation ne semble pas être la conséquence de l'augmentation d'expression de TSP-1 par les cellules FTC-238, mais elle n'est également pas responsable du caractère invasif de ces cellules, dans nos conditions expérimentales. Il convient donc de se tourner vers d'autres acteurs connus de la progression tumorale, et notamment uPA, pour comprendre le mécanisme par lequel TSP-1 est impliqué dans l'agressivité des cellules FTC.



**Figure 38 :** Rôle de MMP2 dans le potentiel invasif basal et induit par TSP-1 des cellules FTC. Les cellules ( $2.10^4$ ) sontensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec  $40\mu\text{g/ml}$  de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h avec  $20\text{ng/ml}$  de TIMP2 ou  $1\text{nM}$  de Galardin puis  $50\mu\text{g/ml}$  de TSP-1. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes exprimées en pourcentages  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, par rapport au contrôle FTC-133 non traitées, étalonné à 100%. \*,  $P < 0,01$  vs cellules non traitées (CTL). \*\*,  $P < 0,01$  vs cellules traitées par TSP-1.

## VII-Rôle de TSP-1 dans l'expression et l'activité d'uPA.

Nous avons montré que TSP-1 n'influçait ni l'expression, ni l'activité de MMP2 en dépit du fait qu'elle présente la capacité à se complexer avec cette protéase matricielle. TSP-1 est impliquée dans la régulation du potentiel invasif des cellules FTC, mais ses effets ne

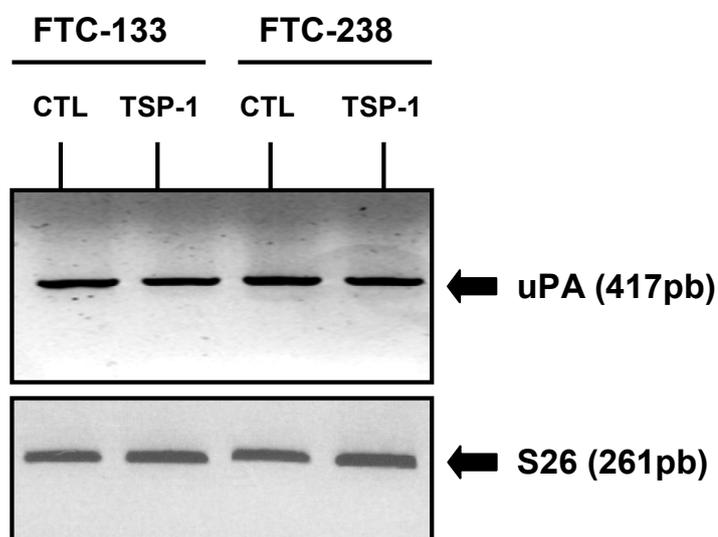
semblent pas liés à la stimulation de l'expression ou de l'activité de MMP2. Nous avons donc décidé d'étudier son rôle dans l'expression et l'activité de l'autre protéase matricielle d'intérêt, à savoir uPA.

### VII-1 Effet de TSP-1 exogène sur l'expression d'ARNm codant pour uPA dans les cellules FTC.

Nous n'avons pas observé de différences notables dans l'expression des ARNm codant pour uPA entre les deux lignées cellulaires (figure 30). Toutefois, nous avons cherché à déterminer si TSP-1 était ou non capable de stimuler l'expression d'uPA dans les cellules FTC.

Pour cela, nous avons procédé aux mêmes types d'expériences que précédemment pour MMP2. Nous avons donc traité les cellules avec 50µg/ml de TSP-1 en solution, puis avons analysé par RT-PCR les taux de transcrits uPA (figure 39).

L'analyse sur gel d'agarose ne révèle aucune différence significative des taux de transcrits uPA pour les cellules traitées ou non, par TSP-1. L'ajout de TSP-1 ne stimule, ni ne réprime, l'expression d'ARNm codant pour uPA.



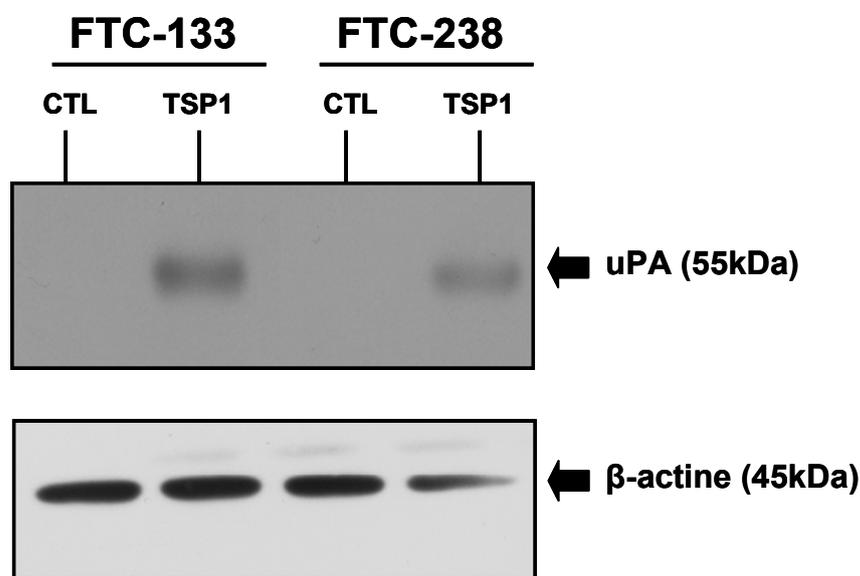
**Figure 39 :** Effet de TSP-1 sur l'expression d'uPA. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, ou non (CTL), durant 24h avec 50µg/ml de TSP-1. L'expression des ARNm codant pour uPA est analysé par RT-PCR. L'utilisation d'amorces S26 sert de contrôle interne.

## VII-2 Effet de TSP-1 exogène sur la sécrétion et l'activité d'uPA dans les milieux conditionnés des cellules FTC.

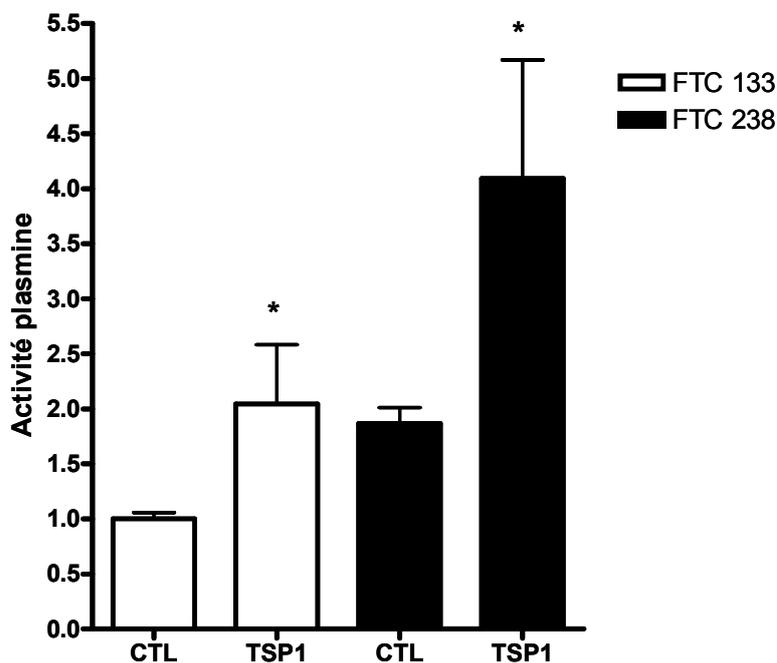
L'analyse du taux de protéines par western blot utilisant un anticorps anti-uPA montre que les deux lignées cellulaires, traitées comme précédemment, par TSP-1 accumulent plus d'uPA dans leurs milieux conditionnés par rapport à leur contrôle respectif, non traitées (figure 40).

De plus, lorsque nous mesurons l'activité plasmine dans ces milieux et dans les mêmes conditions de culture (figure 41), nous montrons d'une part que l'activité plasmine basale est environ deux fois plus importante chez les cellules FTC-238 que chez les cellules FTC-133 ( $1 \pm 0,05$  pour les FTC-133 contre  $1,86 \pm 0,15$  pour les FTC-238). Nous constatons d'autre part, une plus forte activité dans les milieux issus des cellules traitées avec TSP-1 ( $2,04 \pm 0,54$  pour les FTC-133 traitées et  $4,1 \pm 1,07$  pour les FTC-238 traitées).

Cette activité plasmine est en fait le reflet de l'activité uPA, puisque expérimentalement, la même quantité de Lys-plasminogène est présente au départ de la réaction, dans les différentes conditions testées. Nous mesurons donc, le taux de conversion du plasminogène en plasmine catalysée par uPA.



**Figure 40: Effet de TSP-1 sur la sécrétion d'uPA.** Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées ou non (CTL), durant 24h avec  $50\mu\text{g/ml}$  de TSP-1. Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés par western blot avec un anticorps monoclonal dirigé contre uPA. Les mêmes cellules sont lysées et un volume égal d'homogénat cellulaire est analysé par western blot avec un anticorps anti- $\beta$ -actine, servant de contrôle de charge.

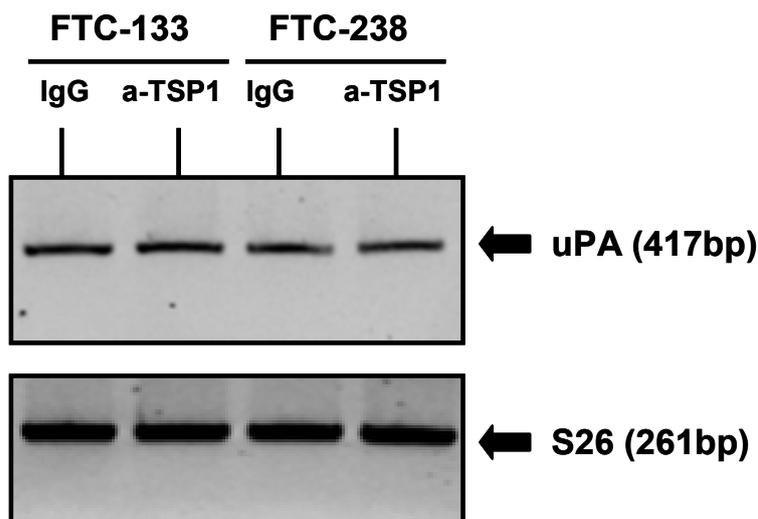


**Figure 41 :** Effet de TSP-1 sur l'activité d'uPA. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, ou non (CTL), durant 24h avec 50 $\mu$ g/ml de TSP-1. Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et dia-filtrés, afin d'éliminer le rouge de phénol. L'activité plasmine est mesurée via le clivage du substrat S-2251, et les variations d'absorbance sont mesurées à 405nm. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes (unité arbitraire)  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. \*,  $P < 0,01$ .

### VII-3 Effet de la neutralisation de TSP-1 sur l'expression d'ARNm codant pour uPA dans les cellules FTC.

Afin de confirmer et de renforcer les résultats précédemment obtenus avec l'ajout de TSP-1 exogène, nous avons ensuite neutralisé la TSP-1 endogène en traitant pendant 24h nos cellules avec 30 $\mu$ g/ml d'anticorps monoclonal dirigé contre TSP-1 ou 30 $\mu$ g/ml d'anticorps non spécifique, puis avons procédé aux mêmes types d'analyses.

Dans un premier temps, l'analyse par RT-PCR des transcrits uPA, au sein des cellules FTC, ne révèle aucune variation notable d'expression lorsque ces cellules sont traitées, ou pas, avec l'anti-TSP-1 (figure 42). Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus dans la figure 38, à savoir que TSP-1 ne semble pas capable d'influencer l'expression d'uPA au sein de ces cellules de carcinome folliculaire thyroïdien.

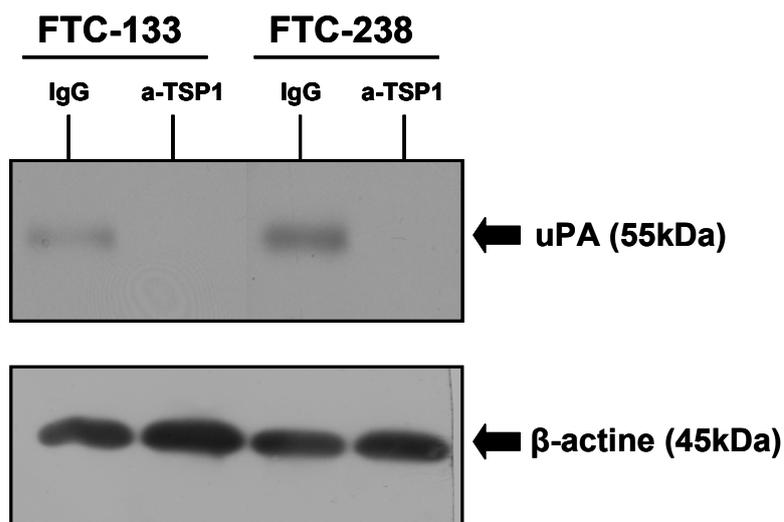


**Figure 42** : Effet de la neutralisation de TSP-1 sur l'expression d'uPA. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées durant 24h avec 30 $\mu$ g/ml d'IgG anti-TSP-1 (a-TSP1) ou d'IgG non spécifiques (IgG). L'expression des ARNm codant pour uPA sont analysés par RT-PCR. L'utilisation d'amorces S26 sert de contrôle interne.

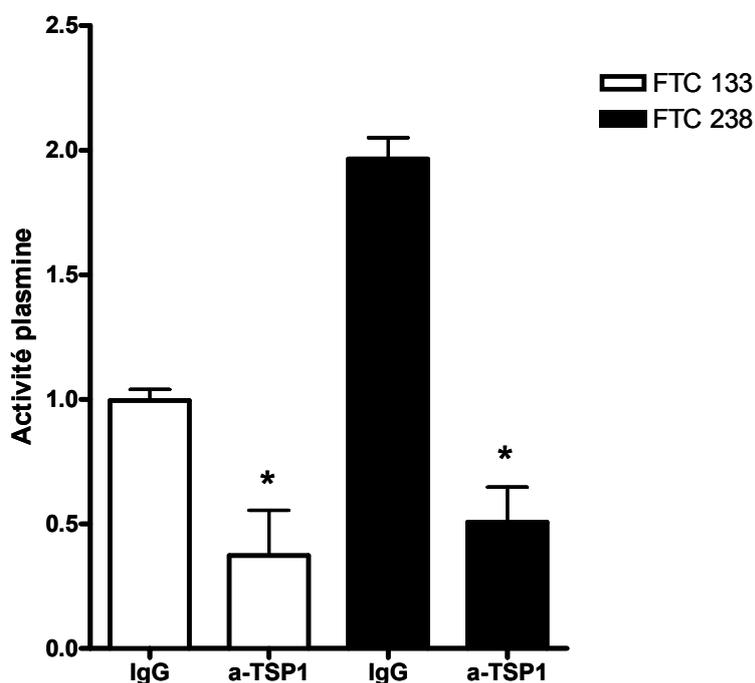
#### VII-4 Effet de la neutralisation de TSP-1 sur la sécrétion et l'activité d'uPA dans les milieux conditionnés des cellules FTC.

Les expériences de western blot effectuées à partir des milieux ainsi conditionnés montrent une très nette inhibition de l'accumulation d'uPA lorsque les cellules sont traitées avec l'anti-TSP-1 (figure 43). Cette inhibition semble plus importante pour les cellules FTC-238 quand on compare les taux basaux respectifs (IgG).

Nous avons également mesuré l'activité plasmine dans ces mêmes milieux conditionnés (figure 44). Nous avons pu nous assurer que les traitements aux IgG ne modifiaient pas le rapport d'activité basale entre les FTC-133 et FTC-238, qui reste d'un facteur 2. Lorsque les cellules FTC sont traitées avec l'anti-TSP-1, nous observons une diminution de l'activité plasmine dans les milieux conditionnés des deux lignées cellulaires, mais dans des proportions différentes. En effet, la diminution d'activité dans les milieux conditionnés des cellules FTC-133 est d'un facteur 2 ( $0,37 \pm 0,18$  pour les FTC-133 traitées avec l'anti-TSP-1 contre  $0,99 \pm 0,04$  pour le contrôle), alors que celle mesuré chez les cellules FTC-238 est d'un facteur 4 ( $0,50 \pm 0,14$  pour les FTC-238 traitées avec l'anti-TSP-1 contre  $1,96 \pm 0,08$  pour le contrôle).



**Figure 43 :** Effet de la neutralisation de TSP-1 sur la sécrétion d'uPA. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées durant 24h avec 30 $\mu$ g/ml d'IgG anti-TSP-1 (a-TSP1) ou d'IgG non spécifiques (IgG). Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés par western blot avec un anticorps monoclonal dirigé contre uPA. Les cellules qui correspondent aux différents milieux conditionnés étudiés, sont lysées et un volume égal d'homogénats cellulaire est analysé par western blot avec un anticorps anti- $\beta$ -actine, servant de contrôle de charge.



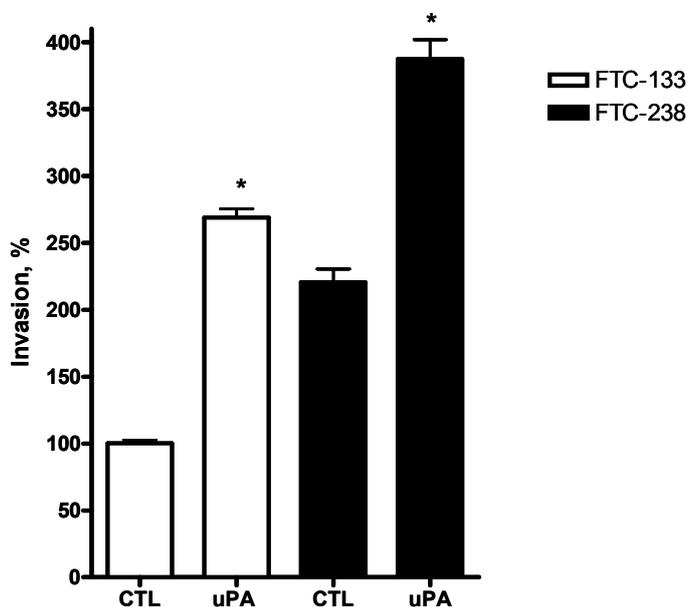
**Figure 44 :** Effet de la neutralisation de TSP-1 sur l'activité plasmine. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées durant 24h avec 30 $\mu$ g/ml d'IgG anti-TSP-1 (a-TSP1) ou d'IgG non spécifiques (IgG). Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et dia-filtrés, afin d'éliminer le rouge de phénol. L'activité plasmine est mesurée via le clivage du substrat S-2251, et les variations d'absorbance sont mesurées à 405nm. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes (unité arbitraire)  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. \*,  $P < 0,01$ .

## **VIII-Rôle d'uPA dans le potentiel invasif, régulé par TSP-1, des cellules FTC.**

Nous avons montré que l'augmentation d'expression de TSP-1 chez les cellules FTC-238 constitue un événement important lié au phénotype hautement invasif et peut être à l'origine d'une accumulation d'uPA dans le milieu de culture. La question qui se pose, à ce stade de l'investigation, est de déterminer si l'effet pro-invasif de TSP-1 est directement provoqué par l'accumulation d'uPA qu'elle est capable d'induire. Dans cette hypothèse, uPA doit pouvoir stimuler le potentiel invasif des deux lignées cellulaires, et à l'inverse, la neutralisation de l'activité d'uPA doit pouvoir le limiter.

### **VIII-1 Effet de l'ajout d'uPA exogène sur les capacités invasives des cellules FTC.**

Dans un premier temps, nous avons voulu observer l'effet d'uPA sur les capacités invasives des cellules FTC. Pour cela, nous avons procédé à des tests d'invasion avec les deux lignées cellulaires. Lors de ces tests, nous avons incubé les cellules avec de l'uPA exogène (100UI/ml).



**Figure 45 :** Effet d'uPA sur le pouvoir invasif des cellules FTC. Les cellules ( $2.10^4$ ) sont ensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec  $40\mu\text{g/ml}$  de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h avec  $100\text{UI/ml}$  d'uPA. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes exprimées en pourcentages  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, par rapport au contrôle FTC-133 non traitées, étaloné à 100%. \*,  $P < 0,01$ .

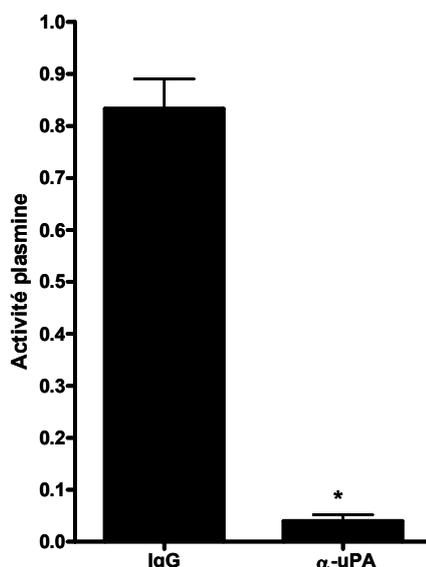
Ce traitement induit une forte augmentation de l'invasion chez les deux lignées cellulaires (figure 45). Cette augmentation est d'un facteur 2,7 pour les FTC-133 et de 1,8 pour les FTC-238. L'induction est comparable à celle déjà observée lors des traitements TSP-1 sur les cellules FTC-238 (figure 27). L'induction par uPA est néanmoins supérieure à celle observée par TSP-1 chez les FTC-133.

Ainsi, l'uPA exogène est capable à lui seul de stimuler le potentiel invasif des cellules FTC.

### VIII-2 Effet de l'anticorps neutralisant anti-uPA sur l'activité plasmine.

Afin de neutraliser l'activité d'uPA lors des tests d'invasion en Transwell, nous avons choisi d'utiliser un anticorps anti-uPA commercialisé comme étant anti-catalytique (cf. *Matériel et méthode, paragraphe II-4*). Cette propriété a également été confirmée dans la littérature [Stahl et Mueller, 1994 ; Kauhanen et coll., 1997]. Nous avons néanmoins voulu vérifier la réelle efficacité de cet anticorps sur l'activité uPA dans nos conditions expérimentales.

Nous avons pour cela mesuré l'activité plasmine d'un échantillon contenant 100UI d'uPA purifié, fourni par Calbiochem, et 30nM de Lys-plasminogène, en présence de 25µg/ml d'IgG non spécifiques de souris ou de 25µg/ml de l'anticorps bloquant anti-uPA. A cette concentration, l'anticorps neutralise effectivement la totalité de l'activité catalytique d'uPA (figure 46).

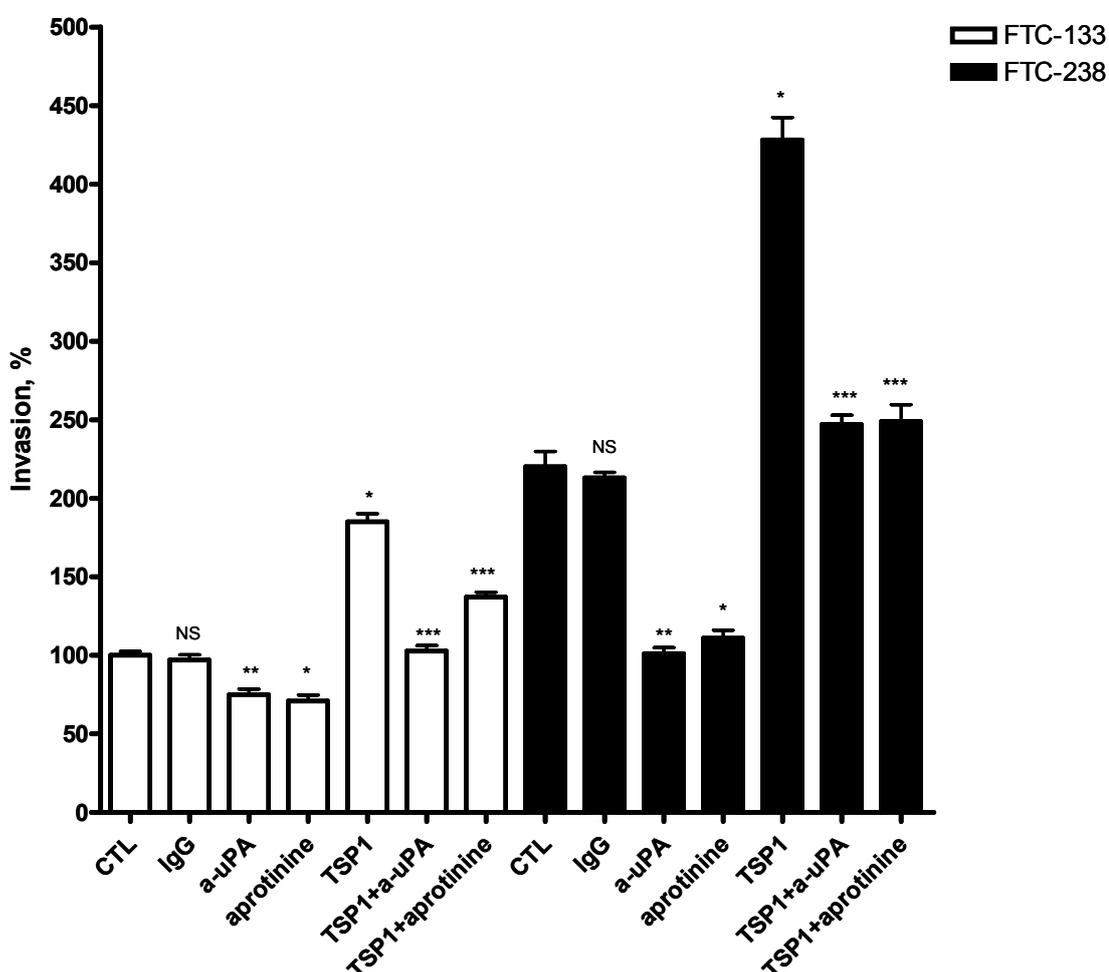


**Figure 46 :** Effet de l'anticorps neutralisant anti-uPA sur l'activité plasmine. L'activité plasmine d'un échantillon contenant 100UI/ml d'uPA et 30nM de Lys-plasminogène est mesurée en présence et en absence de 25µg/ml d'anticorps anti-uPA. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes des DO à 405nm ± SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. \*, P<0,01.

### VIII-3 Effet de l'inhibition de l'activité d'uPA sur le potentiel invasif basal et induit des cellules FTC.

Nous avons procédé à des expériences de tests d'invasion *in vitro* en essayant d'inhiber l'invasion basale ou induite par TSP-1, ceci afin de définir notamment le rôle d'uPA dans la régulation par TSP-1 du potentiel invasif des cellules FTC.

Pour cela, nous avons d'abord traité les cellules avec un inhibiteur de l'activité uPA : l'anticorps anti-catalytique dirigé contre uPA (25µg/ml) ou de l'activité plasmine : l'aprotinine (100µg/ml). Puis nous les avons stimulé avec TSP-1 (50µg/ml) afin d'induire l'invasion et avons co-traité ces cellules induites avec les inhibiteurs (figure 47).



**Figure 47 :** Rôle d'uPA dans le potentiel invasif basal et induit par TSP-1 des cellules FTC. Les cellules ( $2.10^4$ ) sontensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec 40µg/ml de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h avec 25µg/ml d'IgG anti-uPA ou d'IgG non spécifiques, 100µg/ml d'aprotinine ou/et 50µg/ml de TSP-1. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes exprimées en pourcentages  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, par rapport au contrôle FTC-133 non traitées, étalonné à 100%. \*,  $P < 0,01$  vs cellules non traitées (CTL). \*\*,  $P < 0,01$  vs cellules traitées par les IgG contrôles. \*\*\*,  $P < 0,01$  vs cellules traitées par TSP-1. NS, non significatif vs cellules non traitées (CTL).

Lors de ces tests, nous avons pu observer dans un premier temps que l'inhibition de l'activité enzymatique d'uPA ou de la plasmine entraînait une diminution équivalente du pouvoir invasif basal des deux lignées cellulaires. Toutefois, cette diminution est de proportion différente selon le type cellulaire. En effet, elle est plus importante chez les cellules FTC-238 : alors qu'elle est de l'ordre de 25% pour les FTC-133, elle atteint plus de 50% chez les FTC-238. Les traitements aux IgG non spécifiques n'influencent en aucune manière le potentiel invasif des deux lignées cellulaires. Ceci nous assure que les effets observés sur l'invasion cellulaire, lors des traitements avec l'anti-uPA, sont bien spécifiques de la neutralisation de l'activité de la protéase. Par ailleurs, le fait que le traitement par l'aprotinine donne les mêmes résultats que celui par l'anti-uPA montre que l'effet inducteur d'uPA sur le pouvoir invasif est bien dépendant de son activité catalytique. A noter que PAI-1 utilisé à 10µg/ml induit une diminution encore plus drastique du potentiel invasif des cellules FTC-238 (72% ± 4,7% par rapport au contrôle non traité, résultats non montrés).

Dans un second temps, nous avons pu observer que ces mêmes traitements pouvaient également diminuer le pouvoir invasif des cellules FTC induit par TSP-1. Cette diminution est toujours de 50% chez les FTC-238. Par contre pour les FTC-133, la diminution de l'invasion induite par TSP-1 provoquée par l'anti-uPA est plus efficace que celle observée sur l'invasion basale, puisqu'elle est d'environ 50%. De manière générale, nous observons un retour du pouvoir invasif à un niveau basal lorsque les cellules sont co-traitées avec l'anticorps anti-uPA.

Ainsi, TSP-1 est capable de réguler le potentiel invasif des cellules FTC en stimulant l'accumulation et l'activité d'uPA dans le milieu péricellulaire. En effet, cette protéase matricielle, à l'inverse de la MMP2, semble jouer un rôle prépondérant dans le caractère invasif des cellules de carcinome folliculaire thyroïdien.

L'accumulation d'uPA observée dans le milieu péricellulaire des cellules FTC-238 peut toutefois également être à rapprocher avec un déficit de son catabolisme, et plus précisément de son internalisation cellulaire. C'est d'ailleurs peut être aussi le cas pour les accumulations de MMP2 et de TSP-1. En effet, ces trois molécules ont un point commun dans leur processus d'internalisation qui est le récepteur membranaire d'endocytose LRP.

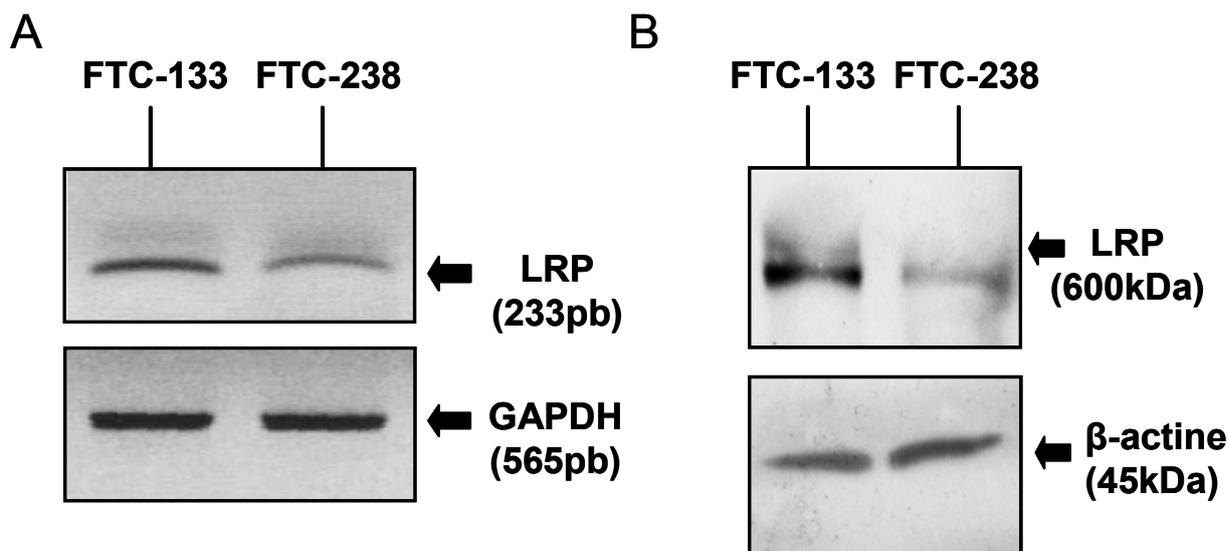
**B-Etude du rôle de LRP dans le  
potentiel invasif des cellules FTC.**

## **I-Corrélation entre l'expression de LRP des cellules FTC et leur potentiel invasif.**

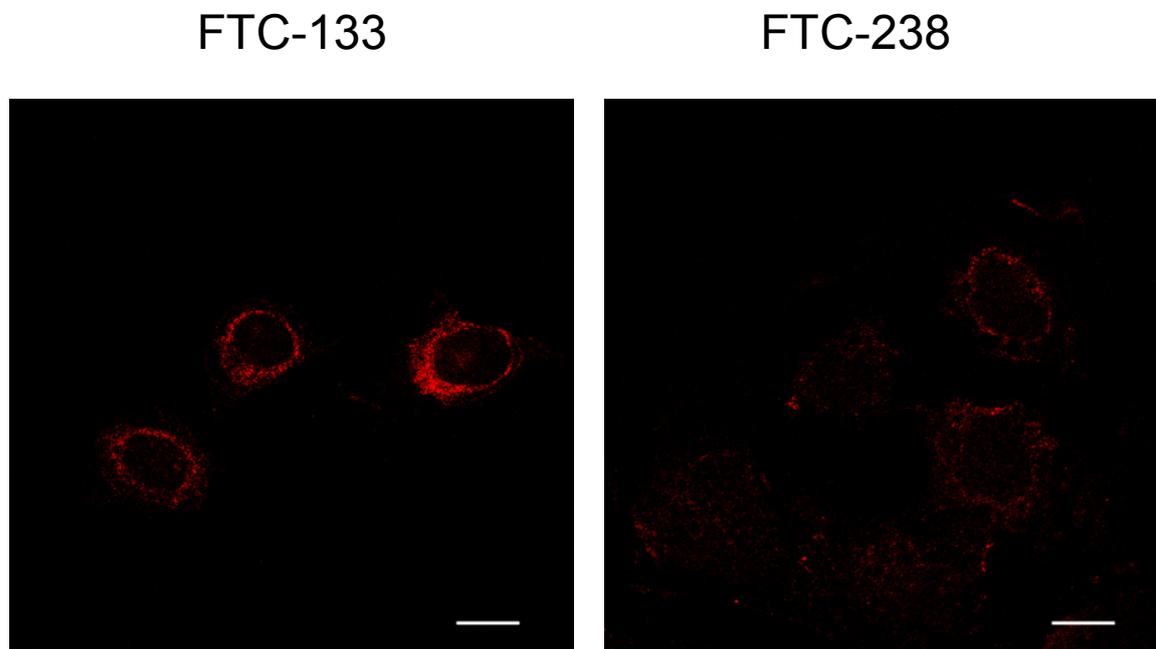
Comme nous l'avons précédemment décrit dans l'introduction, le rôle de LRP dans les processus de migration et d'invasion cellulaires reste toujours controversé [Webb et coll., 2000 ; Chazaud et coll., 2002]. Ainsi, certains auteurs montrent qu'une faible expression de LRP est corrélée à un phénotype invasif de cellules tumorales dérivées de mélanome et de la prostate [Kancha et coll., 1994], alors que d'autres montrent qu'un taux d'expression élevé de LRP stimule le potentiel invasif de cellules de cancer du sein [Li et coll., 1998]. Aucune étude n'ayant été publiée sur notre modèle cellulaire, ni même sur le modèle thyroïdien en général, nous avons donc observé le profil d'expression de ce récepteur dans nos deux lignées aux potentiels invasifs différents ; et cela, aussi bien au niveau ARNm qu'au niveau protéique (figure 48).

L'analyse par RT-PCR montre une nette diminution du taux de transcription des ARNm codant pour LRP dans les cellules hautement invasives FTC-238 (figure 48A). Celle-ci est accompagnée d'une perte importante d'expression de la protéine au niveau membranaire (figure 48B). Ainsi, les cellules FTC-238 présentent beaucoup moins de récepteur LRP à leur surface et ce phénomène pourrait correspondre, du moins en partie, à une régulation transcriptionnelle. Ces observations sont confirmées par la technique d'immunofluorescence. Les cellules ont été marquées à l'aide du même anticorps anti-LRP, qui est par la suite reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorophore, l'Alexa Fluor® 568, fluorescent dans le rouge (figure 49). L'analyse par microscopie confocale de cet immunomarquage permet de mettre en évidence une répartition assez homogène du récepteur LRP à la surface membranaire des cellules FTC. Toutefois, l'intensité de signal est très nettement inférieure chez les FTC-238.

Ces trois approches expérimentales convergent ainsi vers un même constat : les cellules à fort potentiel invasif de la lignée FTC-238, expriment beaucoup moins LRP que les cellules FTC-133, moins invasive. Nous pouvons supposer que ceci va engendrer des différences dans la capacité d'endocytose des deux lignées cellulaires.



**Figure 48 :** La différence d'expression de LRP dans les cellules FTC-133 et FTC-238. (A), analyse par RT-PCR de l'expression des ARNm codant pour LRP et GAPDH par les cellules FTC. (B), les cellules FTC ( $5.10^6$ ) sont lavées deux fois avec du PBS froid et les membranes plasmiques extraites par fractionnement cellulaire. Cette fraction enrichie en membranes plasmiques est ensuite analysée par western-blot avec un anticorps anti-LRP. L'utilisation d'anti- $\beta$ -actine sert de contrôle de charge.

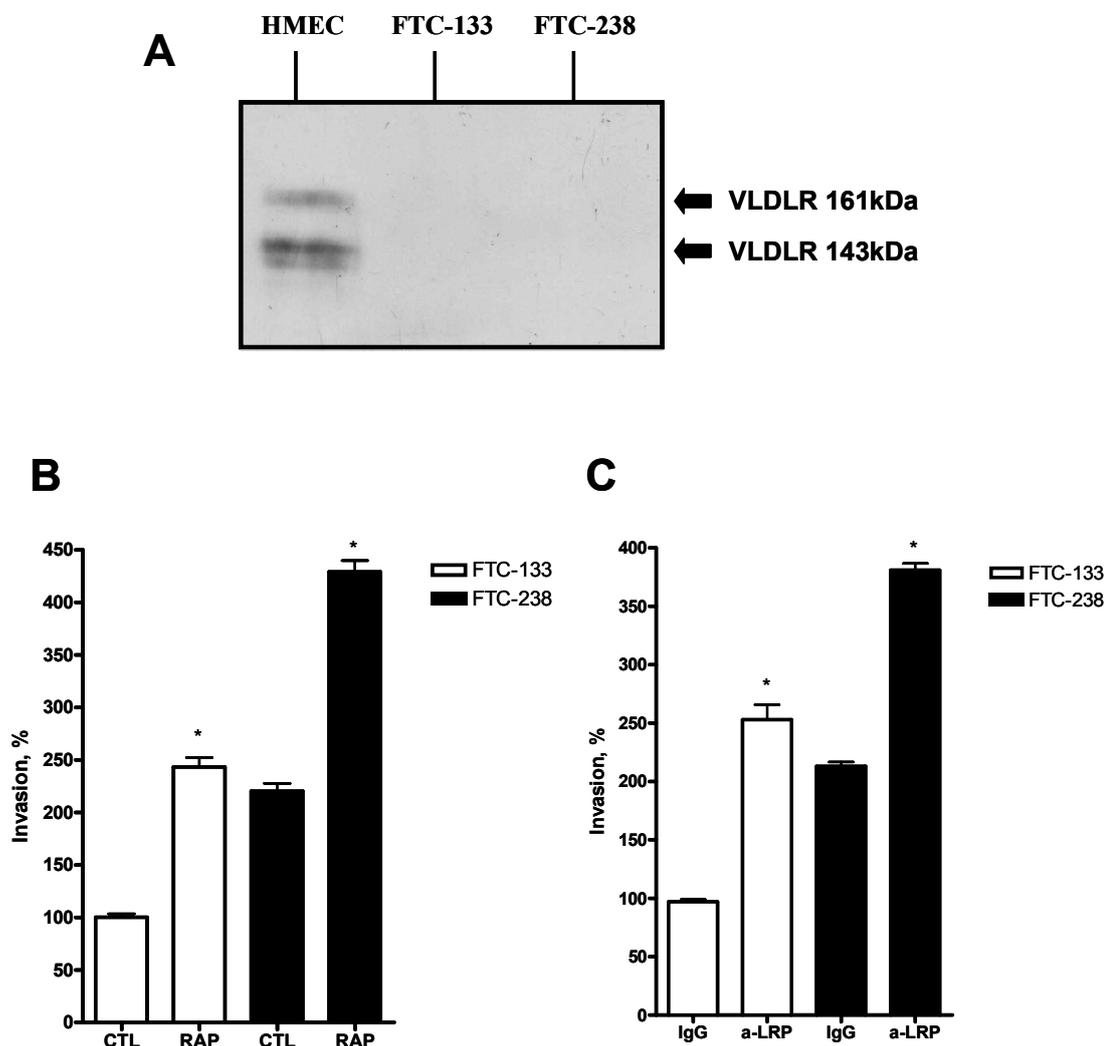


**Figure 49 :** Analyse en microscopie confocale du marquage immunofluorescent de LRP. Après une mise au repos de 16h, les cellules FTC sont fixées au paraformaldéhyde puis le marquage de LRP (grâce à un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 568, fluorescent dans le rouge) est étudié par microscopie confocale. La barre blanche représente 10 $\mu$ m.

## **II-Effet de la neutralisation de LRP sur le pouvoir invasif des cellules FTC.**

Afin de savoir si LRP, et plus précisément l'endocytose dépendante de LRP, est impliquée dans la régulation du pouvoir invasif des cellules FTC, nous avons procédé à des tests d'invasion *in vitro*, en Transwell, dans lesquels nous avons bloqué la liaison au récepteur. Pour cela, nous avons saturé les sites de liaison de LRP, afin qu'aucun autre de ses ligands ne puisse venir interagir avec celui-ci et donc ne puisse être internalisé. Deux méthodes ont été expérimentées. La première consiste à utiliser une protéine chaperonne de LRP, de 39kDa, appelée RAP (*Receptor-Associated Protein*). Cette protéine, utilisée à 500nM pendant 24h, est capable d'interagir avec les trois principaux domaines de liaison au ligand de LRP et provoquer un changement allostérique au sein du récepteur, empêchant tout autre ligand de venir s'y fixer [Willnow et coll., 1994 ; Strickland et coll., 1995 ; Bu et Rennke, 1996]. La seconde consiste en l'utilisation de l'anticorps polyclonal anti-LRP (#R2629), qui reconnaît de multiples épitopes, parmi les domaines de liaison au ligand du récepteur et qui a déjà été validé vis-à-vis de sa capacité à bloquer l'endocytose-dépendante de LRP [Strickland et coll., 1990 ; Lakkaraju et coll., 2002 ; Orr et coll., 2003]. Celui-ci est utilisé à la concentration de 25µg/ml dans les conditions préalablement optimisées. Des IgG de lapin sont utilisées comme contrôle lors des expériences menées avec l'anticorps anti-LRP (figure 50).

Le traitement des cellules FTC par RAP induit une augmentation du pouvoir invasif des deux lignées. Cette induction est de 2,5 pour les FTC-133 et de 2 pour les FTC-238 par rapport à leur contrôle respectif, c'est à dire les cellules non-traitées (figure 50B). RAP est très souvent utilisé pour neutraliser LRP [Mikhailenko et coll., 1995 ; Webb et coll., 1999 ; Yang et coll., 2001 ; Emonard et coll., 2004], mais cette stratégie présente des limites. En effet, RAP est également capable de se fixer sur d'autres récepteurs de la famille des récepteurs aux LDL, comme VLDLR, LDLR, gp330...[Strickland et coll., 2002].



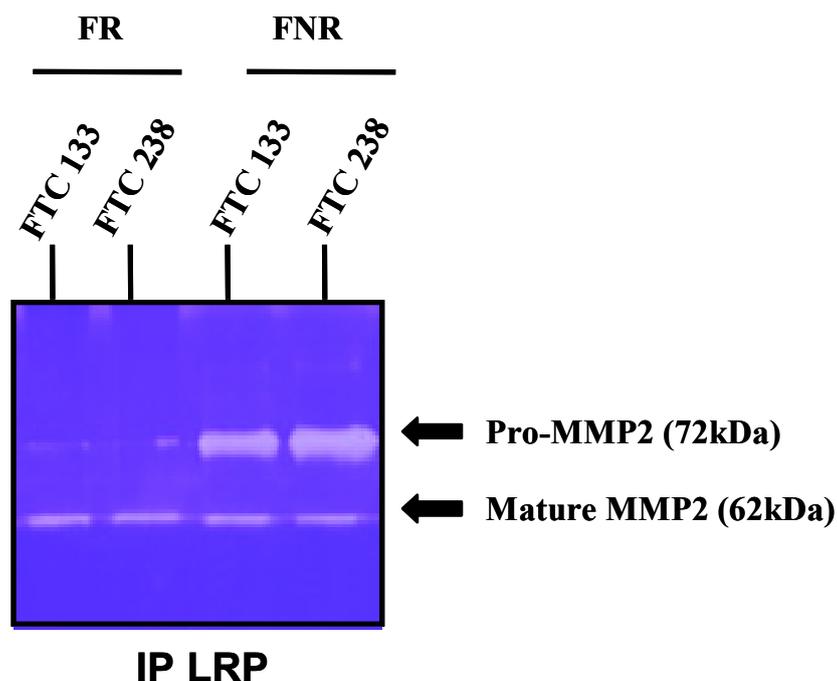
**Figure 50 : Effet de la neutralisation de LRP sur le comportement invasif des cellules FTC.** (A) Les cellules FTC ( $5 \cdot 10^6$ ) sont lavées deux fois avec du PBS froid et les membranes plasmiques extraites par fractionnement cellulaire. Cette fraction enrichie en membranes plasmiques est ensuite analysée par western-blot avec un anticorps anti-VLDLR. Le dépôt d'extrait membranaire de cellules HMEC sert de témoin positif. (B-C) Les cellules ( $2 \cdot 10^4$ ) sontensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec  $40 \mu\text{g/ml}$  de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h en présence ou non de  $500 \text{nM}$  RAP (B),  $25 \mu\text{g/ml}$  IgG anti-LRP ou  $25 \mu\text{g/ml}$  IgG de lapin (C). Les cellules ayant traversées la membrane sont comptées à raison de 3 champs par puits. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes en pourcentage  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, par rapport au contrôle FTC-133 non traitées étalonné à 100%. \*,  $P < 0,01$  vs cellules non traitées. \*\*,  $P < 0,01$  vs cellules traitées aux IgG.

Ainsi, les effets observés lors de traitements par RAP peuvent être dus à la neutralisation d'un ou de plusieurs de ces récepteurs et pas uniquement à celle de LRP. Nous nous sommes par conséquent assuré que nos cellules n'exprimaient pas VLDLR, le membre de la famille qui possède le plus de similitudes avec LRP en termes de fonctionnalité (figure 50A). Mais cette approche n'étant pas totalement satisfaisante, nous avons choisi de cibler plus précisément LRP en utilisant un anticorps spécifique. Le traitement des cellules par cet anticorps conduit à obtenir des résultats similaires à ceux obtenus avec RAP. En effet, il induit une augmentation du pouvoir invasif d'environ un facteur 2,5 chez les FTC-133 et 2 chez les FTC-238 par rapport à leur contrôle respectif, c'est à dire les cellules traitées par des IgG de lapin (figure 50C). Ainsi, l'endocytose dépendante de LRP semble étroitement liée au potentiel invasif des cellules FTC. La diminution d'expression de LRP pourrait être liée à l'acquisition du phénotype invasif par les cellules FTC-238.

### **III-Etude des interactions moléculaires avec LRP.**

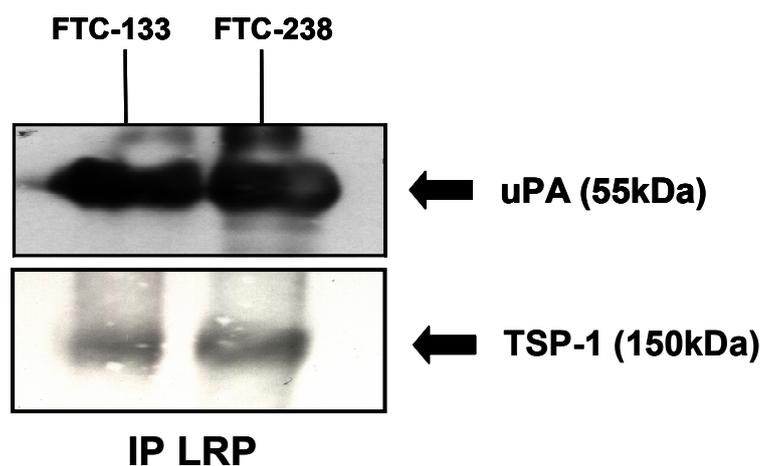
TSP-1, MMP2 et uPA sont décrits dans la littérature comme étant capables d'interagir directement ou indirectement, sous forme de complexes, avec LRP à la surface cellulaire. Ces interactions sont indispensables aux mécanismes régulant l'endocytose médiée par LRP. Avant d'approfondir notre étude sur le rôle de LRP dans l'accumulation, observée précédemment, de TSP-1, ainsi que des deux protéases matricielles, nous avons voulu nous assurer que ce type d'interactions existait dans notre modèle cellulaire. Pour cela, nous avons procédé à des expériences d'immunoprécipitation. A l'aide de l'anticorps de lapin anti-LRP, nous avons immunoprécipité le récepteur dans des conditions permettant de sauvegarder les interactions moléculaires. Puis nous avons analysé par zymographie sur gel de gélatine les fractions protéiques retenues et non retenues avec le complexe immun (figure 51).

Nous montrons ainsi que la forme active de MMP2 est partiellement co-précipitée avec LRP. En effet, nous retrouvons cette forme active dans la fraction retenue et dans la fraction non retenue. Par contre, la forme zymogène n'est pas retenue avec le complexe immun. Nous ne la retrouvons que dans la fraction non retenue. Ainsi, seule la forme mature de MMP2 semble capable d'interagir avec LRP dans nos conditions expérimentales. Notons que la forme intermédiaire de MMP2 n'est pas détectable dans ces échantillons. Nous ne sommes donc pas en mesure de savoir si cette forme est capable ou non d'interagir avec LRP.



**Figure 51:** Interaction de la forme active de MMP2 avec LRP au niveau de la membrane plasmique des cellules FTC. Des extraits enrichis en membranes sont assujettis à des expériences de co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-LRP. Les fractions retenues (FR) et non retenues (FNR) sont analysées par zymographie sur gel de gélatine.

Nous avons ensuite analysé la fraction protéique retenue par western blot en utilisant un anticorps de souris dirigé contre uPA ou contre TSP-1 (figure 52). Nous montrons que la protéase matricielle, ainsi que la protéine matricellulaire sont co-précipitées avec LRP. uPA et TSP-1 sont donc également capables d'interagir avec le récepteur.



**Figure 52:** uPA et TSP-1 sont capables de former des complexes moléculaires avec LRP au niveau de la membrane plasmique des cellules FTC. Des extraits enrichis en membranes sont assujettis à des expériences de co-immunoprécipitation avec un anticorps de lapin anti-LRP. Les fractions retenues sont analysées par western blot avec un anticorps de souris anti-uPA ou anti-TSP-1.

Conformément à ce qu'il a déjà été décrit dans d'autres modèles cellulaires, TSP-1, uPA et la forme active de MMP2 sont capables de former des complexes moléculaires avec LRP, dans notre modèle cellulaire, c'est à dire dans les cellules de carcinome folliculaire thyroïdien. En revanche, la stratégie de co-immunoprécipitation ne permet pas de déterminer le type exact d'interactions qu'il existe entre ces quatre protéines. En effet, nous ne distinguons pas les interactions directes des interactions indirectes. Ainsi, uPA et MMP2 peuvent très bien interagir soit directement avec LRP, soit par l'intermédiaire de TSP-1. De même, une molécule de TSP-1 est elle capable d'interagir simultanément ou séparément avec MMP2 et uPA ? Quoiqu'il en soit, ces observations laissent présager du rôle de LRP dans l'endocytose de ces deux protéases matricielles et de la protéine matricellaire. Ainsi, la diminution d'expression du récepteur chez les cellules FTC-238 pourrait être à l'origine de l'accumulation de MMP2 et d'uPA, ainsi que de celle de TSP-1 dans les milieux conditionnés. C'est ce que nous allons tenter de comprendre dans la suite de cette étude.

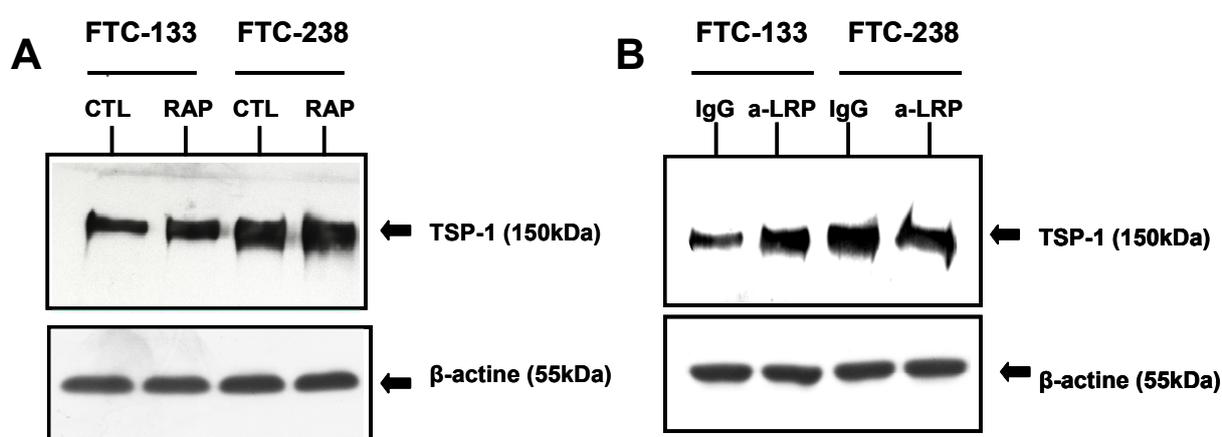
#### **IV-Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation de TSP-1 dans les milieux conditionnés des cellules FTC.**

Lors de l'étude du rôle de TSP-1 dans le potentiel invasif des cellules FTC (Cf. Partie A du chapitre *Résultats*), nous avons observé une forte accumulation de TSP-1 dans les milieux conditionnés des cellules FTC-238 (figure 23). Celle-ci est également accompagnée d'une plus grande expression génique. Dans le but de déterminer si cette forte accumulation de la protéine matricellaire est une conséquence de la diminution d'expression de LRP dans ces cellules, nous avons procédé à des expériences de neutralisation du récepteur d'endocytose, puis avons observé l'accumulation de TSP-1 dans les milieux de culture (figure 53). La neutralisation de LRP est obtenue de deux manières : l'utilisation de RAP et celle d'IgG anti-LRP (cf. *Résultat, paragraphe I-2*).

L'étude, par western blot, du taux de TSP-1 dans les milieux conditionnés des cellules FTC-133, traitées soit par RAP, soit par l'anti-LRP, nous montre que la neutralisation du récepteur chez ces cellules provoque une nette accumulation de TSP-1. En revanche, nous n'observons pas d'accumulation significative de la protéine dans les milieux conditionnés des cellules FTC-238 traitées dans les mêmes conditions. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de TSP-1 présente dans leur milieu conditionné étant déjà très importante, il

devient donc difficile d'observer une accumulation supplémentaire. Ce à quoi il faut ajouter les limites de sensibilité de la technique utilisée.

Ces résultats nous indiquent tout de même que l'accumulation de TSP-1 observée dans le milieu de culture des cellules FTC-238, comparé aux FTC-133, peut certainement être en partie liée à la diminution d'expression de LRP pour ces cellules. Cette diminution d'expression, entraînant un déficit dans le catabolisme de TSP-1, associée à un taux d'expression plus important aboutit donc à une accumulation de la protéine dans le milieu de culture.



**Figure 53:** Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation de TSP-1 dans les milieux conditionnés des cellules FTC. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, ou non (CTL), durant 24h avec 500nM de RAP (RAP) (A) ou avec 25µg/ml d'IgG non spécifiques (IgG) ou anti-LRP (a-LRP) (B). Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés par western blot avec un anticorps monoclonal dirigé contre TSP-1. Les cellules qui correspondent aux différents milieux conditionnés étudiés sont lysées et un volume égal d'homogénats cellulaire est analysé par western blot avec un anticorps anti-β-actine, servant de contrôle de charge.

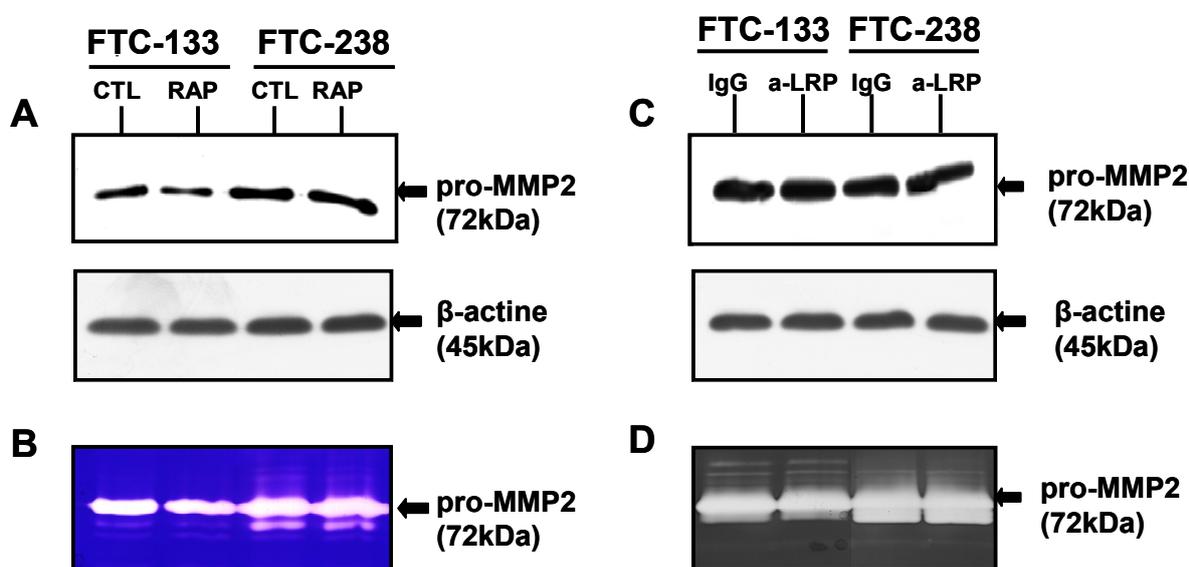
## V-Rôle de MMP2 dans le pouvoir invasif, régulé par LRP, des cellules FTC.

V-1 Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation de MM2 dans les milieux conditionnés.

Nous avons également observé une plus forte accumulation de MMP2 dans le milieu conditionné des cellules FTC-238, ainsi qu'une plus grande expression génique en comparaison à celui des cellules FTC-133 (figures 25-27).

Afin de déterminer si l'accumulation de MMP2 dans le milieu conditionné est, en partie, la conséquence d'un déficit de son endocytose via LRP, nous avons procédé aux mêmes expériences de neutralisation du récepteur que précédemment, puis avons observé l'accumulation de cette protéase dans les milieux de culture. L'accumulation de MMP2 est observée par western blot et par zymographie sur gel de gélatine (figure 54).

Nous avons pu mettre ainsi en évidence que la neutralisation de LRP, que ce soit par l'utilisation de RAP ou par celle des IgG dirigés contre LRP, n'affecte en aucune façon l'accumulation de MMP2 dans les milieux conditionnés des cellules FTC. Ces données indiquent que l'accumulation de cette protéase dans le milieu conditionné des cellules FTC-238, en comparaison aux cellules FTC-133, ne serait pas liée à l'expression différentielle de LRP dans les deux lignées, mais plutôt aux taux de transcription des ARNm codants pour MMP2.



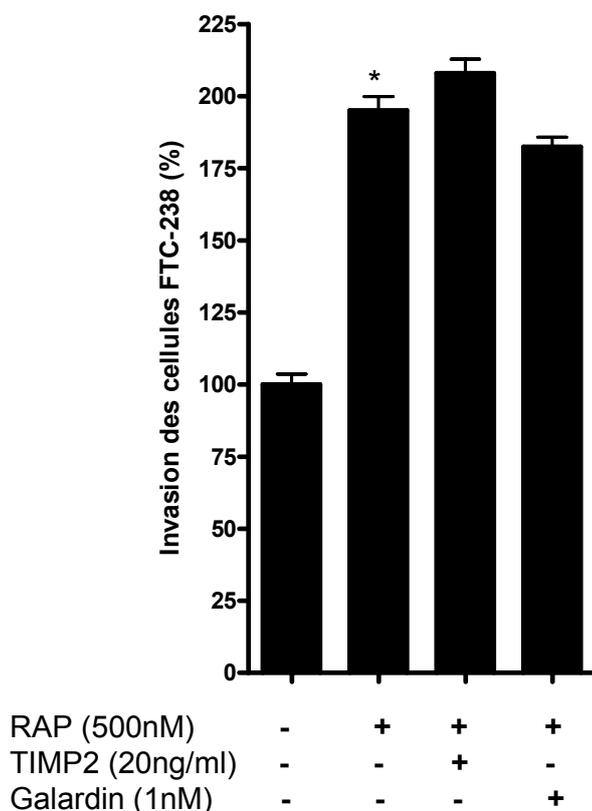
**Figure 54 :** Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation de MMP2 dans les milieux conditionnés des cellules FTC. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, ou non (CTL), durant 24h avec 500nM de RAP (RAP) ou avec 25µg/ml d'IgG non spécifiques (IgG) ou anti-LRP (a-LRP). Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés par western blot avec un anticorps monoclonal dirigé contre MMP2 (A et C) ou par zymographie sur gel de gélatine (B et D). Les cellules qui correspondent aux différents milieux conditionnés étudiés sont lysées et un volume égal d'homogénat cellulaire est analysé par western blot avec un anticorps anti-β-actine, servant de contrôle de charge.

## **V-2 Effet de l'inhibition de l'activité de MMP2 sur les capacités invasives induites par RAP des cellules FTC.**

Il semblerait que l'accumulation de MMP2 dans le milieu de culture des cellules FTC-238 ne soit pas la conséquence de la diminution d'expression de LRP par ces cellules. Afin de déterminer si cette accumulation contribue néanmoins à leur potentiel invasif induit par la neutralisation de RAP, nous avons mesuré les capacités invasives des cellules FTC-238 traitées par RAP, dont l'activité de MMP2 est inhibée.

Pour cela, nous avons procédé à des tests d'invasion en Transwell, durant lesquels les cellules ont été incubées en présence de 20ng/ml TIMP2 exogène ou de l'inhibiteur synthétique à large spectre, la Galardin, utilisé à la concentration de 1nM. Les effets de cette inhibition d'activité ont été observés sur le pouvoir invasif des cellules FTC-238 traitées par 500nM RAP. Les résultats de ce test sont présentés dans la figure 55. Nous montrons que ni l'ajout de l'inhibiteur naturel TIMP2, ni celui de l'inhibiteur synthétique Galardin ne permettent de diminuer significativement le potentiel invasif induit par RAP des cellules FTC-238.

Ces résultats suggèrent fortement que MMP2 ne peut être considéré comme exerçant un rôle dans l'agressivité des cellules FTC 238 régulée par LRP. Ainsi, non seulement son accumulation ne semble pas être la conséquence de la diminution d'expression de LRP par les cellules FTC-238, mais elle ne semble également pas être responsable du caractère invasif de ces cellules. Il convient donc une nouvelle fois de se tourner vers l'autre protéase matricielle de notre étude, uPA, pour tenter de comprendre le mécanisme par lequel LRP est impliqué dans l'agressivité des cellules FTC.



**Figure 55** : Effet de l'inhibition de l'activité de MMP2 sur le pouvoir invasif induit des cellules FTC-238. Les cellules ( $2.10^4$ ) sontensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec  $40\mu\text{g/ml}$  de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h en présence de  $500\text{nM}$  RAP. Puis les cellules sont co-incubées soit avec  $20\text{ng/ml}$  TIMP2, soit avec  $1\text{nM}$  Galardin. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes en pourcentage  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, par rapport au contrôle FTC-238 non traitées, étalonné à 100%. \*,  $P < 0,01$  vs cellules non traitées.

## VI-Rôle d'uPA dans le pouvoir invasif, régulé par LRP, des cellules FTC.

### **VI-1 Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation d'uPA dans les milieux conditionnés des deux lignées FTC.**

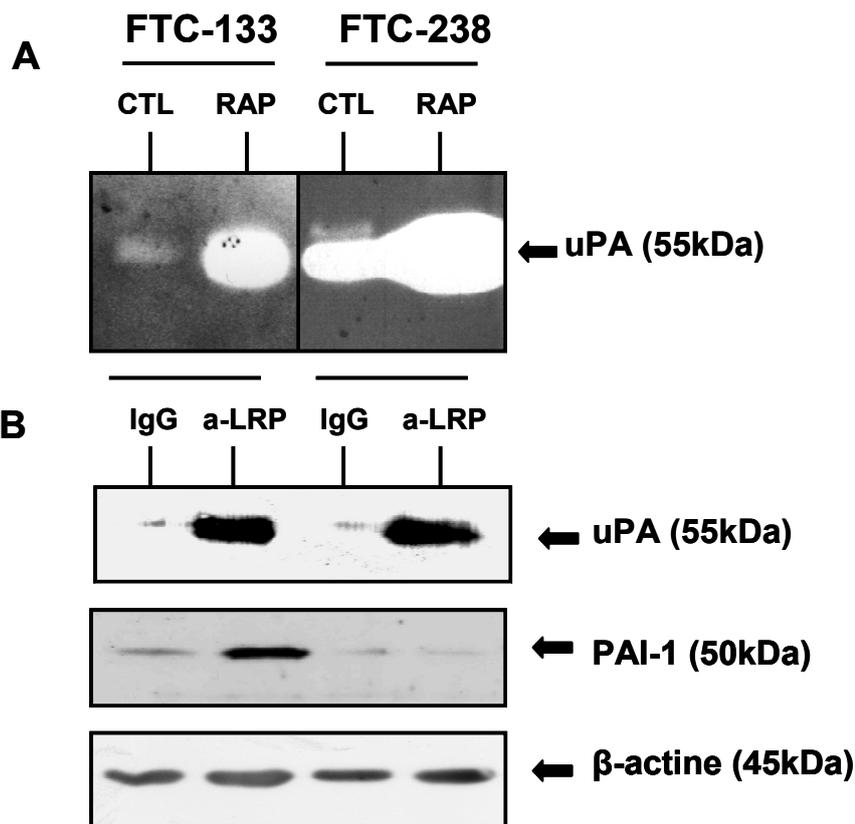
En suivant une démarche identique à celle mise en œuvre vis à vis de TSP-1 et de MMP2, l'accumulation d'uPA dans les milieux conditionnés des cellules FTC est mise en évidence à la suite d'expériences de neutralisation de LRP. Cette approche vise à déterminer

si la forte accumulation de cette protéase observée chez les cellules FTC-238 (figures 25-26) est, ou non, liée à un déficit d'endocytose chez ces cellules. En revanche, contrairement à la situation observée pour TSP-1 et MMP2, nous avons précédemment montré que le taux de transcription pour le gène d'uPA était sensiblement identique entre les deux lignées cellulaires (figure 27).

L'accumulation suite à la neutralisation de LRP par l'utilisation de RAP est ici observée par zymographie sur gel de fibrine/agarose, alors que l'accumulation suite à l'utilisation d'IgG anti-LRP est mise en évidence par western blot avec un anticorps monoclonal dirigé contre uPA (figure 56). Nous avons également observé, par western blot, l'accumulation de l'inhibiteur PAI-1 suite au traitement des cellules par des IgG anti-LRP.

Nos résultats montrent que la neutralisation de LRP induit une forte accumulation d'uPA dans les milieux conditionnés des deux lignées cellulaires. Ceci nous indique donc que l'accumulation d'uPA observée dans le milieu de culture des cellules FTC-238 peut être certainement liée à la diminution d'expression de LRP chez ces cellules. En d'autres termes, LRP est l'un des principaux récepteurs responsables de l'endocytose d'uPA dans ce modèle cellulaire. La diminution d'expression du récepteur chez les cellules FTC-238 entraîne un déficit dans le catabolisme de cette protéase et donc une accumulation de celle-ci dans le milieu de culture.

En parallèle et de façon assez surprenante, nous mettons en évidence que la neutralisation de LRP par des anticorps spécifiques entraîne une accumulation de l'inhibiteur PAI-1 uniquement dans le milieu conditionné des cellules FTC-133. En effet, ce traitement n'affecte pas du tout l'accumulation de PAI-1 chez les cellules FTC-238. Ces mêmes cellules présentent une accumulation moindre de cet inhibiteur dans leur milieu en conditions basales (figure 26). L'accumulation de la forme libre, consécutive à la neutralisation de LRP, ne serait pas observable parce que celle-ci se retrouverait immédiatement complexée à uPA, présent en très grande quantité dans le milieu des cellules FTC-238 ainsi traitées.



**Figure 56 :** Effet de la neutralisation de LRP sur l'accumulation d'uPA et de PAI-1 dans les milieux conditionnés des cellules FTC. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées, ou non (CTL), durant 24h avec 500nM de RAP (RAP) ou avec 25 $\mu$ g/ml d'IgG non spécifiques (IgG) ou anti-LRP (a-LRP). Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés respectivement par zymographie sur gel de fibrine/agarose (A) ou par western blot avec des anticorps monoclonaux dirigés contre uPA et PAI-1 (B). Les cellules qui correspondent aux différents milieux conditionnés étudiés sont lysées et un volume égal d'homogénat cellulaire est analysé par western blot avec un anticorps anti- $\beta$ -actine, servant de contrôle de charge.

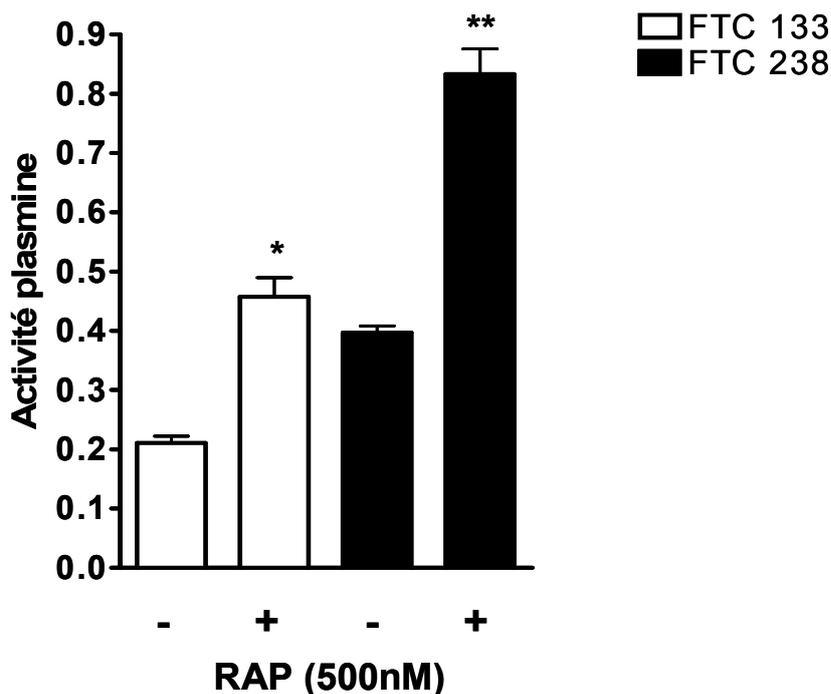
#### VI-2 Effet de la neutralisation de LRP sur l'activité plasmine dans les milieux conditionnés des cellules FTC.

Après avoir observé l'accumulation de la protéine uPA dans les milieux conditionnés des cellules FTC, suite à la neutralisation de LRP, nous avons mesuré l'activité plasmine dans les milieux de ces cellules dans les mêmes conditions (figure 57). Nous rappelons que l'activité plasmine est en fait le reflet de l'activité uPA.

Nous montrons que cette activité est augmentée d'un facteur 2 pour chacune des deux lignées lorsqu'elles sont traitées 24h avec RAP ( $0,46 \pm 0,03$  pour les FTC-133 traitées contre

0,21 ± 0,01 pour les non-traitées et 0,83 ± 0,04 pour les FTC-238 traitées contre 0,40 ± 0,02 pour les non-traitées).

Ces résultats sont donc en parfaite concordance avec les résultats observés au niveau protéique par zymographie et western blot (figure 56). Ils confortent ainsi l'idée d'un rôle très actif de LRP dans le catabolisme d'uPA au sein de ce modèle cellulaire.



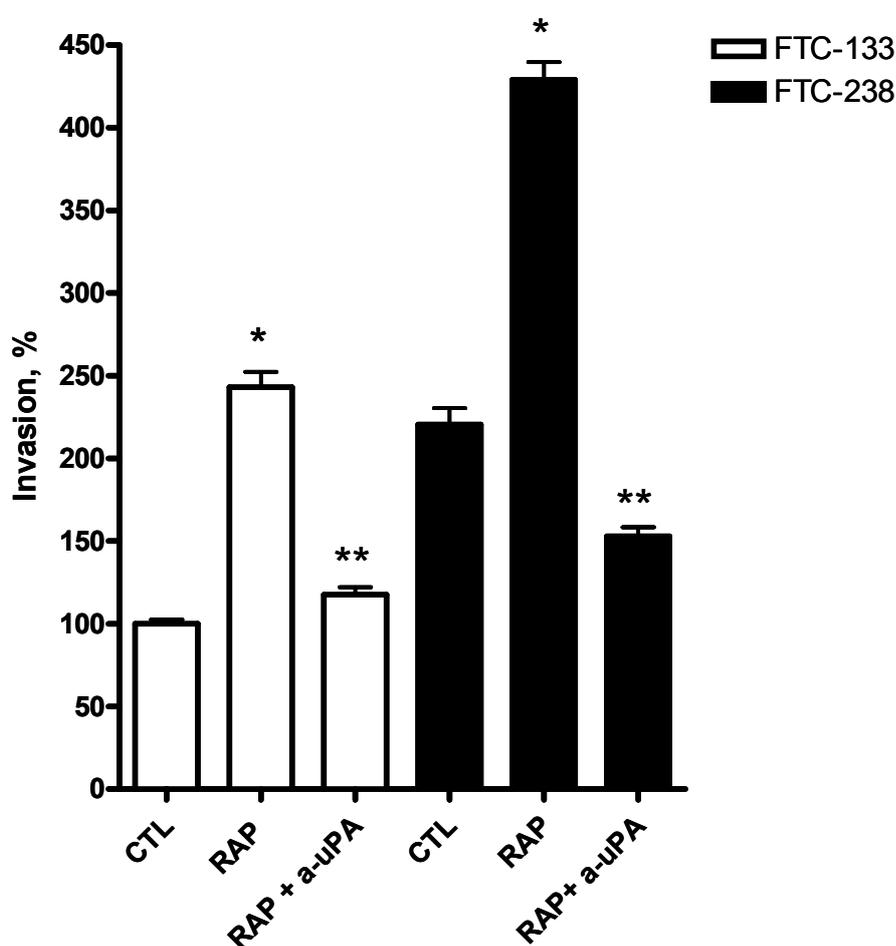
**Figure 57 :** Effet de la neutralisation de LRP sur l'activité plasmine dans les milieux conditionnés des cellules FTC. Les cellules FTC sont privées de SVF et traitées durant 24h avec 500nM RAP. Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et dia-filtrés afin d'éliminer le rouge de phénol. L'activité plasmine est mesurée via le clivage du substrat S-2251, et les variations d'absorbance sont mesurées à 405nm. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes des DO à 405nm ± SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata. \*,  $P < 0,01$  vs cellules FTC-133 non traitées. \*\*,  $P < 0,01$  vs cellules FTC-238 non traitées.

### VI-3 Effet de l'inhibition de l'activité d'uPA sur les capacités invasives des cellules FTC.

Nous avons montré que la diminution d'expression de LRP des cellules FTC-238 constitue un événement important lié au phénotype hautement invasif, et peut se situer à l'origine d'une accumulation d'uPA dans le milieu de culture. Nous avons également montré,

dans la première partie des résultats, qu'uPA joue un rôle prépondérant dans le caractère invasif de ces cellules. Le problème qui se pose maintenant est de déterminer si l'effet pro-invasif lié à la diminution d'expression de LRP est dépendante ou pas de l'accumulation d'uPA qui en résulte. Dans cette hypothèse, uPA doit pouvoir prévenir l'augmentation du pouvoir invasif induit par la neutralisation de LRP.

Pour ce faire, nous avons procédé à des tests d'invasion avec les deux lignées cellulaires en présence simultanée de RAP (500nM) et d'anticorps anti-uPA (25µg/ml). Les résultats sont présentés dans la figure 58.



**Figure 58 :** Effet de l'anticorps neutralisant anti-uPA sur le pouvoir invasif induit des cellules FTC. Les cellules ( $2.10^4$ ) sontensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec 40µg/ml de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h avec 500nM RAP ou co-incubées avec 500nM RAP et 25µg/ml anti-uPA. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes exprimées en pourcentages  $\pm$  SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicata, par rapport au contrôle FTC-133 non traitées, étaloné à 100%. \*,  $P < 0,01$  vs cellules non traitées. \*\*,  $P < 0,01$  vs cellules traitées par RAP.

Nous observons ainsi que le traitement avec l'anticorps anti-uPA prévient l'invasion induite par RAP pour les deux lignées cellulaires. En effet, alors que le traitement par RAP induit d'un peu plus de deux fois l'invasion cellulaire, le co-traitement RAP + anti-uPA ramène cette invasion à des valeurs comparables aux contrôles.

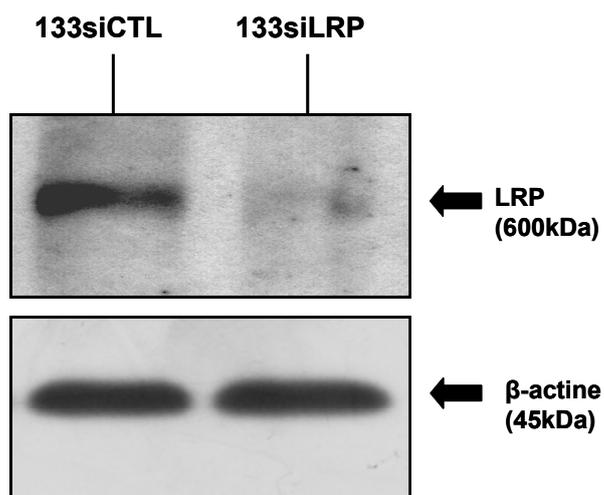
Ainsi, non seulement la protéase matricielle uPA joue un rôle très important dans le caractère invasif des cellules FTC-238, mais elle semble en plus être un acteur majeur dans l'influence de LRP sur le potentiel invasif de ces cellules. L'accumulation d'uPA dans le milieu péricellulaire, résultant de la diminution d'expression de LRP et donc de son déficit en endocytose, participe activement à l'augmentation du pouvoir invasif des cellules FTC-238.

Le récepteur d'endocytose LRP semble donc capable de réguler le potentiel invasif des cellules de carcinome folliculaire thyroïdien en provoquant l'internalisation et la dégradation de protéines matricielles favorisant l'invasion, tel que TSP-1 et uPA. De part sa fonction de régulateur du taux de ces protéines dans le milieu péricellulaire, la perte d'expression de LRP constituerait un événement majeur dans l'acquisition du phénotype invasif des cellules FTC-238.

## **VII-Effet de l'extinction génique de LRP par RNAi sur le potentiel invasif des cellules FTC-133.**

Afin d'approfondir nos investigations sur le rôle de LRP dans le pouvoir invasif des cellules de carcinome folliculaire thyroïdien, nous avons choisi d'inhiber directement son expression au sein de la lignée cellulaire FTC-133, qui l'exprime fortement à l'état sauvage, en utilisant la technique d'interférence à ARN (RNAi).

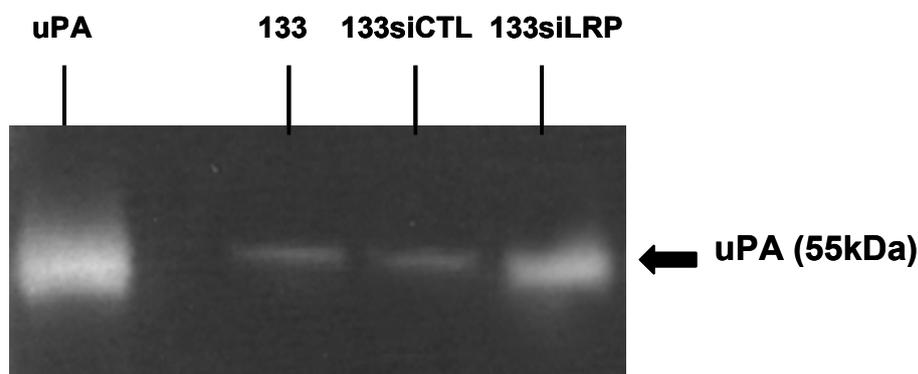
Pour cela, les cellules FTC-133 ont été transfectées de manière stable avec un vecteur plasmidique exprimant un siRNA reconnaissant une séquence cible de l'ARNm de LRP, en position 88 en aval du codon start ATG, comme précédemment décrit dans le chapitre "Matériel et méthodes". Grâce à cette technique, nous sommes parvenus à diminuer de plus de 90% l'expression de LRP dans les cellules FTC-133 (figure 59).



**Figure 59 :** Extinction de l'expression de LRP par siRNA dans les cellules FTC-133. Les cellules FTC-133 sont transfectées de manière stable avec le plasmide *pSuppressorNeo* contenant soit la séquence codant pour un siRNA hLRP (133siLRP), soit la séquence « scramble » codant pour un siRNA aléatoire servant de contrôle (133siCTL). Les cellules ainsi transfectées ( $5 \cdot 10^6$ ) sont lavées deux fois avec du PBS froid et les membranes plasmiques extraites par fractionnement cellulaire. Cette fraction enrichie en membranes plasmiques est ensuite analysée par western-blot avec un anticorps anti-LRP. L'utilisation d'anticorps anti-β-actine sert de contrôle de charge.

A partir de cette lignée cellulaire établie, dont l'expression de LRP est éteinte, nous avons observé l'accumulation d'uPA et mesuré l'activité plasmine dans le milieu de culture conditionné. Ceci afin de confirmer ce que nous avons déjà pu montrer précédemment par les

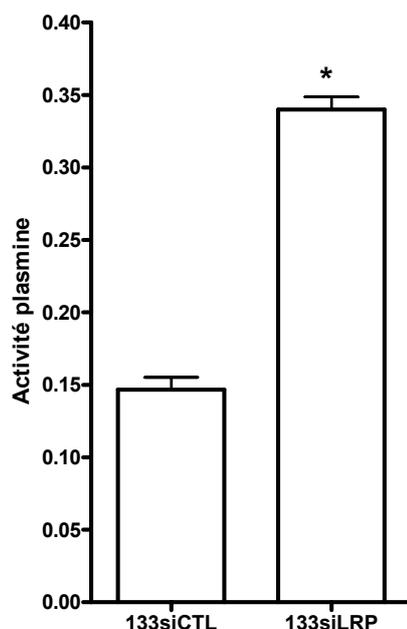
expériences de neutralisation du récepteur, à savoir que LRP est l'un des principaux régulateurs du catabolisme d'uPA, dans notre modèle cellulaire. Dans la figure 60, nous pouvons en effet voir que l'accumulation de la protéase est nettement augmentée dans le milieu de culture des cellules dont l'expression de LRP est éteinte (FTC-133siLRP).



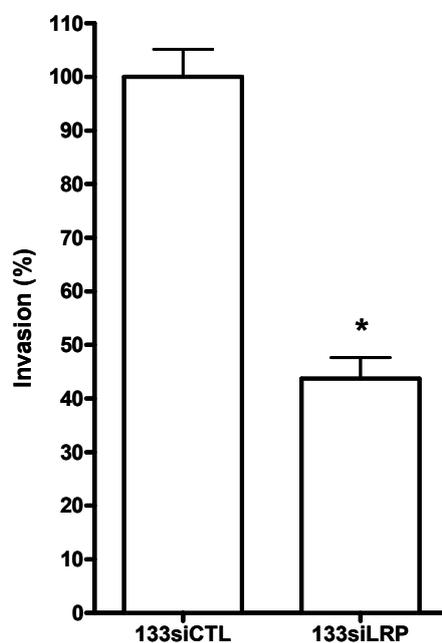
**Figure 60 :** Effet de l'extinction de LRP par siRNA sur l'accumulation d'uPA dans les milieux conditionnés des cellules FTC. Les cellules FTC-133 sont privées de SVF pendant 24h. Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et analysés par zymographie sur gel de gélatine additionné de plasminogène.

De plus, l'activité plasmine mesurée dans ces milieux de culture est environ 2,5 fois plus importante pour les FTC-133siLRP, comparée aux FTC-133siCTL (figure 61). Ce qui correspond à peu près à la différence observée entre des cellules traitées ou non par RAP, ou encore à celle observée entre les FTC-133 et FTC-238 en conditions basales (figure 57). En revanche, les tests d'invasion en Transwell, auxquels nous avons ensuite procédé, nous montrent que la lignée cellulaire, dont l'expression de LRP est éteinte, possède un potentiel invasif réduit d'environ 60% par rapport à celui de la lignée contrôle (figure 62).

Cet effet de l'extinction de LRP sur le potentiel invasif des cellules FTC-133, totalement en opposition à ce que nous nous observons lors des expériences de neutralisation du récepteur par RAP ou par l'anticorps polyclonal anti-LRP (#R2629) (figure 50), ne fera pas l'objet d'investigations supplémentaires dans le cadre de cette thèse. Néanmoins, ces observations seront à la base d'une autre thèse commencée au sein de notre équipe de recherche. Les premières hypothèses tentant d'expliquer ce phénomène seront apportées dans le chapitre « *Discussion* ».



**Figure 61 :** Effet de l’extinction de LRP par siRNA sur l’activité plasmine dans les milieux conditionnés des cellules FTC-133. Les cellules FTC-133 transfectées avec les siRNA sont privées de SVF durant 24h. Les milieux ainsi conditionnés sont récupérés et dialysés afin de les débarrasser de leur rouge de phénol. L’activité plasmine y est mesurée via le clivage du substrat S-2251, qui absorbe à 405nm. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes de DO à 405nm ± SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicate. \*,  $P < 0,01$ .



**Figure 62 :** Effet de l’extinction de LRP par siRNA sur le pouvoir invasif des cellules FTC-133. Les cellules FTC-133 ( $2 \cdot 10^4$ ) transfectées avec les siRNA sont ensemencées dans la partie supérieure des puits de Transwell recouverts avec 40µg/ml de Matrigel, puis sont incubées pendant 24h. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes en pourcentage ± SEM obtenues à partir de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en triplicate, par rapport FTC-133 transfectées avec les siRNA CTL, étalonné à 100%. \*,  $P < 0,01$ .

# *Conclusion, discussion et perspectives*

L'invasion tumorale est un événement multifactoriel dans lequel la motilité cellulaire est associée à une protéolyse matricielle et implique des interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire. Cette matrice joue un rôle clé dans la progression tumorale. En effet, les différents modules constitutifs des macromolécules matricielles ou certains ensembles de ces modules représentent, pour les cellules qui viennent à leur contact, des signaux reconnus par des récepteurs spécifiques de la famille des intégrines. Ces signaux aboutissent à la modulation de processus aussi divers que l'adhérence, la prolifération et la migration [Schenk et Quaranta, 2003]. La matrice est également un véritable réservoir de facteurs de croissance et de cytokines. L'action de protéases sur les macromolécules matricielles libère ces substances dans l'espace environnant, ainsi que des peptides dérivés des macromolécules qui peuvent par eux-mêmes posséder des activités biologiques parfois très différentes de celles des molécules dont ils sont issus. Ainsi, le peptide 185-203 du domaine NC1 de la chaîne  $\alpha 3$  du collagène IV est capable de bloquer la progression tumorale en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses et la production de MMPs [Pasco et coll., 2004]. En fait, la MEC est soumise à un continuel renouvellement alternant dégradation et synthèse. Ces remodelages tissulaires qui accompagnent la progression tumorale font appel à une coopération entre deux systèmes enzymatiques matriciels : les MMPs d'une part, et le système plasminogène/plasmine d'autre part.

Les MMPs sont toutes capables de dégrader au moins un des composants de la MEC et sont régulées *in vivo* par les inhibiteurs naturels et spécifiques TIMPs. Le renouvellement de la MEC est le résultat d'un phénomène dynamique dont le bon déroulement repose sur l'équilibre de trois événements principaux : la dégradation de ses constituants par des protéases spécifiques, dont les MMPs, la modulation de l'activité de ces enzymes par des inhibiteurs et la néosynthèse des protéines matricielles. Dans certains cas, cet équilibre est rompu : l'expression et la sécrétion des MMPs deviennent largement excédentaires par rapport aux TIMPs. Ceci est particulièrement observé dans le cadre de la pathologie tumorale, favorisant ainsi le développement de la tumeur primaire et la formation de métastases [Hofmann et coll., 2000]. Les MMPs se trouvent ainsi impliquées dans les différentes étapes de la progression tumorale, telles que la perte d'adhérence, l'invasion, la prolifération et l'angiogenèse [Chang et Werb, 2001 ; Chantrain et DeClerck, 2002 ; Egeblad et Werb, 2002]. De manière générale, peu d'études associent l'expression et l'activation de ces enzymes à un bon pronostic.

Assez peu de travaux ont été menés concernant l'expression et le rôle de MMP2 dans la progression tumorale des cellules thyroïdiennes. Les sites de production et l'importance de cette protéase et de son inhibiteur TIMP2 dans les processus invasifs et métastatiques des carcinomes thyroïdiens restent toujours controversés. Cependant, il semblerait que les activités MMPs, et particulièrement celle de MMP2, semblent être étroitement associées avec le potentiel métastatique des carcinomes thyroïdiens [Demeure et coll., 1992 ; Kraiem et Korem, 2000]. Des études immunohistochimiques ont permis de montrer que l'expression de la MMP2 était augmentée dans les cancers thyroïdiens et leurs métastases par rapport aux tissus sains [Campo et coll., 1992]. De plus, les tumeurs agressives étudiées présentent une expression de la protéase matricielle supérieure à celle des tumeurs bénignes. En parallèle, des études par hybridation *in situ* ont montré que l'expression de la MMP2 était limitée aux fibroblastes du stroma adjacent aux tumeurs thyroïdiennes les plus invasives [Zedenius et coll., 1996].

Des travaux précédemment réalisés au laboratoire, en collaboration avec l'équipe d'anatomo-pathologie du CHU Robert Debret (Reims), tendent à montrer que la MMP2 serait impliquée dans le remodelage de la matrice extracellulaire en pathologie cancéreuse thyroïdienne. En effet, la forme active de la MMP2 est préférentiellement détectée dans les cas de carcinomes papillaires infiltrants et anaplasiques. De plus, l'augmentation de sécrétion et l'activation de la MMP2 semble être liées à la présence de métastases ganglionnaires [Patey, 2002 ; Delorme, 2003]. En parallèle, l'analyse de la sécrétion de MMP2 dans les milieux conditionnés de thyrocytes porcins en culture primaire révèle que la dédifférenciation de ces cellules induite par le TGF- $\beta$ 1 s'accompagne de l'apparition de la forme active de la protéase matricielle. Cette apparition pourrait être expliquée par le fait que le TGF- $\beta$ 1 induit la sécrétion de l'uPA [Delorme, 2003] ainsi que l'expression de l'intégrine  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>3</sub> chez les thyrocytes porcins [Claisse et coll., 1999]. Or, uPA et l'intégrine  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>3</sub> peuvent faciliter la deuxième phase d'activation de la pro-MMP2 [Brooks et coll., 1996 ; Nagase, 1997].

Dans cette étude, où nous comparons deux lignées de carcinomes folliculaires thyroïdiens aux potentiels invasifs différents, nous avons montré par zymographie et western blot que les cellules les plus invasives, les FTC-238, sécrètent plus de MMP2. De plus, la forme active de la protéase est détectable par zymographie chez cette lignée, alors qu'elle reste difficilement détectable dans les cellules peu invasives FTC-133. L'analyse par RT-PCR des ARNs messagers a montré que cette augmentation de sécrétion et d'activation de MMP2

chez les cellules FTC-238 est accompagnée d'une plus forte expression de son gène au sein de ces cellules. Enfin, nous avons observé par zymographie *in situ* que les cellules FTC-133 présentent une très faible activité gélatinase. En effet, le signal y est difficilement détectable. En revanche, les cellules FTC-238 montrent une activité plus importante et très localisée en certains endroits de leur surface cellulaire. Parallèlement, ni l'étude des ARNs messagers de TIMP2 par RT-PCR, ni celle de la protéine par western blot, à partir des milieux conditionnés ne parviennent à révéler l'expression de l'inhibiteur dans aucune des deux lignées cellulaires.

La différence d'expression, de sécrétion et d'activation de la MMP2 entre la lignée cellulaire peu invasive et celle plus invasive est en concordance avec la plupart des observations reportées dans la littérature jusqu'à présent, à partir de tumeurs thyroïdiennes ou de tout autre type de tumeur en général. En revanche, la non-expression de TIMP2 par les cellules FTC-238 est plus surprenante, dans la mesure où son rôle dans l'activation de la MMP2, en partenariat avec la MT1-MMP, a été clairement admis et démontré par le passé (Cf. *Introduction, chap. III-3-2-2*). L'hypothèse que nous pouvons avancer pour tenter d'expliquer ce phénomène est que dans notre modèle cellulaire, l'activation de la MMP2 ne serait pas exclusivement dépendante de la MT1-MMP. Elle pourrait, en effet, être causée par d'autres protéases matricielles sécrétées par ces cellules, telle qu'uPA.

Suite à ces observations, nous avons tenté de mettre en évidence le rôle de la MMP2 dans le potentiel invasif des cellules FTC. Nous avons pu constater que bien que l'expression et l'activation de la MMP2 soient supérieures pour les cellules FTC-238, l'activité MMP2 ne semble cependant pas requise ni même impliquée dans le potentiel invasif de celles-ci. En effet, lors de tests d'invasion *in vitro* effectués avec ces cellules et dans lesquels nous avons inhibé l'activité MMP2, aucune modification du comportement invasif n'a pu être observée. Ni l'ajout de TIMP2, ni celui de Galardin, un inhibiteur synthétique, ne parviennent à provoquer, dans nos conditions expérimentales, une diminution significative de l'invasion basale pour les deux lignées cellulaires.

La seconde classe de protéases matricielles connues pour être fortement impliquée dans l'invasion tumorale est le système plasminogène/plasmine. En effet, l'importance des composants de ce système dans les processus physiopathologiques tels que la fibrinolyse, l'adhérence, la migration et l'invasion cellulaire a été largement démontrée dans la littérature [Andreasen et coll., 1997 ; Irigoyen et coll., 1999 ; Ossowski et Aguirre-Ghiso, 2000 ; Lijnen, 2001 ; Binder et coll., 2002]. L'uPA est une protéase qui possède une grande spécificité

envers le plasminogène, dont il peut cliver la forme simple chaîne pour former la plasmine active. Il peut ainsi activer, de manière indirecte, divers MMPs latentes, à travers le plasminogène. L'uPA est toutefois incapable de cliver directement la laminine, la fibronectine ou les collagènes [Liotta et coll., 1981]. Cette protéase matricielle est exprimée par un grand nombre de types cellulaires et sa surexpression est souvent corrélée à la tumorigénèse [Andreasen et coll., 1997 et 2000]. De nombreuses évidences, obtenues à partir de tests de migration *in vitro* supportent l'idée que le système plasminogène/plasmine régule la migration cellulaire [Estreicher et coll., 1990 ; Morimoto et coll., 1993 ; Quax et coll., 1994]. Cependant, les effets d'uPA sur la migration cellulaire peuvent être causés aussi bien par des mécanismes protéolytiques que non-protéolytiques [Wang et coll., 1995 ; Kjoller et coll., 1997 ; Chazaud et coll., 2000]. L'effet pro-migratoire d'uPA peut impliquer la génération de plasmine au niveau des contacts focaux, catalysée par la liaison d'uPA à son récepteur uPAR, ce qui conduit à la dégradation de la MEC et facilite le détachement du front arrière des cellules [Pollanen et coll., 1987]. Cependant, dans un mécanisme non-protéolytique, uPA peut également stimuler la migration cellulaire en favorisant l'adhésion du front de migration de la cellule, à travers la stimulation de la liaison de uPAR à la vitronectine, la modulation des interactions uPAR/intégrines et/ou par l'initiation de cascades de transduction du signal [Gyetko et coll., 1994 ; Sitrin et coll., 1996]. En effet, la migration induite par uPA est associée à une activation rapide et transitoire de la phosphorylation sur sérine et tyrosine [Busso et coll., 1994], des activations de kinases Src [Bohuslav et coll., 1995], de FAK, de MAPK et de JAK [Tang H et coll., 1998 ; Dumler et coll., 1999]. Ces deux mécanismes d'action peuvent s'opérer simultanément dans la cellule en migration. La signalisation induite par uPAR, ainsi que sa liaison à la vitronectine et aux intégrines peuvent jouer un rôle direct au niveau du front de migration de la cellule, alors que l'activation de l'uPA aux fronts arrière et ventrale conduit au clivage de protéines matricielles, modifiant ainsi la nature du substrat et facilitant le détachement du front arrière de la cellules.

A nouveau, peu de travaux ont été menés concernant l'expression et le rôle d'uPA dans la progression tumorale des cellules thyroïdiennes. Une étude réalisée sur 129 cas a permis de montrer par dosage ELISA que les tumeurs de patients atteints de cancers thyroïdiens expriment faiblement le tPA et fortement uPA et PAI-1 [Kushlinskii et coll., 2001]. Les patients atteints de maladies bénignes de la thyroïde, incluant les adénomes, présentent en revanche un taux élevé de tPA et de faible taux d'uPA et de PAI-1. Une autre étude a montré par une méthode immunohistochimique que l'uPA était exprimé dans les

carcinomes thyroïdiens mais pas dans les adénomes bénins ni dans les follicules normaux adjacents [Chu, Hurd et coll., 2004]. Les auteurs suggèrent ainsi que l'expression sélective de l'uPA dans les carcinomes thyroïdiens fournit l'évidence que l'uPA pourrait être utilisé pour distinguer les néoplasmes thyroïdiens bénins et malins. Enfin, Ulisse et coll. (2006) ont tout récemment mis en évidence une plus forte activité uPA dans les surnageants de culture de cellules tumorales thyroïdiennes comparée aux surnageants de thyrocytes normaux. Ils ont également établi, par RT-PCR quantitative, une surexpression d'uPA dans les cellules de carcinomes, ainsi qu'une corrélation de l'expression d'uPA avec la taille des tumeurs et la formation de métastases.

Des travaux préalables effectués au sein du laboratoire ont permis d'établir une corrélation entre l'état de différenciation de thyrocytes porcins en culture primaire et une sécrétion différentielle des deux types d'activateurs du plasminogène. En effet, les thyrocytes différenciés expriment majoritairement le tPA alors que les thyrocytes dédifférenciés expriment majoritairement l'uPA. Dans ce modèle cellulaire, l'uPA jouerait un rôle dans la déstructuration folliculaire et favoriserait l'étalement des thyrocytes induit par le TGF- $\beta$ 1 lors d'un processus de dédifférenciation [Delorme, 2003]. Il semblerait toutefois que ce soit le rôle de ligand des PAs qui prévale sur le rôle enzymatique dans ces processus observés, comme cela a été démontré par Bonavaud et coll. (1997) et Chazaud et coll. (2000) dans les processus de fusion et de migration de cellules myogéniques humaines. Il est intéressant de noter que la balance du tPA vers celle de l'uPA n'est pas spécifique du TGF- $\beta$ 1, elle est également induite par le TPA, un ester de phorbol promoteur de tumeur.

Dans ce travail, nous avons montré par zymographie et par western blot que les cellules les plus invasives présentent une accumulation d'uPA bien plus importante dans leur milieu de culture conditionné que les cellules moins invasives. L'analyse des ARN messagers révèle néanmoins que l'expression du gène est sensiblement identique entre les deux lignées cellulaires. Nous avons également observé par zymographie *in situ* que les cellules FTC-133 présentent une activité plutôt diffuse au niveau de la surface cellulaire et dans le cytoplasme, alors que les cellules FTC-238 présentent une répartition de l'activité uPA plus localisée et intense au niveau péri-cellulaire. En parallèle, l'étude des ARN messagers de PAI-1 par RT-PCR et celle de la protéine par western blot, à partir des milieux conditionnés montrent que les cellules FTC-238 expriment et sécrètent moins de cet inhibiteur que les cellules FTC-133.

La différence d'expression et de sécrétion de l'uPA entre la lignée cellulaire peu invasive et celle plus invasive est en accord avec la grande majorité des observations reportées dans la littérature à partir de divers modèles cellulaires ou tissulaires. En effet, la surexpression de cette protéase matricielle est très souvent associée à l'invasion tumorale et peu d'études, en général, associent l'expression d'uPA à un bon pronostic. La diminution d'expression et de sécrétion de PAI-1 dans la lignée la plus agressive n'est pas illogique non plus, lorsque que cette protéine est considérée comme inhibiteur de l'activité uPA. De plus, il a été montré que PAI-1, en se liant à uPA, pouvait induire son internalisation *via* LRP [Ossowski et Aguirre-Ghiso, 2000 ; Herz et Strickland, 2001]. Ainsi, une diminution de PAI-1 dans le milieu péricellulaire entraînerait une augmentation de l'activité protéasique d'uPA, par diminution de son catabolisme et induirait donc une forte dégradation de la matrice, nécessaire à l'invasion. Cependant, le rôle de PAI-1 dans l'invasion cellulaire reste controversé. En effet, PAI-1 a également été montré comme favorisant l'invasion de cellules cancéreuses mammaires en prévenant la dégradation excessive de la matrice associée à l'activité protéolytique de la plasmine [Pappot et coll., 1995 ; Tong, Czerwenka et coll., 1999].

Après avoir mis en évidence une plus grande accumulation et activité d'uPA dans les milieux de culture des cellules FTC-238, nous avons montré grâce à des tests d'invasion *in vitro* que l'uPA joue un rôle majeur dans le pouvoir invasif basal des cellules de carcinome folliculaire thyroïdien. En effet, nous sommes parvenus à augmenter ce potentiel chez les deux lignées cellulaires en ajoutant de l'uPA exogène, amenant l'invasion des cellules FTC-133 à un niveau comparable à celle des FTC-238 en condition basale. De plus, l'inhibition de l'activité uPA à l'aide d'un anticorps neutralisant anti-catalytique permet d'inhiber largement le pouvoir invasif basal des cellules FTC-238, le ramenant à un niveau comparable à celui des cellules FTC-133. Par ailleurs, le fait d'obtenir le même type de résultats avec l'utilisation de l'aprotinine, inhibiteur de la plasmine, tend à montrer que les effets d'uPA observés sur les capacités invasives des cellules FTC sont essentiellement la conséquence de son activité protéolytique.

Ainsi, des deux principaux systèmes enzymatiques étudiés, uPA semble être, dans nos conditions expérimentales, le principal acteur impliqué dans le pouvoir invasif des lignées de carcinome folliculaire thyroïdien FTC-133 et FTC-238. En effet, bien que nous ayons mis en évidence une augmentation d'expression et d'activation de MMP2 chez les cellules les plus

invasives, nous ne sommes pas parvenus à observer un quelconque effet de l'inhibition de cette protéase matricielle sur les capacités invasives basales des cellules FTC.

Nous ne sommes pas les seuls à avoir procédé à ce genre d'étude sur ce modèle cellulaire. Packman et coll. (1995) avait montré à l'aide des techniques de zymographie, western-blot et immunocytochimie que les cellules FTC-238 sécrétaient davantage d'uPA et de MMP2 que les cellules FTC-133 et que l'activité uPA était augmentée chez les deux lignées cellulaires en présence de TPA de manière dose-dépendante. Quelques années plus tard, une autre équipe a montré que la dégradation de la matrice extracellulaire par les cellules FTC pouvait être inhibée par l'aprotinine ou par un anticorps anti-uPA, démontrant ainsi l'implication du système d'activation de la plasmine dans ce processus [Smit et coll., 1999]. Il fut montré également que cette dégradation pouvait aussi être inhibée par l'utilisation de Marimastat, un inhibiteur à large spectre de MMPs, démontrant ainsi également l'implication des MMPs dans ces lignées cellulaires. Ces observations laissent donc à supposer que les MMPs, pourraient jouer un rôle dans les capacités invasives des cellules FTC. Nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence ce rôle dans notre étude et à notre connaissance, il n'a toujours pas été démontré à ce jour. Il convient de noter également que cette équipe a révélé une expression différentielle de PAI-1 en totale opposition avec ce que nous avons montré ici. En effet, il a été observé une expression de l'inhibiteur chez les cellules FTC-238 mais pas chez les cellules FTC-133. Or, Ulisse et coll. (2006) ont tout récemment mis en évidence par RT-PCR quantitative la présence de transcrits PAI-1 ainsi que celle de la protéine, par zymographie, dans les milieux conditionnés des cellules FTC-133.

Nous avons donc mis en évidence une augmentation d'expression génique de MMP2, ainsi qu'une plus forte accumulation et activation, chez les cellules FTC-238. Nous avons également montré une plus forte accumulation et activité d'uPA, ce qui semble leur conférer un potentiel invasif accru. Nous avons alors cherché à comprendre quelles pouvaient en être les causes. La compréhension des mécanismes de régulation de l'activité protéasique semble en effet essentielle pour expliquer l'invasion cellulaire [Westermarck et Kahari, 1999].

Plusieurs études ont démontré le rôle important de la protéine matricellaire d'adhérence TSP-1 dans la régulation de l'activité protéasique matricielle, et notamment dans celle de MMP2 et du système plasminogène/plasmine. En effet, les fonctions adhésives de TSP-1 sont fortement reliées à son implication dans la protéolyse péricellulaire associée à

l'invasion tumorale. Ainsi, TSP-1 est capable de lier différentes protéases, telles que l'uPA et la plasmine et de moduler positivement ou négativement leurs activités [Silverstein et coll., 1986 ; Silverstein et coll., 1990 ; Hosokawa et coll., 1993 ; Bornstein, 1995]. Par exemple, Silverstein et coll. ont montré en 1990 que les complexes TSP-1/uPA possèdent une activité « activateur du plasminogène » équivalente à celle de l'uPA libre, mais sont protégés de l'inhibition par PAI-1. TSP-1 constituerait donc, pour ses auteurs, un environnement protecteur pour l'uPA. Hosokawa et coll. (1993) ont montré en revanche que TSP est capable d'inhiber la fibrinolyse chez des cellules de carcinome de poumon en inhibant l'activité de l'uPA sécrété par ces cellules.

La régulation de la synthèse et de la sécrétion des protéases et de leurs inhibiteurs est également une cible potentielle de l'activité de TSP-1 [Farina et coll., 1998]. Par exemple, TSP-1 favorise la production de PAI-1 et stimulent l'attachement des cellules tumorales de carcinome pulmonaire. TSP-1 stimulent également *in vitro* l'expression de PAI-1 dans des cancers pancréatiques [Albo et coll., 1999]. Par ailleurs, la TSP-1 produite dans les cellules tumorales mammaires est capable d'induire l'invasion tumorale en stimulant l'expression d'uPA [Albo et coll., 1997 ; Albo et coll., 2000].

En parallèle, Bein et Simons (2000) ont montré que TSP-1 pouvait interagir avec MMP2 et la nature inhibitrice de cette interaction a été démontrée. En effet, il en résulte une diminution de l'activité gélatinolytique de MMP2. Le fait que le domaine de liaison de MMP2 se trouve dans la partie catalytique de la gélatinase apporte une explication à l'inhibition de son activité. Bien que MMP2 interagisse avec TSP-1, celle-ci n'est pas dégradée *in vitro* par l'enzyme. Toutefois, une même molécule de TSP-1 représente une seule et même source d'activation et d'inhibition de MMP2. En effet, Taraboletti et coll. (2000) ont testé les propriétés du domaine de liaison à l'héparine de 25 kDa et celles du fragment C-terminal de 140 kDa de la TSP-1 dans la sécrétion et l'activation de la MMP2 et du TIMP2. Ils ont ainsi pu montrer *in vitro* que la TSP-1 entière ainsi que le fragment de 25 kDa stimule la sécrétion de pro-MMP2 et induit son activation chez les cellules endothéliales. Le fragment de 140 kDa n'affecte par contre ni la production, ni l'activation de la protéase matricielle. De plus, l'analyse des ARNs messagers codant pour TIMP2 révèle que le fragment de 140 kDa induit une augmentation par 2 de l'expression constitutive de l'inhibiteur, alors que le fragment de 25 kDa la réduit de moitié. Enfin, différentes études suggèrent une régulation de

l'expression de ces protéases via l'activation induite par TSP-1 de TGF $\beta$  [Sheibani et Frazier, 1995 ; Schultz-Cherry et Murphy-Ulrich, 1993 ; Schultz-Cherry et coll., 1994].

Quelques études ont associé l'expression de la TSP-1 à la pathologie thyroïdienne, mais aucune autre équipe, à notre connaissance, ne s'est intéressée en particulier aux lignées FTC-133 et FTC-238.

Patel et coll. (1996) ont mis en évidence par immunohistochimie une diminution d'expression de TSP-1 dans les thyroïdes hyperplasiques (goitre diffus), accompagnant l'angiogenèse. Ils ont avancé l'hypothèse que cette diminution d'expression pourrait jouer un rôle dans la néovascularisation qui s'opère lors de la formation de goitre. Bunone et coll. (1999) ont ensuite montré par RT-PCR et marquages immunohistochimiques une diminution d'expression de TSP-1 dans les carcinomes thyroïdiens les plus agressifs. Ces données ont été confirmées par des analyses statistiques qui ont montré une association stricte entre la diminution de TSP-1 et la capacité des tumeurs à former des métastases à distance. En effet, ils ont trouvé une réduction significative de TSP-1 chez les patients présentant des métastases distantes. Ainsi les profils d'expression de TSP-1 semblent être corrélés avec l'invasion des tumeurs thyroïdiennes. En outre, juste en se basant juste sur les niveaux d'expression de TSP-1, il leur était possible de distinguer les adénomes bénins des carcinomes folliculaires thyroïdiens malins. Un peu plus tard, Tanaka et coll. (2002) ont confirmé une corrélation inverse entre l'expression de TSP-1 et le degré d'invasion de cellules de carcinomes papillaires thyroïdiens dans les organes adjacents. Enfin, Scarpino et coll. (2005) ont observé récemment à partir de sections tissulaires, et par des techniques d'immunohistochimie, que TSP-1 était associée au stroma tumoral fibreux de carcinomes papillaires thyroïdiens et plus particulièrement dans les régions adjacentes aux membranes basales des cellules tumorales. Par ailleurs, ils ont mis en évidence que le taux d'expression d'ARNm de TSP-1 était significativement réduit dans les tissus tumoraux comparé aux tissus normaux de la thyroïde.

Des travaux préalables effectués par notre équipe de recherche ont corrélé la production de TSP-1 par des thyrocytes porcins adhérents en culture primaire avec leur état de différenciation [Bellon et coll., 1994 ; Claisse et coll., 1999]. En effet, les agents qui inhibent la synthèse de TSP-1 (TSH) induisent la folliculogenèse, alors que ceux qui l'activent (TGF- $\beta$ 1) empêchent cette folliculogenèse. Claisse et coll. (1999), ainsi que Pellerin et coll. (1999), ont en outre montré que TSP-1 est responsable de l'étalement cellulaire induit par des agents dédifférenciants et que ce sont le domaine de liaison à l'héparine et celui

contenant la séquence RGD qui semblent impliqués dans ce processus. N. Delorme (2003) montra ensuite que le TGF- $\beta$ 1 induit l'expression de l'uPA et l'activation de la pro-MMP2 sécrétée par les thyrocytes, parallèlement à la synthèse de TSP-1. Cependant, les interactions thyrocytes/TSP-1 immobilisée n'ont pas permis de reproduire l'activation de la pro-MMP2. De même, l'ajout de TSP-1 en solution dans les milieux de culture ne reproduit ni l'expression d'uPA, ni l'activation de la pro-MMP2, même si elle reproduit l'étalement des thyrocytes induit par le TGF- $\beta$ 1.

Dans un autre registre, notre équipe a également montré, en collaboration avec le laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU Robert Debret à Reims, que l'expression de la TSP-1 s'avère plutôt un facteur de bon pronostic dans les cancers thyroïdiens [Patey et coll., 1999]. En effet, TSP-1 n'apparaît pas comme un facteur prédictif de malignité mais comme le témoin d'un remodelage de la matrice extracellulaire du stroma des carcinomes papillaires par rapport aux carcinomes folliculaires, plus agressifs. Ces observations rejoignent donc celles faites par Bunone et coll. (1999). De plus, dans des différents cas de carcinomes papillaires infiltrants étudiés, lorsque la TSP-1 est présente dans la matrice extracellulaire, la présence de la forme active de la MMP2 est mise en évidence sous forme de trace. Par contre, lorsque la TSP-1 est peu abondante ou absente de la matrice, la forme active de la MMP2 y est détectée en quantité plus importante [Delorme, 2003]. De la même manière, l'absence de TSP-1 dans le stroma des carcinomes anaplasiques, en dehors des vaisseaux, semble se traduire par une augmentation de la présence de la forme active de la MMP2.

Ainsi, les travaux effectués précédemment au laboratoire ont montré qu'outre son rôle dans la morphologie, l'adhérence et l'étalement des thyrocytes porcins en culture primaire, TSP-1 jouerait également un rôle dans la régulation de la protéolyse de la MEC *via* ses interactions avec l'uPA et la MMP2.

Afin de mieux comprendre le rôle de TSP-1 dans la régulation de ces deux protéases matricielles et dans le potentiel invasif des cellules de carcinomes folliculaires thyroïdiens, nous avons observé son expression et sa sécrétion dans les lignées FTC-133 et FTC-238. L'analyse par RT-PCR a montré une nette augmentation de la quantité de transcrits codant pour TSP-1 dans les cellules hautement invasives FTC-238. Cette augmentation est accompagnée d'une accumulation encore plus nette de la protéine dans le milieu conditionné de ces cellules. Ces observations ont été confirmées par immunofluorescence. En effet, l'observation par microscopie confocale des cellules immunomarquées pour la TSP-1 permet

de mettre en évidence une plus forte expression de la protéine au sein des cellules FTC-238. Ainsi, les cellules les plus invasives présentent un plus grand taux de transcription des ARNm codant pour TSP-1, ainsi qu'une plus grande sécrétion de celle-ci dans leur milieu péri-cellulaire. Ces observations sont donc en opposition avec celles précédemment effectuées par Bunone et coll. (1999) et par notre équipe de recherche à partir de coupes tissulaires de carcinomes thyroïdiens [Patey et coll., 1999 ; Delorme, 2003].

Afin de mettre en évidence le rôle de TSP-1 dans la régulation du potentiel invasif des cellules FTC, nous avons procédé à des tests d'invasion *in vitro*, au cours desquels nous avons traité les cellules avec de la TSP-1 en solution ou avec un anticorps monoclonal neutralisant dirigé contre TSP-1. Nous avons ainsi montré que TSP-1 est capable d'induire une augmentation du pouvoir invasif d'un facteur 2 pour les deux lignées cellulaires. En revanche, sa neutralisation par l'anticorps entraîne une diminution par 2 du pouvoir invasif. TSP-1 semble donc bien jouer un rôle dans la régulation du pouvoir invasif des cellules FTC. L'augmentation d'expression de TSP-1 pourrait ainsi constituer un des mécanismes impliqués dans l'acquisition du phénotype hautement invasif des cellules FTC-238.

Nous avons montré que les cellules FTC-238 expriment et sécrètent davantage de TSP-1 que les cellules FTC-133 et que TSP-1 est impliquée dans le caractère invasif de ces cellules. Nous avons également mis en évidence l'augmentation de sécrétion et d'activation de MMP2 et d'uPA, ainsi que le rôle actif d'uPA dans le pouvoir invasif basal des cellules FTC. Connaissant le rôle possible de TSP-1 dans la régulation des activités protéasiques d'uPA et de MMP2, nous avons donc cherché à comprendre si l'effet de TSP-1 sur l'invasion des cellules FTC était dépendant de l'activité de ces deux protéases matricielles.

Après avoir mis en évidence, grâce à la technique de co-immunoprécipitation, que TSP-1 était bien capable d'interagir avec MMP2 et uPA dans notre modèle cellulaire, nous avons testé la capacité de TSP-1 à induire l'expression et l'activation des deux protéases. Nous avons montré que ni le traitement des cellules par la TSP-1, ni celui par l'anticorps neutralisant ne provoquent de changement dans l'expression, la sécrétion ou l'activation de MMP2 dans nos conditions expérimentales. Ces traitements n'entraînent pas davantage de différences sur l'expression d'uPA. En revanche, les analyses par western blot révèlent que l'ajout de TSP-1 induit une augmentation de la sécrétion d'uPA dans les milieux de culture, alors que la neutralisation de TSP-1 provoque une diminution de celle-ci. De plus, les analyses de mesure de l'activité plasmine nous montrent que celle-ci est augmentée lorsque les cellules sont traitées par TSP-1 et inhibée lorsque les cellules sont traitées par l'anticorps

neutralisant. Enfin, nous avons montré que l'invasion induite par TSP-1 ne pouvait être réprimée par l'ajout d'inhibiteur de la MMP2, tels que TIMP2 ou la galardine. En revanche, l'inhibition de l'activité uPA grâce à l'utilisation de l'anticorps bloquant dirigé contre uPA ou grâce à l'aprotinine, l'inhibiteur du plasminogène, parvient à inverser l'effet inducteur de la TSP-1 sur l'invasion.

L'augmentation de la synthèse de MMP2, ainsi que son accumulation dans le milieu de culture des cellules FTC-238 ne semble donc pas être directement la conséquence de la surexpression de TSP-1 par ces cellules. De plus, l'invasion induite par TSP-1 n'est pas significativement altérée par l'inhibition de la MMP2. Ces résultats suggèrent que dans nos conditions expérimentales, la MMP2 n'est pas impliquée dans le contrôle de l'agressivité par TSP-1 des cellules FTC 238.

A l'opposé, TSP-1 est capable de stimuler le potentiel invasif des cellules FTC en provoquant une augmentation d'uPA et de son activité dans le milieu extracellulaire des cellules FTC, sans induire sa surexpression. Nous pouvons penser que l'interaction entre TSP-1 et uPA constituerait une protection d'uPA vis à vis de la dégradation par protéolyse. Une autre explication possible serait que cette interaction préviendrait la complexation de la protéase à son inhibiteur PAI-1 et/ou à son récepteur uPAR, et donc son internalisation par la cellule *via* LRP.

Il conviendrait cependant, afin de confirmer nos résultats sur le rôle de TSP-1 dans l'expression de MMP2 et uPA, de procéder à des cinétiques d'expression pour les cellules FTC traitées avec TSP-1 ou l'anti-TSP-1, dans des temps plus courts. Il conviendrait également d'analyser l'expression des deux protéases matricielles chez des lignées cellulaires dont le gène de la TSP-1 aura été invalidé, soit par ADNc anti-sens, soit par RNAi.

Beaucoup de données tendent à classer TSP-1 comme un agent anti-tumoral. Toutefois, des résultats controversés ont déjà été obtenus et les effets de TSP-1 semblent spécifiques du type de tumeur et des modèles expérimentaux étudiés [Sid et coll., 2003]. Par exemple, des cellules de carcinome squameux transfectées avec TSP-2 et injectées dans des souris *nude* en intradermique provoquent le développement de tumeurs de plus petite taille que la lignée cellulaire sauvage [Streit et coll., 1999]. A l'opposé, une autre équipe avait pourtant montré que l'extinction de TSP-1 dans une autre lignée de cellules de carcinome squameux, exprimant constitutivement la protéine matricellaire, induisait une réversion du

phénotype malin de ces cellules [Castle et coll., 1991]. De plus, l'administration d'anticorps anti-récepteur de TSP-1 inhibe *in vivo* le développement tumoral de cellules de cancer du sein [Wang, Qian et coll., 1996]. Dans un autre registre, plusieurs études attribuent un rôle important de TSP-1 dans l'induction des composants du système plasminogène/plasmine et par conséquent dans la promotion de l'invasion tumorale, à travers une diminution de l'adhésion cellulaire [Arnoletti et coll., 1995 ; Albo, Berger et coll., 1997 ; Albo, Rothman et coll., 2000 ; Albo et Tuszynski, 2004].

Une explication possible à ces observations contradictoires pourrait être liée aux différences dans la capacité des diverses lignées cellulaires tumorales à lier TSP-1, plutôt que de leur capacité à la synthétiser. Il est en effet connu que des lignées cellulaires différentes expriment des récepteurs à TSP-1 différents avec des affinités variables pour leur ligand. Or les fonctions cellulaires de TSP-1 sont médiées par ces récepteurs de surface cellulaire spécifiques [Bornstein, 1995 ; Yabkowitz et Dixit, 1991].

Taraboletti et coll. (2000) précédemment cités, ont montré que différents fragments de la TSP-1 pouvaient agir en opposition sur l'angiogenèse, et donc sur l'invasion de cellules endothéliales. Ils en concluent que cette dualité d'action de la TSP-1 dépend de l'environnement de la molécule. Son rôle pro- ou anti-angiogénique, et par extension, pro ou anti-invasif, dépendrait donc de la partie disponible ou fonctionnelle de la molécule dans une situation donnée. Les fragments seraient libérés *in vivo* par protéolyse de la molécule intacte, générant ainsi des peptides actifs dits "matrikines" capables d'interagir avec la cellule en migration. Une autre hypothèse serait que l'interaction de la TSP-1 avec d'autres molécules masquerait certains domaines et engendrerait des effets différents voir antagonistes selon le domaine concerné [Sargiannidou et coll., 2001]. Des effets opposés peuvent également être observés en fonction de la concentration de TSP-1 utilisée [Qian et coll., 1997] ou de sa conformation. En effet, Chandrasekaran et coll. (2000) ont démontré des effets inverses sur l'angiogenèse de la TSP-1 immobilisée par rapport à la TSP-1 soluble pour des cellules endothéliales aortiques bovines.

Enfin, tout récemment, notre équipe de recherche a mis en lumière pour la première fois l'effet du domaine de liaison au CD47 de la TSP-1 sur les activités apoptotiques de cellules thyroïdiennes tumorales et non-tumorales [Rath et coll., 2006 ; Rath et coll., 2006]. Ce domaine C-terminal de la TSP-1 est capable de protéger les thyrocytes en culture primaire contre l'apoptose induite par les céramides et de prévenir l'apoptose induite par les deux

drogues anti-tumorales, que sont la camptothécine et la doxorubicine, chez les cellules FTC-133. Cette induction de l'apoptose par la camptothécine et la doxorubicine est dépendante de l'inhibition d'expression de la TSP-1. Ainsi, contrairement à beaucoup d'études tendant à démontrer le rôle anti-tumoral de TSP-1, nous avons montré que cette protéine multimodulaire pouvait également exercer un rôle pro-tumoral en bloquant la mort cellulaire programmée, indispensable à l'homéostasie tissulaire.

La capacité de TSP-1 à interagir avec MMP2 et uPA amène à la considérer comme un régulateur important de la protéolyse tumorale. Le contrôle de la migration et de l'invasion cellulaire nécessite donc un équilibre fin entre la synthèse et le catabolisme de TSP-1, ainsi que des deux protéases matricielles. Un déficit dans leur catabolisme entraînerait en effet une forte accumulation de ceux-ci dans le milieu extracellulaire. Or, nous observons justement de nettes accumulations de TSP-1, d'uPA et de MMP2 dans le milieu de culture des cellules FTC-238. Si l'accumulation d'uPA semble pouvoir être expliquée par celle préalable de TSP-1, d'autres événements peuvent également en être la cause. Par ailleurs, même si le rôle de MMP2 dans l'invasion de ces cellules n'a pas été mis en évidence, les causes de son accumulation n'ont pas été élucidées, pas plus que celles de l'accumulation de TSP-1.

Les mécanismes d'internalisation dans la progression tumorale donnent matière à de nombreuses investigations. Les acteurs principaux de l'endocytose médiée par récepteur ont été décrits comme appartenant à la superfamille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDL-R) [Strickland DK et coll., 2002]. Parmi la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité, le LDL-R related protein (LRP) apparaît interférer dans la régulation de la migration et invasion tumorale [Krieger et Herz, 1994]. Or, ce récepteur apparaît également capable d'interagir avec chacun des trois acteurs précédemment cités, séparément ou sous forme de complexe, et de provoquer leur internalisation.

En effet, Mikhailenko et coll. ont été les premiers à reporter en 1995 une interaction spécifique et de haute affinité entre TSP-1 et LRP, puis ils ont démontré que l'internalisation et la dégradation de TSP-1 étaient médiées par son domaine de liaison à l'héparine du côté N-terminal [Mikhailenko et coll., 1997]. Il est à noter que des protéoglycannes de surface cellulaire apparaissent faciliter ce processus. Yang et coll. (2000) ont mis en évidence un peu plus tard l'interaction moléculaire *in vitro* TSP-2:MMP2 et ont émis l'hypothèse d'une endocytose probable de ce complexe par LRP. Cette même équipe a ensuite vérifié cette

hypothèse [Yang et coll., 2001]. Les auteurs ont en effet montré que l'internalisation de MMP2 est réduite dans le cas de fibroblastes déficients pour la TSP-2 par rapport aux fibroblastes contrôles. Selon P. Bornstein (2001), le complexe TSP-2:MMP2 pourrait également inclure TIMP2. Nous savons également que TSP-1 est également capable d'interagir physiquement avec MMP2 et que l'interaction a été localisée entre le site TSR des TSP-1 et -2 et la région N-terminale de MMP2 [Bein et Simon, 2000]. Enfin, notre équipe a récemment montré par des études de résonance plasmonique de surface, que la pro-MMP2 et TIMP2, ainsi que le complexe pro-MMP2:TIMP2 étaient capables d'interagir directement avec LRP en l'absence de TSP-1 [Emonard et coll., 2004]. De plus, alors que l'endocytose de la pro-MMP2 par LRP semble dépendante de TSP-1, l'internalisation de la pro-MMP2, complexée à TIMP2 se fait de manière TSP-indépendante chez des cellules de fibrosarcome.

Selon l'ensemble de ces données, nous pouvons considérer que les mêmes types d'interactions et les mêmes mécanismes d'internalisation existent pour les complexes LRP:TSP-2:MMP-2 et LRP:TSP-1:MMP-2.

En parallèle, Nykjaer et coll. ont été les premiers à mettre en évidence en 1992 une interaction moléculaire directe à haute affinité entre LRP et uPA, complexé à son récepteur uPAR. L'endocytose d'uPA complexé à uPAR et à son inhibiteur PAI-1 a ensuite été démontré comme étant négocié par LRP [Nykjaer et coll., 1997; Czekay et coll., 2001]. D'autre part, PAI-1, complexé à uPA, peut également participer à la régulation de la migration cellulaire en provoquant l'internalisation d'uPAR par l'intermédiaire de LRP ou en se complexant directement à LRP [Degryse et coll., 2001; Degryse et coll., 2004]. De même, d'autres auteurs ont rapporté que dans des fibroblastes déficients en LRP, une accumulation d'uPA soluble et d'uPAR à la surface cellulaire était corrélée à une diminution du catabolisme du complexe PAI-1:uPA:uPAR menant à une accélération de la migration cellulaire [Weaver et coll., 1997].

Ainsi, la capacité de LRP à moduler les niveaux d'expression de l'uPA et de la MMP2, mais aussi des MMP-9 et MMP-13 [Barmina et coll., 1999 ; Hahn-Dantona et coll., 2001], indique un rôle majeur pour ce récepteur dans l'élimination d'une activité protéolytique extracellulaire excessive. Mais le rôle exact de LRP dans les processus d'invasion reste à ce jour assez controversé.

En effet, pour certains auteurs, les taux et l'activité de LRP sont sensiblement diminués dans les tumeurs [Kancha RK et coll., 1994], ce qui diminuerait notamment le catabolisme de l'uPA et de la MMP2, conduisant à une concentration plus élevée de ces protéases au niveau des sites tumoraux. Kancha et coll. (1994) ont observé une corrélation entre des phénotypes invasifs et une faible expression de LRP dans différents sous-clones dérivés d'une lignée cellulaire tumorale de la prostate. D'autres équipes ont montré que la neutralisation de LRP provoque une augmentation de la migration et de l'invasion chez des fibroblastes embryonnaires et des cellules de fibrosarcome [Weaver et coll., 1997 ; Webb et coll., 2000].

En revanche, Li, Wood et coll. (1998-1999) ont montré que des hauts niveaux d'expression de LRP étaient capables de promouvoir l'invasion de cellules cancéreuses du sein. Par ailleurs, d'autres études ont montré que la neutralisation de LRP pouvait abolir la migration et l'invasion de cellules de muscles lisses, ainsi que la migration de différentes lignées de cellules cancéreuses du sein [Okada et coll., 1996 ; Wijnberg et coll., 1997 ; Chazaud et coll., 2002]. De manière surprenante, Degryse et coll. (1999) n'ont observé aucun effet de la neutralisation de LRP sur le pouvoir migratoire de cellules de muscles lisses.

Aucune étude, à notre connaissance, n'a été réalisée sur l'expression et le rôle de LRP dans les carcinomes thyroïdiens. Seuls, Kounnas et coll. (1994) ont révélé par des méthodes immunologiques que LRP pouvait être exprimé au niveau des surfaces apicales d'épithélium de glandes thyroïdiennes. Nous avons donc observé le profil d'expression du récepteur dans les deux lignées FTC.

Nous avons montré par RT-PCR une nette diminution du taux de transcription des ARNm codant pour LRP dans les cellules FTC-238 par rapport aux FTC-133. Celle-ci est accompagnée d'une perte importante d'expression de la protéine au niveau membranaire. Ces observations ont été confirmées par immunofluorescence. L'analyse par microscopie confocale des cellules immunomarquées anti-LRP permet de mettre en évidence une répartition assez homogène du récepteur à la surface membranaire des cellules FTC. Les trois approches expérimentales convergent ainsi vers une même évidence : les cellules à fort potentiel invasif, issues de la lignée FTC-238, expriment beaucoup moins LRP que les cellules FTC-133, moins invasives.

Nous avons ensuite montré grâce à des tests d'invasion *in vitro*, dans lesquels nous avons bloqué les sites de liaison de LRP, soit à l'aide de RAP, soit à l'aide d'anticorps anti-

LRP, que la neutralisation du récepteur induit une augmentation de l'invasion d'un facteur 2,5 chez les cellules FTC-133 et d'un facteur 2 chez les FTC-238. Dans la mesure où ces dernières expriment peu LRP, il n'est pas illogique que la neutralisation soit moins efficace vis à vis du potentiel invasif. Ainsi, l'endocytose dépendante de LRP semble étroitement liée au potentiel invasif des cellules FTC et la diminution d'expression de LRP pourrait être liée à l'acquisition du phénotype invasif par les cellules FTC-238. Nos observations rejoignent donc celles de Weaver et coll. (1997) et Webb et coll. (2000).

Il nous fallait alors comprendre si d'une part cette diminution d'expression de LRP chez les cellules FTC-238 est responsable de l'accumulation de TSP-1, d'uPA et de MMP2 dans leur milieu extracellulaire et si d'autre part son effet sur le potentiel invasif de ces cellules est dépendant de l'activité des deux protéases matricielles.

Pour cela, nous avons confirmé grâce à des expériences de co-immunoprécipitation que TSP-1, uPA et la forme active de MMP2 sont capables de former des complexes moléculaires avec LRP dans notre modèle cellulaire. Il est à noter que cette stratégie de co-immunoprécipitation ne permet pas de déterminer le type d'interactions qui existent entre ces quatre protéines. Ainsi, uPA et MMP2 peuvent très bien interagir soit directement avec LRP, comme le suggèrent Nykjaer et coll. (1992) et Emonard et coll. (2004), soit par l'intermédiaire de TSP-1, comme tendent à le montrer Silverstein et coll. (1990) et Yang et coll. (2001). Nous avons cependant montré précédemment que TSP-1 et les deux protéases étaient capables d'interagir entre elles dans le milieu extracellulaire, indépendamment de leur liaison avec LRP. A nouveau, néanmoins, nous ne pouvons pas définir si une molécule de TSP-1 est capable d'interagir simultanément ou séparément avec MMP2 et uPA. Ces observations laissent tout de même présager que LRP pourrait jouer un rôle dans le catabolisme de ces trois molécules et donc, dans la protéolyse matricielle nécessaire à l'invasion tumorale.

Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons procédé à des expériences de neutralisation de LRP et avons ainsi montré que les cellules FTC-133 et dans une moindre mesure, les cellules FTC-238, présentaient une plus forte accumulation de TSP-1 dans leur milieu extracellulaire. Nous avons observé le même type de résultats pour les taux d'uPA, ainsi que pour l'activité plasmine. En revanche, l'accumulation de MMP2 n'a pas été affectée par la neutralisation de LRP dans nos conditions expérimentales.

L'ensemble de ces données tendent à montrer que LRP semble être l'un des principaux récepteurs responsables de l'endocytose de TSP-1 et d'uPA dans ce modèle cellulaire. La diminution d'expression du récepteur chez les cellules FTC-238 entraînerait alors un déficit dans le catabolisme de ces deux molécules et donc une accumulation de celles-ci dans le milieu de culture. En parallèle, nous avons précédemment montré que TSP-1 est capable de stimuler le potentiel invasif des cellules FTC en provoquant une augmentation d'uPA et de son activité dans le milieu extracellulaire. Ainsi donc, la forte accumulation de la protéase dans les milieux de culture des cellules FTC-238 serait d'une part la conséquence de la baisse d'expression de son récepteur d'endocytose LRP et d'autre part de la production importante de TSP-1 par ces cellules.

Enfin, nous avons montré par des tests d'invasion *in vitro*, que l'inhibition de l'activité uPA entraînait une réversion du potentiel invasif des cellules FTC induit par la neutralisation de LRP. Ceci met donc en évidence que l'effet de la neutralisation du récepteur sur l'invasion des cellules FTC est dépendant de l'activité uPA.

Ainsi, la diminution d'expression de LRP chez les cellules FTC-238 provoque une accumulation d'uPA et de TSP-1 dans l'environnement extracellulaire. L'accumulation de TSP-1 potentialise à son tour l'activité d'uPA, ce qui confère aux cellules FTC-238 un pouvoir invasif accru. L'accumulation de MMP2 observée chez ces cellules ne semble pas être la conséquence de la baisse d'expression de LRP et n'influence pas le pouvoir invasif des cellules FTC.

Afin d'approfondir nos investigations sur le rôle de LRP dans le pouvoir invasif des cellules de carcinome folliculaire thyroïdien et de confirmer ce que nous avons montré précédemment par les expériences de neutralisation du récepteur, nous avons invalidé directement son expression au sein de la lignée cellulaire qui l'exprime fortement à l'état sauvage, c'est à dire les FTC-133, grâce à la technique d'interférence à ARN (RNAi). Nous avons ainsi obtenus une diminution d'expression du récepteur de plus de 90%.

Nous avons montré que l'invalidation de l'expression de LRP chez les cellules FTC-133 provoque une nette accumulation d'uPA dans leur milieu de culture. De plus, l'activité plasmine mesurée dans ces milieux de culture est environ 2,5 fois plus importante comparée aux FTC-133 contrôles. Ce qui correspond à peu près à la différence observée entre des

cellules traitées ou non par RAP, ou encore à celle observée entre les FTC-133 et FTC-238 en conditions basales.

En revanche, de manière surprenante, les tests d'invasion *in vitro* nous ont montré que la lignée cellulaire, dont l'expression de LRP est invalidée, possède un potentiel invasif réduit d'environ 60% par rapport à celui de la lignée contrôle.

Cet effet de l'extinction de LRP sur le potentiel invasif des cellules FTC-133 est totalement en opposition à ce que nous observons lors des expériences de neutralisation du récepteur par RAP ou par l'anticorps polyclonal anti-LRP. Ces résultats rejoignent par contre ceux de Li, Lu et Bu (2003) qui ont montré que l'invalidation de LRP chez des cellules de muscles lisses endothéliales entraîne une diminution de la migration de 50%, bien que la dégradation dépendante de LRP du complexe uPA:PAI-1 soit réduit de 60%.

Ces résultats opposés selon la stratégie employée ne peuvent s'expliquer que si on s'intéresse à la capacité de LRP à moduler la signalisation intracellulaire, ainsi que les interactions entre la matrice et les protéines du cytosquelette. En effet, LRP est susceptible de coopérer avec des récepteurs membranaires et de participer aux événements de signalisation intracellulaire consécutifs à la fixation de leurs ligands. Il a notamment été identifié comme constituant un relais de la signalisation induite par le récepteur du PDGF [Boucher et coll., 2002].

LRP n'a longtemps été considéré que comme un récepteur "poubelle", du fait de sa capacité à permettre l'endocytose d'une multitude de ligands. Cependant, un nombre croissant de protéines cytoplasmiques sont découvertes comme interagissant avec l'extrémité C-terminale de LRP. La recherche de telles protéines a été initiée parce qu'il devenait impossible de réconcilier un spectre impressionnant d'observations expérimentales concernant les diverses fonctions de LRP avec un simple rôle de récepteur d'endocytose ou de transporteur cellulaire de molécules extracellulaires. Les recherches se sont focalisées sur le motif de quatre acides aminés NPxY, présent en deux exemplaires dans la queue intracytoplasmique C-terminale de LRP. Ces deux motifs peuvent fonctionner indépendamment comme signal d'internalisation et ont été montrés comme interagissant également avec des protéines cytoplasmiques contenant des domaines appelés "phosphotyrosine-binding" (PTB). En effet, deux protéines cytoplasmiques, Dab 1 et FE65,

contenant ces domaines PTB ont été décrites comme pouvant interagir spécifiquement avec les motifs NPxY de la queue LRP (Cf. *chapitre VI-3-2 de l'introduction*).

Par la suite, plusieurs autres produits de gènes ont été identifiés comme interagissant spécifiquement avec des régions distinctes de la queue cytoplasmique des membres des LDL-R [Gotthardt et coll., 2000 ; Stockinger et coll., 2000]. Quelques unes d'entre elles contiennent également des domaines PTB [Barnes et coll., 2001], alors que la plupart des autres contiennent des domaines PZD, un autre type de structures d'interaction protéique. Par exemple, LRP pourrait jouer un rôle important dans la transduction du signal en aval de Src et d'autres tyrosine-kinases non-récepteurs. v-Src phosphoryle la protéine adaptatrice Shc, qui alors recrute Grb2-Sos, potentialisant ainsi l'activation de Ras. Barnes et coll. (2001) ont purifié une protéine de 100 kDa liant le domaine PTB de Shc, identifiée comme la sous-unité  $\beta$  de LRP, et montrèrent que LRP est phosphorylé sur tyrosine dans des cellules transfectées par v-Src et que la tyrosine phosphorylée lie Shc. Ainsi, LRP peut jouer un rôle important dans la localisation de Shc à la membrane plasmique, fournissant de ce fait un lien à la voie Ras-ERK-MAP kinase et des voies alternatives en aval de Shc.

Par ailleurs, il a été montré dans des cellules de muscles lisses, que les effets motogènes attribués à PAI-1 sont sous la dépendance de son interaction directe avec LRP [Degryse et coll., 2004]. En effet, La fixation de PAI-1 sur la partie extracellulaire de LRP entraîne une activation de la voie JAK/STAT et se traduit par des répercussions sur la morphologie cellulaire ainsi que par une réorganisation du cytosquelette d'actine.

A la lumière de l'ensemble de ces données et afin de comprendre la baisse du potentiel invasif des cellules FTC-133 dont l'expression de LRP a été invalidée, B. Langlois, dans le cadre de sa thèse au sein de notre équipe de recherche, s'intéressera au comportement de ces cellules en terme de migration et d'adhérence, à leur morphologie et à leurs voies de signalisation intracellulaire.

Nous envisageons d'observer l'effet de l'invalidation de l'expression de LRP chez les cellules FTC-133 sur la migration et l'adhérence cellulaire, sur différents substrat de la matrice, telles que la gélatine ou la fibronectine. Nous étudierons également l'effet de cette invalidation sur la morphologie des cellules et l'organisation du cytosquelette, en étudiant notamment les profils d'extensions membranaires, la présence ou pas de lamellipodes et la distribution de principaux constituants des complexes d'adhésion, telles que la vinculine, la taline ou la paxilline. En effet, des études assez récentes caractérisant les aspects

morphologiques des cellules migrantes, rapportent que l'association transitoire de complexes focaux permet leur maintien dans un état d'attachement intermédiaire indispensable à leur motilité [Webb, Donais et coll., 2004].

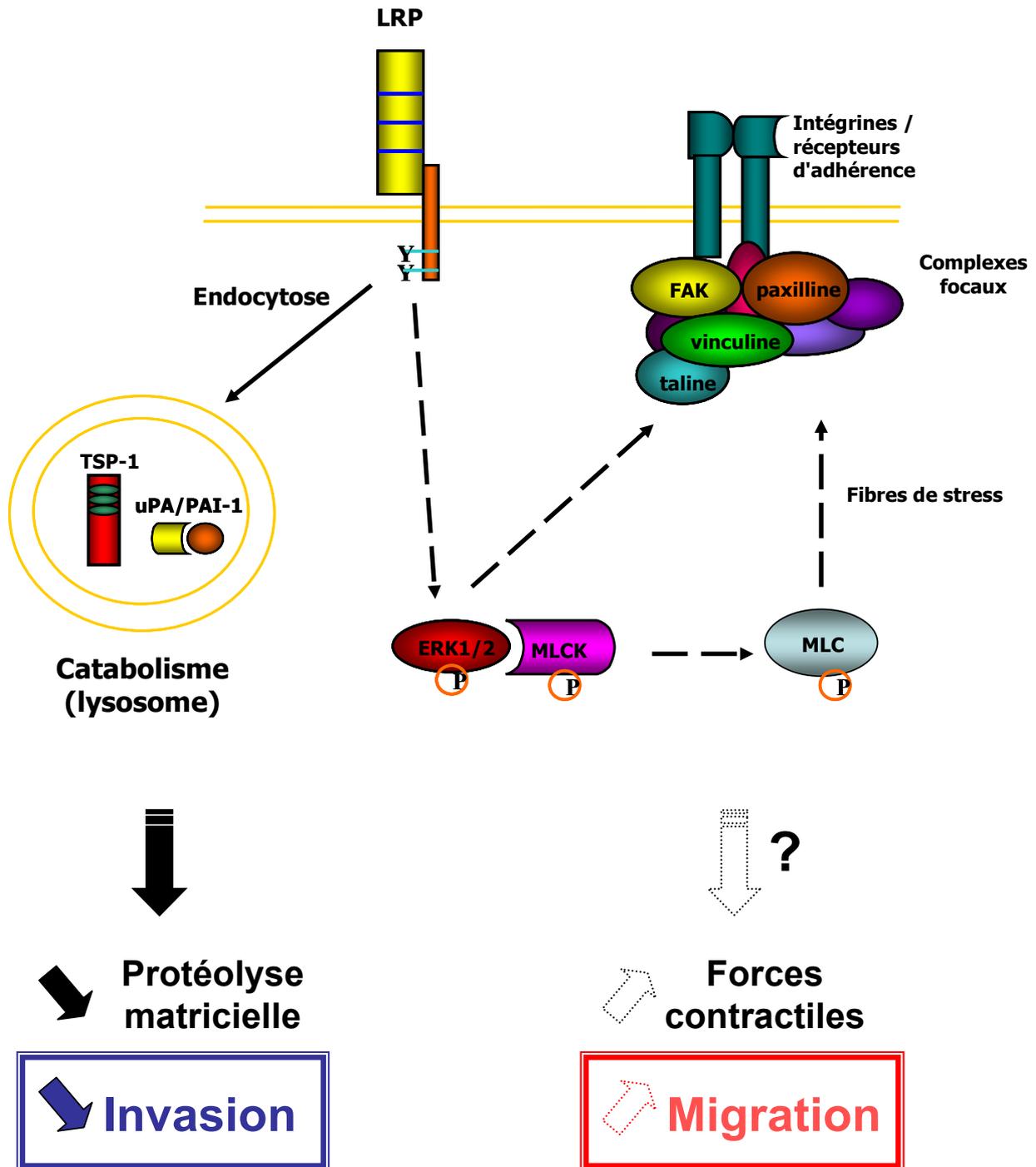
Par ailleurs, l'activation de la voie ERK semble jouer un rôle important dans les processus de migration et d'adhérence. Une des cibles en aval de cette voie de signalisation est la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*). Celle-ci, en phosphorylant les chaînes légères de myosine, est capable de générer des tensions contractiles sur les microfilaments d'actine nécessaires à la rupture des contacts focaux à l'arrière de la cellule et à la motilité cellulaire [Totsukawa G, Wu Y, 2004] Il a été très récemment montré que la lactoferrine, une glycoprotéine liant le fer appartenant à la famille des transferrines, était capable d'augmenter l'activité contractile d'un gel de collagène en présence de fibroblastes [Takayama et coll., 2003 ; Takayama et Takezawa, 2006]. La contraction d'un gel de collagène est considérée comme un modèle *in vitro* de réorganisation de la matrice durant les processus de migration cellulaire. Cette élévation de l'activité contractile induite par la lactoferrine est accompagnée d'une activation d'ERK1/2 et de la kinase MLCK, ainsi que d'une augmentation subséquente de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Or, ces effets de la lactoferrine sur la contraction du gel de collagène et l'activation de la voie de signalisation ERK 1/2 dépendent de l'expression de LRP par les fibroblastes. LRP agit ainsi comme récepteur de signalisation de la lactoferrine et convertit le signal de liaison en activation d'une voie de signalisation intracellulaire. Cette propriété semble indépendante de sa fonction d'endocytose.

Il serait donc intéressant d'étudier et de comparer au sein de des cellules FTC-133 déficientes ou non en LRP, les modulations d'activation de la voie ERK et MLCK, ainsi que leur implication dans le contrôle des processus d'adhérence à la matrice. Pour cela, il nous faudra rechercher une éventuelle différence dans les activités d'ERK et de MCLK chez les cellules FTC-133, dont l'expression de LRP a été invalidée. Nous tenterons ensuite de surexprimer, dans ces cellules FTC-133, des mutants dominants négatifs et constitutivement actifs des kinases MEK1/2 et ERK1/2. Nous contrôlerons également si la restauration de l'expression du récepteur permet de rétablir le caractère des cellules sauvages en termes d'adhérence et d'activation d'ERK.

Ainsi, si nous pouvons montrés que LRP est capable de contrôler l'attachement des cellules de carcinomes thyroïdiens sur différents substrats matricielles en régulant la morphologie cellulaire et l'organisation du cytosquelette et qu'il est également capable de

contrôler l'activation de la voie ERK-MLCK, qui semble être impliquée dans cette régulation des processus d'attachement, nous serons en mesure d'expliquer son rôle controversé dans le potentiel invasif des cellules FTC.

En conclusion, ce rôle controversé de LRP dans le potentiel invasif cellulaire pourrait s'expliquer par ses deux mécanismes d'action indépendants. D'une part, sa fonction de récepteur d'endocytose et sa capacité à réguler la protéolyse matricielle, ainsi que l'élimination d'une multitude de facteurs de croissance du milieu péricellulaire. D'autre part, sa fonction de récepteur de signalisation et son pouvoir dans la régulation de voies intracellulaires modulant, entre autre, l'organisation du cytosquelette, la distribution des plaques focales et l'adhérence cellulaire. En effet, en permettant l'internalisation et la dégradation de différentes protéases matricielles et d'autres protéines de la matrice, régulatrices de leur activité, comme TSP-1, LRP peut limiter l'invasion de cellules tumorales. Il possède alors un rôle anti-invasif. Parallèlement, en inhibant l'adhérence cellulaire à travers l'activation de la voie de signalisation ERK/MCLK, il serait alors capable de promouvoir la migration cellulaire. Il conviendrait alors de distinguer les processus d'invasion des processus de migration cellulaire (figure 63).



**Figure 63** : schéma récapitulatif du mécanisme de régulation de l'invasion des cellules FTC par LRP et hypothèses sur son rôle dans la migration. *Panel de gauche* : LRP permet l'endocytose et la dégradation lysosomiale d'uPA et de TSP-1. Il induit ainsi une diminution de la protéolyse matricielle et donc une diminution de l'invasion cellulaire. *Panel de droite* : LRP serait capable d'activer la voie ERK-MCLK, ce qui entraîne la phosphorylation des chaînes légères de myosine et la formation de fibres de stress, qui à leur tour induisent la formation de complexes focaux. L'ensemble de ces événements constitue à générer des forces contractiles, nécessaire à la migration cellulaire.

*Publications et  
Communications*

## **PUBLICATIONS**

Sid B, Sartelet H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N, Haye B and Martiny L (2004). Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol.* **49**:245-58.

Sid B, Dedieu S, Delorme N, Sartelet H, Rath GM, Bellon G and Martiny L (2006). Human thyroid carcinoma cell invasion is controlled by the low density lipoprotein receptor-related protein-mediated clearance of urokinase plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol.* **38**:1729-40.

Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Rothhut B, Soula-Rothhut M, Ghoneim C, Sid B, Morjani H, El Btaouri H and Martiny L (2006). The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.* **1763**:1125-34.

Dedieu S, Langlois B, Devy J, Sid B, Bellon G, Emonard H and Martiny L. Reduced cell invasion in LRP-silencing malignant cancer cells despite increased pericellular proteolytic activities. *Submitted.*

## **COMMUNICATIONS PAR VOIE D’AFFICHAGE**

Sid B., Delorme N., Sartelet H., Robinson S., Haye B. and Martiny L (2002). Evidence of the LRP-scavenger receptor in follicular thyroid carcinoma cell lines: implication of TSP-1, uPA and MMP2 in the invasion process. *XVIIIth Federation of the European Connective Tissues Societies congress, Brighton, UK.*

Sid B, Delorme N, Sartelet H, Bellon G and Martiny L (2004). The level of LRP scavenger receptor expression is correlated to aggressiveness of follicular thyroid carcinoma: involvement of TSP1, uPA and MMP2 in the invasion process. *FASEB Summer Research Conferences: Thrombospondins and other modulatory adhesion in tissue organisation and homeostasis, Pine Mountain, GA, USA.*

Sid B, Delorme N, Sartelet H, Bellon G et Martiny L (2004). L’expression du récepteur LRP régule l’agressivité des cellules de carcinomes folliculaires thyroïdiens : Implication de TSP-1, uPA et MMP2 dans ces processus invasifs. *Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims, France.*

# *Références*

- Adams JC (1995). Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci.* **108**:1977-90.
- Adams JC (1997). Characterization of cell-matrix adhesion requirements for the formation of fascin microspikes. *Mol Biol Cell.* **8**:2345-63.
- Adams JC (2001). Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**:25-51.
- Adams JC et Watt FM (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development.* **117**:1183-98.
- Agren MS, Mirastschijski U, Karlsmark T and Saarialho-Kere UK (2001). Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp Dermatol.* **10**:337-48.
- Albo D, Berger DH, Vogel J and Tuszynski GP (1999). Thrombospondin-1 and transforming growth factor beta-1 upregulate plasminogen activator inhibitor type 1 in pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* **3**:411-7.
- Albo D, Berger DH, Wang TN, Hu X, Rothman V and Tuszynski GP (1997). Thrombospondin-1 and transforming growth factor-beta 1 promote breast tumor cell invasion through up-regulation of the plasminogen/plasmin system. *Surgery.* **122**:493-9.
- Albo D, Rothman VL, Roberts DD and Tuszynski GP (2000). Tumour cell thrombospondin-1 regulates tumour cell adhesion and invasion through the urokinase plasminogen activator receptor. *Br J Cancer.* **83**:298-306.
- Albo D and Tuszynski GP (2004). Thrombospondin-1 up-regulates tumor cell invasion through the urokinase plasminogen activator receptor in head and neck cancer cells. *J Surg Res.* **120**:21-6.
- Andreasen PA, Egelund R and Petersen HH (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci.* **57**:25-40.
- Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L and Duffy MJ (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer.* **72**:1-22.
- Apte SS, Mattei MG and Olsen BR (1994). Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22. *Genomics.* **19**:86-90.
- Arnoletti JP, Albo D, Granick MS, Solomon MP, Castiglioni A, Rothman VL and Tuszynski GP (1995). Thrombospondin and transforming growth factor-beta 1 increase expression of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer.* **76**:998-1005.
- Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL and Nachman RL (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest.* **79**:1054-61.

- Asch AS, Silbiger S, Heimer E and Nachman RL (1992). Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding. *Biochem Biophys Res Commun.* **182**:1208-17.
- Aumailley M and Gayraud B (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med.* **76**:253-65.
- Bacsikai BJ, Xia MQ, Strickland DK, Rebeck GW and Hyman BT (2000). The endocytic receptor protein LRP also mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:11551-6.
- Bajou K, Masson V, Gerard RD, Schmitt PM, Albert V, Praus M, Lund LR, Frandsen TL, Brunner N, Dano K, Fusenig NE, Weidle U, Carmeliet G, Loskutoff D, Collen D, Carmeliet P, Foidart JM and Noel A (2001). The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. *J Cell Biol.* **152**:777-84.
- Bajou K, Noel A, Gerard RD, Masson V, Brunner N, Holst-Hansen C, Skobe M, Fusenig NE, Carmeliet P, Collen D and Foidart JM (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med.* **4**:923-8.
- Barmina OY, Walling HW, Fiacco GJ, Freije JM, Lopez-Otin C, Jeffrey JJ and Partridge NC (1999). Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J Biol Chem.* **274**:30087-93.
- Barnes H, Ackermann EJ and van der Geer P (2003). v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1. *Oncogene.* **22**:3589-97.
- Barnes H, Larsen B, Tyers M and van Der Geer P (2001). Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells. *J Biol Chem.* **276**:19119-25.
- Basset P, Bellocq JP, Lefebvre O, Noël A, Chenard MP, Wolf C, Anglard P and Rio MC (1997). Stromelysin-3: a paradigm for stroma-derived factors implicated in carcinoma progression. *Crit Rev Oncol Hematol* **26**:43-53.
- Becker CG, Schweitzer J, Feldner J, Becker T and Schachner M (2003). Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish. *J Neurosci.* **23**:6232-7.
- Behrendt N, Ronne E and Dano K (1995). The structure and function of the urokinase receptor, a membrane protein governing plasminogen activation on the cell surface. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **376**:269-79.
- Bein K and Simons M (2000). Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem.* **275**:32167-73.
- Bellon G, Chaqour B, Antonicelli F, Wegrowski J, Claisse D, Haye B and Borel JP (1994). Differential expression of thrombospondin, collagen, and thyroglobulin by thyroid-stimulating hormone and tumor-promoting phorbol ester in cultured porcine thyroid cells. *J Cell Physiol.* **160**:75-88.

Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J and Prager GW (2002). Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci.* **17**:56-61.

Blasi F (1997). uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunol Today.* **18**:415-7.

Blasi F and Carmeliet P (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:932-43.

Bohuslav J, Horejsi V, Hansmann C, Stockl J, Weidle UH, Majdic O, Bartke I, Knapp W and Stockinger H (1995). Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes. *J Exp Med.* **181**:1381-90.

Bonavaud S, Charriere-Bertrand C, Rey C, Leibovitch MP, Pedersen N, Frisdal E, Planus E, Blasi F, Gherardi R and Barlovatz-Meimon G (1997). Evidence of a non-conventional role for the urokinase tripartite complex (uPAR/uPA/PAI-1) in myogenic cell fusion. *J Cell Sci.* **110**:1083-9.

Bork P, Downing AK, Kieffer B and Campbell ID (1996). Structure and distribution of modules in extracellular proteins. *Q Rev Biophys.* **29**:119-67.

Bornstein P (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol.* **130**:503-6.

Bornstein P (2000). Matricellular proteins: an overview. *Matrix Biol.* **19**:555-6.

Bornstein P (2001). Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest.* **107**:929-34.

Bosman FT and Stamenkovic I (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* **200**:423-8.

Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RG and Herz J (2002). Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem.* **277**:15507-13.

Brekken RA and Sage EH (2000). SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol.* **19**:569-80.

Bressler SL, Gray MD, Sopher BL, Hu Q, Hearn MG, Pham DG, Dinulos MB, Fukuchi K, Sisodia SS, Miller MA, Disteche CM and Martin GM (1996). cDNA cloning and chromosome mapping of the human Fe65 gene: interaction of the conserved cytoplasmic domains of the human beta-amyloid precursor protein and its homologues with the mouse Fe65 protein. *Hum Mol Genet.* **5**:1589-98.

Brew K, Dinakarpanian D and Nagase H (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* **1477**:267-83.

- Brooke BS, Bayes-Genis A and Li DY (2003). New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* **13**:176-81.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP and Cheresch DA (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell.* **85**:683-93.
- Bu G and Rennke S (1996). Receptor-associated protein is a folding chaperone for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* **271**:22218-24.
- Bu G, Williams S, Strickland DK and Schwartz AL (1992). Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:7427-31.
- Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA and Bongarzone I (1999). Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol.* **155**:1967-76.
- Busso N, Masur SK, Lazega D, Waxman S and Ossowski L (1994). Induction of cell migration by pro-urokinase binding to its receptor: possible mechanism for signal transduction in human epithelial cells. *J Cell Biol.* **126**:259-70.
- Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP and Murphy G (1998). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem.* **273**:871-80.
- Campo E, Merino MJ, Liotta L, Neumann R and Stetler-Stevenson W (1992). Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. *Hum Pathol.* **23**:1395-401.
- Carmichael DF, Sommer A, Thompson RC, Anderson DC, Smith CG, Welgus HG and Stricklin GP (1986). Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**:2407-11.
- Castle V, Varani J, Fligiel S, Prochownik EV and Dixit V (1991). Antisense-mediated reduction in thrombospondin reverses the malignant phenotype of a human squamous carcinoma. *J Clin Invest.* **87**:1883-8.
- Castellino FJ and Powell JR (1981). Human plasminogen. *Methods Enzymol.* **80**:365-78.
- Chandrasekaran S, Guo NH, Rodrigues RG, Kaiser J and Roberts DD (1999). Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem.* **274**:11408-16.
- Chandrasekaran L, He CZ, Al-Barazi H, Krutzsch HC, Iruela-Arispe ML and Roberts DD (2000). Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell.* **11**:2885-900.

- Chang C and Werb Z (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* **11**:S37-43.
- Chantrain C et DeClerck Y (2002). Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Méd. Sci.* **18**:565-575.
- Chapman HA and Wei Y (2001). Protease crosstalk with integrins: the urokinase receptor paradigm. *Thromb Haemost.* **86**:124-9.
- Chazaud B, Bonavaud S, Plonquet A, Pouchelet M, Gherardi RK and Barlovatz-Meimon G (2000). Involvement of the [uPAR:uPA:PAI-1:LRP] complex in human myogenic cell motility. *Exp Cell Res.* **258**:237-44.
- Chazaud B, Ricoux R, Christov C, Plonquet A, Gherardi RK and Barlovatz-Meimon G (2002). Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations. *Am J Pathol.* **160**:237-46.
- Chen WJ, Goldstein JL and Brown MS (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* **265**:3116-23.
- Chiquet-Ehrismann R (2004). Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol.* **36**:1085-9.
- Chiquet-Ehrismann R and Chiquet M (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* **200**:488-99.
- Chu QD, Hurd TC, Harvey S, Martinick M, Markus G, Tan D, Gibbs JF and Loree T (2004). Overexpression of urinary plasminogen activator (uPA) protein and mRNA in thyroid carcinogenesis. *Diagn Mol Pathol.* **13**:241-6.
- Claisse D, Martiny I, Chaqour B, Wegrowski Y, Petitfrere E, Schneider C, Haye B and Bellon G (1999). Influence of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the behaviour of porcine thyroid epithelial cells in primary culture through thrombospondin-1 synthesis. *J Cell Sci.* **112**:1405-16.
- Clezardin P, Frappart L, Clerget M, Pechoux C and Delmas PD (1993). Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res.* **53**:1421-30.
- Clezardin P, Jouishomme H, Chavassieux P and Marie PJ (1989). Thrombospondin is synthesized and secreted by human osteoblasts and osteosarcoma cells. A model to study the different effects of thrombospondin in cell adhesion. *Eur J Biochem.* **181**:721-6.
- Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J and Baselga J (1999). Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res.* **59**:1196-201.
- Collen D and Lijnen HR (1984). New approaches to thrombolytic therapy. *Arteriosclerosis.* **4**:579-85.

- Colognato H and Yurchenco PD (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* **218**:213-34.
- Coraux C, Meneguzzi G, Rousselle P, Puchelle E and Gaillard D (2002). Distribution of laminin 5, integrin receptors, and branching morphogenesis during human fetal lung development. *Dev Dyn.* **225**:176-85.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP and Bouck N (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell.* **93**:1159-70.
- Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA and Farquhar MG (2001). Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Biol Cell.* **12**:1467-79.
- Dano K, Romer J, Nielsen BS, Bjorn S, Pyke C, Rygaard T and Lund LR (1999). Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types. *APMIS* **107(1)**:120-7.
- Debelle L and Tamburro AM (1999). Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol.* **31**:261-72.
- DeFreitas MF, Yoshida CK, Frazier WA, Mendrick DL, Kypta RM and Reichardt LF (1995). Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron.* **15**:333-43.
- Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y and Loskutoff DJ (2004). The low density lipoprotein receptor-related protein is a mitogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem.* **279**:22595-604.
- Degryse B, Resnati M, Rabbani SA, Villa A, Fazioli F and Blasi F (1999). Src-dependence and pertussis-toxin sensitivity of urokinase receptor-dependent chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *Blood.* **94**:649-62.
- Degryse B, Sier CF, Resnati M, Conese M and Blasi F (2001). PAI-1 inhibits urokinase-induced chemotaxis by internalizing the urokinase receptor. *FEBS Lett.* **505**:249-54.
- Del Rosso M, Anichini E, Pedersen N, Blasi F, Fibbi G, Pucci M and Ruggiero M (1993). Urokinase-urokinase receptor interaction: non-mitogenic signal transduction in human epidermal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **190**:347-52.
- Delany AM, Jeffrey JJ, Rydziel S and Canalis E (1995). Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem.* **270**:26607-12.
- Delorme N (2003). Système plasminogène/plasmine et collagénases de type IV dans les cellules épithéliales thyroïdiennes. Mise en évidence, identification et régulation par le TGF- $\beta$ 1. Rôle de la Thrombospondine. *Th. Univ. : Biochimie, Reims Champagne-Ardennes*

- Demeure MJ, Damsky CH, Elfman F, Goretzki PE, Wong MG and Clark OH (1992). Invasion by cultured human follicular thyroid cancer correlates with increased beta 1 integrins and production of proteases. *World J Surg.* **16**:770-6.
- Demeure MJ, Doffek KM and Wilson SD (1997). Defective thyrotropin receptor G-protein cyclic adenosine monophosphate signaling mechanism in the FTC human follicular thyroid cancer cell line. *Surgery.* **122**:1195-201.
- Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S and Loskutoff DJ (1996). Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol.* **134**:1563-71.
- Derwahl M, Kuemmel M, Goretzki P, Schatz H and Broecker M (1993). Expression of the human TSH receptor in a human thyroid carcinoma cell line that lacks an endogenous TSH receptor: growth inhibition by cAMP. *Biochem Biophys Res Commun.* **191**:1131-8.
- Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, Rozanov DV and Strongin AY (2002). Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* **277**:9749-56.
- Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B and Debelle L (2004). Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol.* **49**:235-44.
- Dumler I, Kopmann A, Weis A, Mayboroda OA, Wagner K, Gulba DC and Haller H (1999). Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**:290-7.
- Dumler I, Petri T and Schleuning WD (1994). Induction of c-fos gene expression by urokinase-type plasminogen activator in human ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* **343**:103-6.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M and Dvorak AM (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* **146**:1029-39.
- Eeckhout Y and Vaes G (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J.* **166**:21-31.
- Egeblad M and Werb Z (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* **2**:161-74.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* **411**:494-8.
- Elefteriou F, Exposito JY, Garrone R and Lethias C. Cell adhesion to tenascin-X mapping of cell adhesion sites and identification of integrin receptors. *Eur J Biochem.* **263**:840-8.

- Emonard H, Bellon G, Troeberg L, Berton A, Robinet A, Henriot P, Marbaix E, Kirkegaard K, Patthy L, Eeckhout Y, Nagase H, Hornebeck W and Courtoy PJ (2004). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2.TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem.* **279**:54944-51.
- Erickson HP (1993). Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol.* **5**:869-76.
- Estreicher A, Muhlhauer J, Carpentier JL, Orci L and Vassalli JD (1990). The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J Cell Biol.* **111**:783-92.
- Farina AR, Coppa A, Tiberio A, Tacconelli A, Turco A, Colletta G, Gulino A and Mackay AR (1998). Transforming growth factor-beta1 enhances the invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells by up-regulating urokinase activity. *Int J Cancer.* **75**:721-30.
- Felding-Habermann B and Cheresch DA (1993). Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol.* **5**:864-8.
- Frederiks WM and Mook OR (2004). Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J Histochem Cytochem.* **52**:711-22.
- Fridman R, Toth M, Pena D and Mobashery S (1995). Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* **55**:2548-55.
- Fukai N, Apte SS and Olsen BR (1994). Nonfibrillar collagens. *Methods Enzymol.* **245**:3-28.
- Gandhari M, Arens N, Majety M, Dorn-Beineke A and Hildenbrand R (2006). Urokinase-type plasminogen activator induces proliferation in breast cancer cells. *Int J Oncol.* **28**:1463-70.
- Gao AG, Lindberg FP, Dimitry JM, Brown EJ and Frazier WA (1996). Thrombospondin modulates alpha v beta 3 function through integrin-associated protein. *J Cell Biol.* **135**:533-44.
- Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ and Frazier WA. Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem.* **271**:21-4.
- George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H and Hynes RO (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development.* **119**:1079-91.
- Gliemann J (1998). Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands. *Biol Chem.* **379**:951-64.

- Godyna S, Liao G, Popa I, Stefansson S and Argraves WS (1995). Identification of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) as an endocytic receptor for thrombospondin-1. *J Cell Biol.* **129**:1403-10.
- Gomis-Rüth FX (2003). Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol Biotechnol.* **24**:157-202.
- Goretzki PE, Frilling A, Simon D and Roehrer HD (1990). Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res.* **118**:48-63.
- Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J and Herz J (2000). Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem.* **275**:25616-24.
- Granelli-Piperno A and Reich E (1978). A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J Exp Med.* **148**:223-34.
- Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C and Shi YE (1996). Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem.* **271**:30375-80.
- Greenwood JA, Pallero MA, Theibert AB and Murphy-Ullrich JE (1998). Thrombospondin signaling of focal adhesion disassembly requires activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* **273**:1755-63.
- Greenwood JA, Troncoso JC, Costello AC and Johnson GV (2000). Phosphorylation modulates calpain-mediated proteolysis and calmodulin binding of the 200-kDa and 160-kDa neurofilament proteins. *J Neurochem.* **61**:191-9.
- Guo NH, Krutzsch HC, Negre E, Vogel T, Blake DA and Roberts DD (1992). Heparin- and sulfatide-binding peptides from the type I repeats of human thrombospondin promote melanoma cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**:3040-4.
- Gyetko MR, Todd RF 3rd, Wilkinson CC and Sitrin RG (1994). The urokinase receptor is required for human monocyte chemotaxis *in vitro*. *J Clin Invest.* **93**:1380-7.
- Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P and Strickland DK (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem.* **276**:15498-503.
- Hammond SM, Caudy AA and Hannon GJ (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* **2**:110-9.
- Hao JL, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H and Nishida T (1999). Galardin inhibits collagen degradation by rabbit keratocytes by inhibiting the activation of pro-matrix metalloproteinases. *Exp Eye Res.* **68**:565-72.

- Harada T, Shinohara M, Nakamura S and Oka M (1994). An immunohistochemical study of the extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma and its association with invasive and metastatic potential. *Virchows Arch.* **424**:257-66.
- HE CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ and Goldberg GI (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:2632-6.
- Hekman CM and Loskutoff DJ (1988). Bovine plasminogen activator inhibitor 1: specificity determinations and comparison of the active, latent, and guanidine-activated forms. *Biochemistry.* **27**:2911-8.
- Henriet P, Blavier L and Declerck YA (1999). Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS.* **107**:111-9.
- Herz J and Beffert U (2000). Apolipoprotein E receptors: linking brain development and Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **1**:51-8.
- Herz J and Strickland DK (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* **108**:779-84.
- Herz J, Clouthier DE and Hammer RE (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell.* **71**:411-21.
- Herz J, Hamann U, Rogne S, Myklebost O, Gausepohl H and Stanley KK (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* **7**:4119-27.
- Herz J, Kowal RC, Goldstein JL and Brown MS (1999). Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.* **9**:1769-76.
- Hess S, Kanse SM, Kost C and Preissner KT (1995). The versatility of adhesion receptor ligands in haemostasis: morpho-regulatory functions of vitronectin. *Thromb Haemost.* **74**:258-65.
- Higazi AA, Barghouti II and Abu-Much R (1995). Identification of an inhibitor of tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis in human neutrophils. A role for defensin. *J Biol Chem.* **270**:9472-7.
- Higazi AA, Mazar A, Wang J, Reilly R, Henkin J, Kniss D and Cines D (1996). Single-chain urokinase-type plasminogen activator bound to its receptor is relatively resistant to plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood.* **87**:3545-9.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN and Ruiter DJ (2000). Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol.* **115**:337-44.
- Horn IR, Moestrup SK, van den Berg BM, Pannekoek H, Nielsen MS and van Zonneveld AJ (1995). Analysis of the binding of pro-urokinase and urokinase-plasminogen activator

- inhibitor-1 complex to the low density lipoprotein receptor-related protein using a Fab fragment selected from a phage-displayed Fab library. *J Biol Chem.* **270**:11770-5.
- Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC and Bellon G (2002). Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol.* **12**:231-41.
- Hosokawa T, Muraishi A, Rothman VL, Papale M and Tuszynski GP (1993). The effect of thrombospondin on invasion of fibrin gels by human A549 lung carcinoma. *Oncol Res.* **5**:183-9.
- Hoyer-Hansen G, Ronne E, Solberg H, Behrendt N, Ploug M, Lund LR, Ellis V and Dano K (1992). Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J Biol Chem.* **267**:18224-9.
- Hunziker EB and Schenk RK (1984). Cartilage ultrastructure after high pressure freezing, freeze substitution, and low temperature embedding. II. Intercellular matrix ultrastructure - preservation of proteoglycans in their native state. *J. Cell Biol.* **98**:277-282.
- Hutvagner G and Zamore PD (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev.* **12**:225-32.
- Incardona F, Calvo F, Fauvel-Lafeve F, Legrand Y and Legrand C (1993). Involvement of thrombospondin in the adherence of human breast-adenocarcinoma cells: a possible role in the metastatic process. *Int J Cancer.* **55**:471-7.
- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M and Nagamine Y (1999). The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci.* **56**:104-32.
- Joester A and Faissner A (2001). The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol.* **20**:13-22.
- Kahari VM and Saarialho-Kere U (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* **6**:199-213.
- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H and Seiki M (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol.* **153**:893-904.
- Kalluri R (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* **3**:422-33.
- Kancha RK, Stearns ME and Hussain MM (1994). Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells. *Oncol Res.* **6**:365-72.
- Kauhanen P, Siren V, Carpen O, Vaheri A, Lepantalo M and Lassila R (1997). Plasminogen activator inhibitor-1 in neointima of vein grafts: its role in reduced fibrinolytic potential and graft failure. *Circulation.* **96**:1783-9.

Kjoller L, Kanse SM, Kirkegaard T, Rodenburg KW, Ronne E, Goodman SL, Preissner KT, Ossowski L and Andreasen PA (1997). Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation. *Exp Cell Res.* **232**:420-9.

Knauper V, Bailey L, Worley JR, Soloway P, Patterson ML and Murphy G (2002). Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett.* **532**:127-30.

Knudsen BS, Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC and Nachman RL (1986). Binding of plasminogen to extracellular matrix. *J Biol Chem.* **261**:10765-71.

Konakova M, Hucho F and Schleuning WD (1998). Downstream targets of urokinase-type plasminogen-activator-mediated signal transduction. *Eur J Biochem.* **253**:421-9.

Kosfeld MD, Pavlopoulos TV and Frazier WA (1991). Cell attachment activity of the carboxyl-terminal domain of human thrombospondin expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **266**:24257-9.

Kounnas MZ, Haudenschild CC, Strickland DK and Argraves WS (1994). Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo.* **8**:343-51.

Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT and Strickland DK (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. *Cell.* **82**:331-40.

Kraiem Z and Korem S (2000). Matrix metalloproteinases and the thyroid. *Thyroid.* **10**:1061-9

Krieger M and Herz J (1994). Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* **63**:601-37.

Kristensen T, Moestrup SK, Gliemann J, Bendtsen L, Sand O and Sottrup-Jensen L (1990). Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor. *FEBS Lett.* **276**:151-5.

Kushlinskii NE, Gershtein ES, Kazantseva IA, Kharitidi TIu, Liakina LT, Kazakov SP, Bagatyrev OP and Kalinin AP (2001). Plasminogen activators of urokinase and tissue types and their inhibitor (PAI-1) in cytosol fraction in thyroid diseases. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* **5**:32-4.

Kwaan HC (1992). Changes in blood coagulation, platelet function, and plasminogen-plasmin system in diabetes. *Diabetes.* **41**:32-5.

Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, Ginns EI and Bornstein P (1998). Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen

- fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol.* **140**:419-30.
- Labat-Robert J (2002). Fibronectin in malignancy. *Semin Cancer Biol.* **12**:187-95.
- Lahav J (1988). Thrombospondin inhibits adhesion of platelets to glass and protein-covered substrata. *Blood.* **71**:1096-9.
- Lakkaraju A, Rahman Y and Dubinsky JM (2002). Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates the endocytosis of anionic liposomes in neurons. *J Biol Chem.* **277**:15085-92
- Lawler J (2000). The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol.* **12**:634-40.
- Lawler J and Hynes RO (1986). The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins. *J Cell Biol.* **103**:1635-48.
- Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H and Hynes RO (1998). Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *J Clin Invest.* **101**:982-92.
- Lawler J, Weinstein R and Hynes RO (1988). Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol.* **107**:2351-61.
- Lawler JW, Slayter HS and Coligan JE (1978). Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem.* **253**:8609-16.
- Lawrence DA and Loskutoff DJ (1986). Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants. *Biochemistry.* **25**:6351-5.
- Li Y, Lu W and Bu G (2003). Essential role of the low density lipoprotein receptor-related protein in vascular smooth muscle cell migration. *FEBS Lett.* **555**:346-50.
- Li Y, Wood N, Grimsley P, Yellowlees D and Donnelly PK (1998-99). In vitro invasiveness of human breast cancer cells is promoted by low density lipoprotein receptor-related protein. *Invasion Metastasis.* **18**:240-51.
- Lijnen HR (2001). Elements of the fibrinolytic system. *Ann N Y Acad Sci.* **936**:226-36.
- Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V and Garbisa S (1981). Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* **41**:4629-36.
- Lohi J (2001). Laminin-5 in the progression of carcinomas. *Int J Cancer.* **94**:763-7.
- Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G and Deng G (1999). Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS.* **107**:54-61.

- Maniglia CA, Gomez JJ, Luikart SD and Sartorelli AC (1985). Glycosaminoglycan production and distribution in cloned B16 murine melanoma cell lines exhibiting different lung colony-forming efficiencies. *J Natl Cancer Inst.* **75**:111-20.
- Maquart FX, Simeon A, Pasco S and Monboisse JC (1999). Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines. *J Soc Biol.* **193**:423-8.
- Marcotte PA, Kozan IM, Dorwin SA and Ryan JM (1992). The matrix metalloproteinase pump-1 catalyzes formation of low molecular weight (pro)urokinase in cultures of normal human kidney cells. *J Biol Chem.* **267**:13803-6.
- Mazzieri R, Furlan F, D'Alessio S, Zonari E, Talotta F, Verde P and Blasi F (2006). A direct link between expression of urokinase plasminogen activator receptor, growth rate and oncogenic transformation in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene*. In press.
- Mazzieri R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S and Mignatti P (1997). Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J.* **16**:2319-32.
- McMahon GA, Petitcherc E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ, Ginsburg D, Brooks PC and Lawrence DA (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem.* **276**:33964-8.
- Mecham RP (1991). Elastin synthesis and fiber assembly. *Ann N Y Acad Sci.* **624**:137-46.
- Menshikov M, Plekhanova O, Cai H, Chalupsky K, Parfyonova Y, Bashtrikov P, Tkachuk V and Berk BC (2006). Urokinase plasminogen activator stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via redox-dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26**:801-7.
- Mikhailenko I, Kounnas MZ and Strickland DK (1995). Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates the cellular internalization and degradation of thrombospondin. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem.* **270**:9543-9.
- Mikhailenko I, Krylov D, Argraves KM, Roberts DD, Liao G and Strickland DK (1997). Cellular internalization and degradation of thrombospondin-1 is mediated by the amino-terminal heparin binding domain (HBD). High affinity interaction of dimeric HBD with the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* **272**:6784-91.
- Misenheimer TM and Mosher DF (1995). Calcium ion binding to thrombospondin 1. *J Biol Chem.* **270**:1729-33.
- Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thogersen HC, Nykjaer A, Andreasen PA, Rasmussen HH, Sottrup-Jensen L and Gliemann J (1993). Alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes, plasminogen activator inhibitor type-1-plasminogen activator complexes, and receptor-associated protein bind to a region of the alpha 2-macroglobulin receptor containing a cluster of eight complement-type repeats. *J Biol Chem.* **268**:13691-6.
- Morimoto K, Mishima H, Nishida T and Otori T (1993). Role of urokinase type plasminogen activator (u-PA) in corneal epithelial migration. *Thromb Haemost.* **69**:387-91.

- Moroz LA (1981). Mini-plasminogen: a mechanism for leukocyte modulation of plasminogen activation by urokinase. *Blood*. **58**:97-104.
- Muramatsu H, Zou K, Sakaguchi N, Ikematsu S, Sakuma S and Muramatsu T (2000). LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. **270**:936-41.
- Murphy-Ullrich JE and Hook M (1989). Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J Cell Biol*. **109**:1309-19.
- Murphy-Ulrich JE (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest*. **107**:785-90.
- Myllyharju J and Kivirikko KI (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med*. **3**:7-21.
- Nagase H (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. **1378**:151-60.
- Namiranian S, Naito Y, Kakkar VV and Scully MF (1995). Bound plasminogen is rate-limiting for cell-surface-mediated activation of plasminogen by urokinase. *Biochem J*. **309**:977-82.
- Nar H, Bauer M, Stassen JM, Lang D, Gils A and Declerck PJ (2000). Plasminogen activator inhibitor 1. Structure of the native serpin, comparison to its other conformers and implications for serpin inactivation. *J Mol Biol*. **297**:683-95.
- Nath D, Williamson NJ, Jarvis R and Murphy G (2001). Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci*. **114**:1213-20.
- Neels JG, van Den Berg BM, Lookene A, Olivecrona G, Pannekoek H and van Zonneveld AJ (1999). The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem*. **274**:31305-11.
- Nguyen DH, Hussaini IM and Gonias SL (1998). Binding of urokinase-type plasminogen activator to its receptor in MCF-7 cells activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 which is required for increased cellular motility. *J Biol Chem*. **273**:8502-7.
- Noe CE, Haynsworth RF Jr, Ramsay MA, Vera RL, Racz TA, Clark T, Aguanno J, Steves J and Ganter E (2002). Outcomes of a pain management educational initiative at Baylor University Medical Center. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. **15**:3-5.
- Noe V, Fingleton B, Jacobs K, Crawford HC, Vermeulen S, Steelant W, Bruyneel E, Matrisian LM and Mareel M (2001). Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci*. **114**:111-118.
- Novotna J and Herge J (2002). Possible role of matrix metalloproteinases in reconstruction of peripheral pulmonary arteries induced by hypoxia. *Physiol Res*. **51**:323-34.

- Nykanen A, Haley B and Zamore PD (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. **107**:309-21.
- Nykjaer A, Bengtsson-Olivecrona G, Lookene A, Moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel U and Gliemann J (1993). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase. *J Biol Chem*. **268**:15048-55.
- Nykjaer A, Conese M, Christensen EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J and Blasi F (1997). Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. *EMBO J*. **16**:2610-20.
- Nykjaer A, Petersen CM, Moller B, Jensen PH, Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thogersen HC, Munch M, Andreasen PA, et al. (1992). Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes. *J Biol Chem*. **267**:14543-6.
- Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K and Hayakawa T (1992). Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem*. **267**:21712-9.
- Okada SS, Grobmyer SR and Barnathan ES (1996). Contrasting effects of plasminogen activators, urokinase receptor, and LDL receptor-related protein on smooth muscle cell migration and invasion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **16**:1269-76.
- Okumura Y, Sato H, Seiki M and Kido H (1997). Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS Lett*. **402**:181-4.
- Orend G and Chiquet-Ehrismann R (2000). Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Exp Cell Res*. **261**:104-10.
- Orr AW, Elzie CA, Kucik DF and Murphy-Ullrich JE (2003). Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci*. **116**:2917-27.
- Ossowski L and Aguirre-Ghiso JA (2000). Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol*. **12**:613-20.
- Packman KS, Demeure MJ, Doffek KM and Wilson SD (1995). Increased plasminogen activator and type IV collagenase activity in invasive follicular thyroid carcinoma cells. *Surgery*. **118**:1011-6;
- Pankov R and Yamada KM (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. **115**:3861-3.

- Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, van Zonneveld AJ and van Mourik JA (1986). Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J.* **5**:2539-44.
- Pappot H, Gardsvoll H, Romer J, Pedersen AN, Grondahl-Hansen J, Pyke C and Brunner N (1995). Plasminogen activator inhibitor type 1 in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **376**:259-67.
- Parsons SL, Watson SA, Brown PD, Collins HM and Steele RJ (1997). Matrix metalloproteinases. *Br J Surg.* **84**:160-6.
- Pasco S, Ramont L, Venteo L, Pluot M, Maquart FX and Monboisse JC (2004). In vivo overexpression of tumstatin domains by tumor cells inhibits their invasive properties in a mouse melanoma model. *Exp Cell Res.* **301**:251-65.
- Patel VA, Hill DJ, Eggo MC, Sheppard MC, Becks GP and Logan A (1996). Changes in the immunohistochemical localisation of fibroblast growth factor-2, transforming growth factor-beta 1 and thrombospondin-1 are associated with early angiogenic events in the hyperplastic rat thyroid. *J Endocrinol.* **148**:485-99.
- Patey M (2002). Recherche de nouveaux marqueurs protéiques impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire en pathologie thyroïdienne. *Th. Univ. : Anatomo-Pathologie, Reims Champagne-Ardennes.*
- Patey M, Delemer B, Bellon G, Martiny L, Pluot M and Haye B (1999). Immunohistochemical study of thrombospondin and its receptors alpha root of beta 3 and CD36 in normal thyroid and in thyroid tumours. *J Clin Pathol.* **52**:895-900.
- Paulsson M (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **27**:93-127.
- Pellerin S, Croizet K, Rabilloud R, Feige JJ, Rousset B (1999). Regulation of the three-dimensional organization of thyroid epithelial cells into follicle structures by the matricellular protein, thrombospondin-1. *Endocrinology.* **140**:1094-103.
- Pellerin S, Lafeuillade B, Wade RH, Savona C, Chambaz EM and Feige JJ (1993). The molecular structure of corticotropin-induced secreted protein, a novel member of the thrombospondin family. *J Biol Chem.* **268**:18810-7.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ and Black RA (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* **282**:1281-4.
- Pietrzik CU, Yoon IS, Jaeger S, Busse T, Weggen S and Koo EH (2004). FE65 constitutes the functional link between the low-density lipoprotein receptor-related protein and the amyloid precursor protein. *J Neurosci.* **24**:4259-65.

Planus E, Barlovatz-Meimon G, Rogers RA, Bonavaud S, Ingber DE and Wang N (1997). Binding of urokinase to plasminogen activator inhibitor type-1 mediates cell adhesion and spreading. *J Cell Sci.* **110**:1091-8.

Pollanen J, Saksela O, Salonen EM, Andreasen P, Nielsen L, Dano K and Vaheri A (1987). Distinct localizations of urokinase-type plasminogen activator and its type 1 inhibitor under cultured human fibroblasts and sarcoma cells. *J Cell Biol.* **104**:1085-96.

Potempa J, Korzus E and Travis J The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* **269**:15957-60.

Pressner KT (1990). Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun.* **168**:966-71.

Qian X, Wang TN, Rothman VL, Nicosia RF and Tuszynski GP (1997). Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res.* **235**:403-12.

Quax PH, Boxman IL, van Kesteren CA, Verheijen JH and Ponc M (1994). Plasminogen activators are involved in keratinocyte and fibroblast migration in wounded cultures *in vitro*. *Fibrinolysis.* **8**:221-228.

Rabbani SA, Mazar AP, Bernier SM, Haq M, Bolivar I, Henkin J and Goltzman D (1992). Structural requirements for the growth factor activity of the amino-terminal domain of urokinase. *J Biol Chem.* **267**:14151-6.

Ragno P, Montuori N, Covelli B, Hoyer-Hansen G and Rossi G (1998). Differential expression of a truncated form of the urokinase-type plasminogen-activator receptor in normal and tumor thyroid cells. *Cancer Res.* **58**:1315-9.

Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Rothhut B, Soula-Rothhut M, Ghoneim C, Sid B, Morjani H, El Btaouri H and Martiny L (2006). The C-terminal CD47/IAP-binding domain of thrombospondin-1 prevents camptothecin- and doxorubicin-induced apoptosis in human thyroid carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta.* **1763**:1125-34.

Rath GM, Schneider C, Dedieu S, Sartelet H, Morjani H, Martiny L and El Btaouri H (2006). Thrombospondin-1 C-terminal-derived peptide protects thyroid cells from ceramide-induced apoptosis through the adenylyl cyclase pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* **38**:2219-28.

Redlitz A and Plow EF (1995). Receptors for plasminogen and t-PA: an update. *Baillieres Clin Haematol.* **8**:313-27.

Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M and Murphy-Ullrich JE (1999). The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* **274**:13586-93.

Rijken DC (1995). Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol.* **8**:291-312.

- Rondeau E, Ochi S, Lacave R, He CJ, Medcalf R, Delarue F and Sraer JD (1989). Urokinase synthesis and binding by glomerular epithelial cells in culture. *Kidney Int.* **36**:593-600.
- Ross R and Bornstein P (1969). The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. *J Cell Biol.* **40**:366-81.
- Sage EH and Bornstein P (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem.* **266**:14831-4.
- Salonen EM, Saksela O, Vartio T, Vaheri A, Nielsen LS and Zeuthen J (1985). Plasminogen and tissue-type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem.* **260**:12302-7.
- Salonen EM, Zitting A and Vaheri A (1984). Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator. *FEBS Lett.* **172**:29-32.
- Sargiannidou I, Zhou J and Tuszynski GP (2001). The role of thrombospondin-1 in tumor progression. *Exp Biol Med (Maywood).* **226**:726-33.
- Scarpino S, Di Napoli A, Taraboletti G, Cancrini A and Ruco LP (2005). Hepatocyte growth factor (HGF) downregulates thrombospondin 1 (TSP-1) expression in thyroid papillary carcinoma cells. *J Pathol.* **205**:50-6.
- Scherberich A, Tucker RP, Samandari E, Brown-Luedi M, Martin D and Chiquet-Ehrismann R (2004). Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. *J Cell Sci.* **117**:571-81.
- Schittny JC and yurchenco PD (1989). Basement membranes: molecular organization and function in development and disease. *Curr Opin Cell Biol.* **1**:983-8.
- Schultz-Cherry S and Murphy-Ullrich JE (1993). Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol.* **122**:923-32.
- Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Krutzsch HC, Roberts DD and Murphy-Ullrich JE (1995). Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem.* **270**:7304-10.
- Schultz-Cherry S, Lawler J and Murphy-Ullrich JE (1994). The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* **269**:26783-8.
- Schwartz I, Seger D and Shaltiel S (1999). Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* **31**:539-44.
- Shapiro SD (1998). Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* **10**:602-8.
- Shapiro SD (2000). A concise yet informative stroll through matrix metalloproteinases and TIMPs. *J Cell Sci.* **113**:3355-6.

- Sheibani N and Frazier WA (1995). Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:6788-92.
- Schenk S and Quaranta V (2003). Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol*. **13**:366-75.
- Shishiba Y, Yanagishita M, Tanaka T, Ozawa Y and Kadowaki N (1984). Abnormal accumulation of proteoglycan in human thyroid adenocarcinoma tissue. *Endocrinol Jpn*. **31**:501-7.
- Sid B, Sartelet H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N, Haye B and Martiny L (2004). Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol*. **49**:245-58.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J and Whisstock JC (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem*. **276**:33293-6.
- Silverstein RL, Baird M, Lo SK and Yesner LM (1992). Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor. *J Biol Chem*. **267**:16607-12.
- Silverstein RL, Harpel PC and Nachman RL (1986). Tissue plasminogen activator and urokinase enhance the binding of plasminogen to thrombospondin. *J Biol Chem*. **261**:9959-65.
- Silverstein RL, Leung LL, Harpel PC and Nachman RL (1984). Complex formation of platelet thrombospondin with plasminogen. Modulation of activation by tissue activator. *J Clin Invest*. **74**:1625-33.
- Silverstein RL, Nachman RL, Pannell R, Gurewich V and Harpel PC (1990). Thrombospondin forms complexes with single-chain and two-chain forms of urokinase. *J Biol Chem*. **265**:11289-94.
- Sipes JM, Krutzsch HC, Lawler J and Roberts DD (1999). Cooperation between thrombospondin-1 type 1 repeat peptides and alpha(v)beta(3) integrin ligands to promote melanoma cell spreading and focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem*. **274**:22755-62.
- Sitrin RG, Todd RF, Albrecht E and Gyetko MR (1996). The urokinase receptor (CD87) facilitates CD11b/CD18-mediated adhesion of human monocytes. *J Clin Invest*. **97**:1942-51.
- Smit JW, van der Pluijm G, Romijn HA, Lowik CW, Morreau H and Goslings BM (1999). Degradation of extracellular matrix by metastatic follicular thyroid carcinoma cell lines: role of the plasmin activation system. *Thyroid*. **9**:913-9.
- Sottile J, Selegue J and Mosher DF (1991). Synthesis of truncated amino-terminal trimers of thrombospondin. *Biochemistry*. **30**:6556-62.

Sounni NE, Janssen M, Foidart JM and Noel A (2003). Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol.* **22**:55-61.

Springer TA (1998). An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J Mol Biol.* **283**:837-62.

Stahl A and Mueller BM (1994). Binding of urokinase to its receptor promotes migration and invasion of human melanoma cells in vitro. *Cancer Res.* **54**:3066-71.

Stahl A and Mueller BM (1995). The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae. *J Cell Biol.* **129**:335-44.

Steck PA, Cheong PH, Nakajima M, Yung WK, Moser RP and Nicolson GL (1987). Altered expression of glycosaminoglycans in metastatic 13762NF rat mamma adenocarcinoma cells. *Biochemistry.* **26**:1020-8.

Stefansson S and Lawrence DA (1996). The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin. *Nature.* **383**:441-3.

Stein PE and Carrell RW (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nat Struct Biol.* **2**:96-113.

Stepanova V, Bobik A, Bibilashvily R, Belogurov A, Rybalkin I, Domogatsky S, Little PJ, Goncharova E and Tkachuk V (1997). Urokinase plasminogen activator induces smooth muscle cell migration: key role of growth factor-like domain. *FEBS Lett.* **414**:471-4.

Stephens RW, Pollanen J, Tapiovaara H, Leung KC, Sim PS, Salonen EM, Ronne E, Behrendt N, Dano K and Vaheri A (1989). Activation of pro-urokinase and plasminogen on human sarcoma cells: a proteolytic system with surface-bound reactants. *J Cell Biol.* **108**:1987-95.

Sternlicht MD and Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**:463-516.

Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC and Liotta LA (1989). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem.* **264**:17374-8.

Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Wachter MP, Margulies IM and Liotta LA (1989). The activation of human type IV collagenase proenzyme. Sequence identification of the major conversion product following organomercurial activation. *J Biol Chem.* **264**:1353-6.

Stockinger W, Brandes C, Fasching D, Hermann M, Gotthardt M, Herz J, Schneider WJ and Nimpf J (2000). The reelin receptor ApoER2 recruits JNK-interacting proteins-1 and -2. *J Biol Chem.* **275**:25625-32.

Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, Lawler J and Detmar M (1999). Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* **155**:441-52.

Streuli C (1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* **11**:634-40.

Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M and Argraves WS (1990). Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem.* **265**:17401-4.

Strickland DK, Gonias SL and Argraves WS (2002). Diverse roles for the LDL receptor family. *Trends Endocrinol Metab.* **13**:66-74.

Strickland DK, Kounnas MZ and Argraves WS (1995). LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism. *FASEB J.* **9**:890-8.

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA and Goldberg GI (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* **270**:5331-8.

Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G and Nagase H (1990). Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry.* **29**:10261-70.

Svensson L, Aszodi A, Heinegard D, Hunziker EB, Reinholt FP, Fassler R and Oldberg A (2002). Cartilage oligomeric matrix protein-deficient mice have normal skeletal development. *Mol Cell Biol.* **22**:4366-71.

Takayama Y, Takahashi H, Mizumachi K and Takezawa T (2003). Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is required for lactoferrin-enhanced collagen gel contractile activity of human fibroblasts. *J Biol Chem.* **278**:22112-8.

Takayama Y and Takezawa T (2006). Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors. *Biochem Cell Biol.* **84**:268-74.

Tanaka K, Sonoo H, Kurebayashi J, Nomura T, Ohkubo S, Yamamoto Y and Yamamoto S (2002). Inhibition of infiltration and angiogenesis by thrombospondin-1 in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res.* **8**:1125-31.

Tang H, Kerins DM, Hao Q, Inagami T and Vaughan DE (1998). The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* **273**:18268-72.

Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R and Ziche M (2000). The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J.* **14**:1674-6.

Timar J, Diczhazi C, Bartha I, Pogany G, Paku S, Raso E, Tovari J, Ladanyi A, Lapis K, Kopper L, et al. (1995). Modulation of heparan-sulphate/chondroitin-sulphate ratio by glycosaminoglycan biosynthesis inhibitors affects liver metastatic potential of tumor cells. *Int J Cancer.* **62**:755-61.

- Timpl R (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* **8**:618-24.
- Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ and Bouck N (1993). Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol.* **122**:497-511.
- Tong D, Czerwenka K, Sedlak J, Schneeberger C, Schiebel I, Concini N, Leodolter S and Zeillinger R (1999). Association of in vitro invasiveness and gene expression of estrogen receptor, progesterone receptor, pS2 and plasminogen activator inhibitor-1 in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* **56**:91-7.
- Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S and Matsumura F (2004). Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol.* **164**:427-39.
- Travis J and Salvesen GS (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem.* **52**:655-709
- Trommsdorff M, Borg JP, Margolis B and Herz J (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* **273**:33556-60.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA and Herz J (1999). Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell.* **97**:689-701.
- Tryggvason K, Hoyhtya M and Salo T (1987). Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta.* **907**:191-217.
- Tsatas D and Kaye AH (2003). The role of the plasminogen activation cascade in glioma cell invasion: a review. *J Clin Neurosci.* **10**:139-45.
- Turley EA and Tretiak M (1985). Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants in vivo and in vitro. *Cancer Res.* **45**:5098-105.
- Tuszynski GP and Kowalska MA (1991). Thrombospondin-induced adhesion of human platelets. *J Clin Invest.* **87**:1387-94.
- Tuszynski GP, Rothman VL, Papale M, Hamilton BK and Eyal J (1993). Identification and characterization of a tumor cell receptor for CSVTCG, a thrombospondin adhesive domain. *J Cell Biol.* **120**:513-21.
- Uitto J, Christiano AM, Kahari VM, Bashir MM, Rosenbloom J (1991). Molecular biology and pathology of human elastin. *Biochem Soc Trans.* **19**:824-9.
- Ulery PG, Beers J, Mikhailenko I, Tanzi RE, Rebeck GW, Hyman BT and Strickland DK (2000). Modulation of beta-amyloid precursor protein processing by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence that LRP contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* **275**:7410-5.

- Ulisse S, Baldini E, Toller M, Marchioni E, Giacomelli L, De Antoni E, Ferretti E, Marzullo A, Graziano FM, Trimboli P, Biordi L, Curcio F, Gulino A, Ambesi-Impiombato FS and D'Armiento M (2006). Differential expression of the components of the plasminogen activating system in human thyroid tumour derived cell lines and papillary carcinomas. *Eur J Cancer*. **42**:2631-2638.
- Unger S and Hecht JT (2001). Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: New etiologic developments. *Am J Med Genet*. **106**:244-50.
- Urban Z, Riazi S, Seidl TL, Katahira J, Smoot LB, Chitayat D, Boyd CD and Hinek A (2002). Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supraaortic stenosis and Williams-Beuren syndrome. *Am J Hum Genet*. **71**:30-44.
- Van der Rest M and Garonne R (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J*. **5**:2814-23.
- van Muijen GN, Danen EH, Veerkamp JH, Ruiter DJ, Lesley J and van den Heuvel LP (1995). Glycoconjugate profile and CD44 expression in human melanoma cell lines with different metastatic capacity. *Int J Cancer*. **61**:241-8.
- Van Nostrand WE, Wagner SL, Farrow JS and Cunningham DD (1990). Immunopurification and protease inhibitory properties of protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor. *J Biol Chem*. **265**:9591-4.
- Varani J, Nickoloff BJ, Dixit VM, Mitra RS and Voorhees JJ (1989). All-trans retinoic acid stimulates growth of adult human keratinocytes cultured in growth factor-deficient medium, inhibits production of thrombospondin and fibronectin, and reduces adhesion. *J Invest Dermatol*. **93**:449-54.
- Varani J, Nickoloff BJ, Riser BL, Mitra RS, O'Rourke K and Dixit VM (1988). Thrombospondin-induced adhesion of human keratinocytes. *J Clin Invest*. **81**:1537-44.
- Vecchi M, Baulida J and Carpenter G (1996). Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem*. **271**:18989-95.
- Vincenti MP (2001). The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol Biol*. **151**:121-48
- Vincenti MP and Brinckerhoff CE (2002). Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*. **4**:157-64.
- Vincenti MP, Coon CI, White LA, Barchowsky A and Brinckerhoff CE (1996). src-related tyrosine kinases regulate transcriptional activation of the interstitial collagenase gene, MMP-1, in interleukin-1-stimulated synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. **39**:574-82.
- Vrhovski B and Weiss AS (1998). Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem*. **258**:1-18.

- Wang N, Planus E, Pouchelet M, Fredberg JJ and Barlovatz-Meimon G (1995). Urokinase receptor mediates mechanical force transfer across the cell surface. *Am J Physiol.* **268**:C1062-6.
- Wang TN, Qian XH, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Berger DH and Tuszynski GP (1996). Inhibition of breast cancer progression by an antibody to a thrombospondin-1 receptor. *Surgery.* **120**:449-54.
- Wang XQ and Frazier WA (1998). The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* **9**:865-74.
- Wang Z, Juttermann R and Soloway PD (2000). TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem.* **275**:26411-5.
- Weaver AM, Hussaini IM, Mazar A, Henkin J and Gonias SL (1997). Embryonic fibroblasts that are genetically deficient in low density lipoprotein receptor-related protein demonstrate increased activity of the urokinase receptor system and accelerated migration on vitronectin. *J Biol Chem.* **272**:14372-9.
- Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT and Horwitz AF (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* **6**:154-61.
- Webb DJ, Nguyen DH, Sankovic M and Gonias SL (1999). The very low density lipoprotein receptor regulates urokinase receptor catabolism and breast cancer cell motility *in vitro*. *J Biol Chem.* **274**:7412-20.
- Webb DJ, Nguyen DH and Gonias SL (2000). Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion. *J Cell Sci.* **113**:123-34.
- Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S and Chapman HA (1994). Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem.* **269**:32380-8.
- Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA and Chapman HA (1999). A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol.* **144**:1285-94.
- Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts DD and Steeg PS (1994). Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res.* **54**:6504-11.
- Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E and Damsky CH (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol.* **109**:877-89.

Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M and Bu G (2000). Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci.* **20**:542-9.

Zucker S, Drews M, Conner C, Foda HD, DeClerck YA, Langley KE, Bahou WF, Docherty AJ and Cao J (1998). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binds to the catalytic domain of the cell surface receptor, membrane type 1-matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *J Biol Chem.* **273**:1216-22.

## RESUME

L'invasion tumorale est un événement multifactoriel dans lequel la motilité cellulaire est associée à une protéolyse matricielle et implique des interactions entre les cellules tumorales et la matrice extracellulaire. Plusieurs études ont démontré le rôle important de la protéine matricielle d'adhérence TSP-1 dans la régulation de l'activité protéasique matricielle de MMP2 et d'uPA. TSP-1 apparaît notamment capable de réguler l'activité de ces deux protéases *via* sa capacité à interagir avec le récepteur d'endocytose LRP et à faciliter leur internalisation. Cependant, les propriétés de TSP-1 et de LRP sur l'invasion tumorale restent assez controversées selon les modèles d'études. Par exemple, TSP-1 constituerait pour certains un environnement protecteur pour uPA, alors que pour d'autres, TSP-1 serait capable d'inhiber son activité. D'autre part, LRP a été caractérisé comme étant responsable du caractère invasif de cellules de muscles lisses ou de cellules cancéreuses du sein. Néanmoins, de faibles expressions du récepteur ont été corrélées aux phénotypes invasifs de différentes lignées de cellules tumorales de la prostate. De plus, la neutralisation de LRP provoque une augmentation de la migration et de l'invasion chez des fibroblastes embryonnaires et des cellules de fibrosarcome.

Afin d'étudier le rôle de TSP-1 et de LRP dans les processus invasifs de cellules thyroïdiennes, nous avons utilisé deux lignées cellulaires dérivées d'un carcinome folliculaire thyroïdien et possédant des capacités invasives différentes : les cellules FTC-133, peu invasives, issues d'une métastase ganglionnaire et les cellules FTC-238, très invasives, issues d'une métastase pulmonaire.

Nous mettons en évidence que les cellules FTC-238 expriment et sécrètent davantage de TSP-1. Ces cellules présentent également une augmentation de sécrétion et d'activation de MMP2 et d'uPA. Après avoir observé le rôle effectif d'uPA dans l'invasion basale des cellules FTC, nous montrons que TSP-1 est capable de stimuler leur potentiel invasif en provoquant une augmentation d'uPA et de son activité dans le milieu extracellulaire. L'augmentation d'expression de TSP-1 pourrait ainsi constituer un des mécanismes impliqués dans l'acquisition du phénotype hautement invasif des cellules FTC-238.

Nous mettons en évidence, par ailleurs, une diminution importante de l'expression de LRP dans les cellules FTC-238. Nous montrons que la neutralisation du récepteur induit une augmentation de l'invasion chez les cellules FTC et que cet effet est dépendant de l'activité uPA, mais pas de MMP2. Lors de ces expériences, nous montrons que ces cellules présentent également une plus forte accumulation de TSP-1 et d'uPA dans leur milieu extracellulaire. En revanche, l'accumulation de MMP2 n'est pas affectée par la neutralisation de LRP dans nos conditions expérimentales.

Ainsi, la diminution d'expression de LRP chez les cellules FTC-238 provoquerait une accumulation d'uPA et de TSP-1 dans l'environnement extracellulaire. L'accumulation de TSP-1 potentialiserait à son tour l'activité d'uPA, ce qui conférerait aux cellules FTC-238 un pouvoir invasif accru.

**Mots-clefs :** Carcinome folliculaire thyroïdien, invasion tumorale, LRP, TSP-1, uPA, MMP2, protéolyse extracellulaire.