Université de Reims-Champagne Ardenne UFR Pharmacie

2007 N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

(Spécialité : Biochimie-Biologie Moléculaire)

Soutenue publiquement le 02 avril 2007

par

Abdelaziz FAHEM

Né le 04 octobre 1979

ELASTOKINES ET ANGIOGENESE : ROLE DE LA MT1-MMP ET SIGNALISATION INTRACELLULAIRE MEDIEE PAR S-GAL.

Membres du Jury:

Rapporteurs: Monsieur le Professeur Jean Wallach (Lyon)

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Vannier (Rouen)

Examinateurs: Madame le Professeur Emmanuelle Petitfrère (Reims)

Madame le Docteur Françoise Fauvel-Lafève (Paris)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Moncef Guenounou (Reims)

Co-Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Georges Bellon (Reims)

Remerciements.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur François-Xavier Maquart pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, CNRS UMR 6198, et permis ainsi d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Je témoigne toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Moncef Guenounou ainsi qu'au Docteur Georges Bellon pour m'avoir encadré tout au long de ces années que nous avons passées ensemble. Merci pour votre aide, votre rigueur scientifique et vos conseils toujours judicieux.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean Wallach et Monsieur le Professeur Jean-Pierre Vannier d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Emmanuelle Petitfrère et le Docteur Françoise Fauvel-Lafève d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

Un immense remerciement à l'ensemble des personnels de l'Unité CNRS UMR 6198, ainsi qu'aux personnels de l'EA 3796.

A mes parents, pour avoir toujours cru en moi. Je vous aime tant. A mes Frères et Sœurs. Je vous aime tant bande de Chpounos. A GuGu la tulipe et Bouchnefa.

A ma tendre.

A mes amis du Quartier Sud pour cette jeunesse inoubliable. A mes amis de Croix Rouge.

Liste des Publications :

Robinet A, <u>Fahem A</u>, Cauchard JH, Huet E, Vincent L, Lorimier S, Antonicelli F, Soria C, Crepin M, Hornebeck W, Bellon G (2005).

Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. J Cell Science. 118:343-56.

<u>Fahem A</u>, Robinet A, Duca L., Rotthut M, Rotthut B, Soria C, Guenounou M, Hornebeck W, Bellon (2007).

Membrane type I matrix metalloproteinase up-regulation by elastin-derived peptides in endothelial cells is mediated by nitric oxide. Soumis dans J. Biol. Chem.

Liste des communications Orales :

Réunion du programme de recherche interrégional "Régulation de la Matrice Extracellulaire et Pathologie". Reims, le 22 octobre 2004.

« Elastine et angiogenèse ».

XIII ème Réunion Annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif.

25, 26, 27 mars 2004- Palais des congrès d'Arcachon

« Invalidation de l'expression de la MT1-MMP par la technique des siRNAs : conséquence sur l'angiogenèse induite par les peptides d'élastine »

Pôle de recherche de Biologie Moléculaire et Epidémiologie, Caen. Auditorium du centre François Baclesse; 14 mai 2004.

« Exemple d'application des siRNA : Transcription in vitro et application à l'étude de la matrice extracellulaire. »

Réunion du programme de recherche interrégional "Régulation de la Matrice Extracellulaire et Pathologie". Caen, le 6 Juin 2005.

« Elastine et angiogenèse »

SOMMAIRE

Liste des Abréviations.	10
Liste des Figures et Tableaux.	13
Introduction	17
I. La progression tumorale.	
•	
I.2.1. Généralités.	
I.2.1.1. Mécanismes moléculaires et cellulaires.	21
I.2.2. Angiogenèse tumorale.	24
I.2.3. Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans l'angiogenèse.	27
•	
_	
I.2.3.5. Rôle dans la régulation des MMPs.	33
II I a matrica avtracallulaira (MFC)	2.5
·	13 17 18 18 20 20 21 24 27 28 30 33 33 35 35 35 37 37 37 38 38 38 38 38
-	
II.2.2.2. Les protéoglycanes.	
III. L'élastine.	41
III.1 Structure.	41
III.1.1. Structure du gène de l'élastine.	41
III.1.2. Contrôle de l'expression.	41
III.1.3. Modèles structuraux.	
•	
<u> </u>	
<u> </u>	
<u> •</u>	
<u>.</u>	
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	
	54
I. La progression tumorale. I.1. Généralités. I.2. L'angiogenèse. I.2.1.1 Mécanismes moléculaires et cellulaires. I.2.2. Angiogenèse tumorale. I.2.3. Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans l'angiogenèse. I.2.3.1. Généralités. I.2.3.2. Biosynthèse et mode d'action du NO. I.2.3.3. Mécanismes de régulation. I.2.3.4. Rôles physiologiques du monoxyde d'azote. I.2.3.5. Rôle dans la régulation des MMPs. II. La matrice extracellulaire (MEC). II.1. Les protéines fibrillaires. II.1.1. Les collagènes et les fibres de collagènes. II.1.2. L'élastine et les fibres élastiques. II.2.1. Les glycoprotéines de structure. II.2.2. Les protéines non fibrillaires. II.2.1. Les glycoprotéines de structure. III.2.2. Les polysaccharides. III.2.2. Les protéoglycanes. III. L'élastine. III.1. Structure du gène de l'élastine. III.1. Structure du gène de l'élastine. III.1.2. Contrôle de l'expression.	56

IV.2.1. Les collagénases.	56
IV.2.2. Les gélatinases.	57
IV.2.3. Les stromélysines.	58
IV.2.4. Les matrilysines.	59
IV.2.5. Les MMPs de type membranaire ou MT-MMPs.	59
IV.2.6. Autres MMPs.	60
IV.3. Mécanisme d'activation et de régulation des MMPs.	61
	61
IV.3.1.1. Généralités.	61
	62
IV.3.2. Activation des MMPs.	63
$\boldsymbol{\varepsilon}$	63
1	65
	66
	66
IV.3.3.2. La macroglobuline- α_{2}	69
IV.3.3.3. Autres inhibiteurs connus.	69
IV.4. Rôles des MMPs dans la progression tumorale.	70
IV.4.1. Généralités.	70
IV.4.2. Rôles des MMPs dans la progression tumorale.	72
IV.4.2.1. Perte d'adhérence.	74
IV.4.2.2. Invasion.	75
	75
IV.4.2.4. Angiogenèse.	76
IV.4.2.5. Intravasation, extravasation et croissance de tumeurs métastatiques.	76
V. La MT1-MMP.	77
V.1. Généralité sur la MT1-MMP.	77
V.2. La MT1-MMP dans l'angiogenèse.	77
V.2.1. Rôle multiple de la MT1-MMP.	78
V.2.1.1. Activation de la proMMP-2.	78
V.2.1.2. La dégradation de la MEC et l'invasion par les cellules endothéliales.	79
V.2.1.3. La Migration de cellules endothéliales.	79
V.2.1.4. Formation de capillaires.	79
V.2.1.5. Recrutement d'autres cellules.	80
V.2.1.6. Autres fonctions.	80
V.2.2. Régulation multiples de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales.	80
V.2.2.1. Régulation de l'expression.	80
V.2.2.2. Localisation subcellulaire et compartimentation.	80
V.2.2.3. Internalisation et trafique.	81
V.2.2.4. Dimérisation.	82
8 8	82
V.2.2.6. Modifications Post-transcriptionnelles.	82
VI. L'interférence par l'ARN.	83
VI.1. Introduction.	83
VI.2. Historique de l'ARN interférence.	83
VI.2.1. Découverte fortuite du phénomène d'ARN interférence.	83
<u>.</u>	84
•	85
VI.3. Mécanisme de l'ARNi.	86

	88
VI.3.1.3. Production des miARN: intervention de Drosha et Dicer.	88
VI.3.2. Mécanisme de la phase effectrice.	90
VI.3.2.1. Le complexe RISC.	91
VI.3.2.2. Activation de RISC.	91
VI.3.2.3. Deux mécanismes d'action : dégradation d'ARNm ou inhibition	02
de la traduction. VI.3.3. Etape d'amplification.	92 94
Matériel et Méthodes.	98
I. Matériel.	 99
I.1. kappa-élastine.	99
I.2. Le peptide (VGVAPG)3.	99
I.3. Inhibiteurs des voies de signalisation. I.3.1. U0126, inhibiteur de MEK 1/2.	99 99
I.3.1. U0126, inhibiteur de la PI ₃ Kinase.	99 100
I.3.3. H-89 et KT-5720, inhibiteur de PKA.	100
I.3.4. F-3325 et L-NIO, Inhibiteur de NO synthase.	101
I.4. Activateur de la voie PKG/MEK 1,2/ERK1/2.	102
I.4.1. DEA-NOate, donneur chimique de NO.	102
I.4.2. 8-bromo-cGMP, analogue du GMPc.	103
I.5. Liste des anticorps utilisés.	103
II. Méthodes.	105
II.1. Culture cellulaire.	105
II.1.1 Lignées utilisées.	105
II.1.1.1. Cellules endothéliales humaines issues de veine ombilicale (HUVEO II.1.1.2. Cellules endothéliales humaines issues de la microvasculature (HMI	EĆs)106
II.1.3. Lignée HT-1080. II.1.2. Obtention de sous-cultures par trypsinisation.	106 106
II.1.3. Mise au repos des cellules.	106
II.1.4. Stimulation des cellules.	100
II.1.5. Formation de pseudo tubes par les cellules endothéliales cultivées sur un gel	
de matrigel.	107
II.2. Techniques d'analyses des protéines.	108
II.2.1. Extraction des protéines à l'aide du tampon RIPA.	108
II.2.2. Dosage des protéines.	108
II.2.2.1. Dosage par la méthode de lowry.	108
II.2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.	109
II.2.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de	100
sodium.	109
II.2.4. Electrotransfert et Immuno-révélation des protéines.	109
II.2.5. L'immunoprécipitation. II.2.6. Test d'activité PI ₃ Kinase.	110 111
	111
II / / /vmographie en gel de gelatine	112
II.2.7. Zymographie en gel de gélatine. II.2.7.1. Préparation des milieux conditionnés.	112

II.2.8. Immunofluorescence in situ.

II.2.9. Dosage par Elisa de la MT1-MMP.	113
II.3. Utilisation d'un dominant négatif Akt.	113
II.4. Cytokine arrays.	114
II.5. Dosage du monoxyde d'azote (NO).	114
II.6. Technique de biologie moléculaire.	115
II.6.1. L'interférence par l'ARN.	115
II.6.1.1. Stratégie.	115
II.6.1.2. Synthèse des siARN.	116
II.6.1.2.1. Préparation des oligonucléotides.	117
II.6.1.2.2. Hybridation avec le promoteur T7.	118
II.6.1.2.3. Synthèse par l'enzyme de Klenow.	118
II.6.1.2.4. Transcription par la polymérase T7.	118
II.6.1.2.5. Formation du dsRNA.	118
II.6.1.2.6. Digestion par la Dnase et la Rnase.	118
II.6.1.2.7. Purification des siARN.	119
II.6.1.3. Marquage des siARN à la Cyanine 3.	119
II.6.1.4. Transfection des siARN.	120
II.6.1.5. Plasmide codant les siARN.	120
II.6.1.5.1. Construction des cassettes siARN.	120
II.6.1.5.2. Le vecteur d'expression pRNA Tin H1.2/Neo.	122
II.6.1.5.3. Insertion des cassettes de siARN.	123
II.6.1.5.4. Clonage du plasmide.	123
II.6.1.5.5. Extraction de plasmide. II.6.2. Extractions des ARN totaux.	124 124
II.6.3. Transcription inverse (RT) des ARNm en ADNc.	124
II.6.4. La réaction de polymérisation en chaîne : PCR (Polymerase Chain Reaction).	125
II.6.5. Transfections stable de plasmides.	127
II.7. Evaluation statistique.	128
11.7. Dianuation statistique.	120
Resultats.	129
	=
DADTIE I . Influence des nontides d'électine sur l'engiegenèse	120
PARTIE I : Influence des peptides d'élastine sur l'angiogenèse.	130
I.1. Stimulation du Phénotype angiogénique des cellules endothéliales in	1
vivo et in vitro par les peptides d'élastine.	131
I.1.1. Modèle in vivo de la membrane chorio-allantoïde de poulet.	131
I.1.2. Modèle in vitro en matrice tridimensionnelle.	132
I.1.3.Influence des PDE sur la migration et la survie cellulaire des cellules endothélia	
I.1.3.1. Effet des PDE sur la migration cellulaire.	132
I.1.3.2. Effet des PDE sur la survie cellulaire.	133
I.2. Implication du récepteur S-Gal.	135
I.3. Implication de la MT1-MMP.	135
I.4. Influence des peptides d'élastine sur la production de cytokines.	137
PARTIE II: Invalidation de l'expression de la MT1-MMP par	
la technique des petits ARN interférents.	140
II.1. Optimisation de la synthèse des siARN.	141
II.2. Marquage des siARN à la Cyanine 3.	143
II.3. Effets du siARN 107.	144
11.5. Elicis du SiAMA 107.	144

II.3.1. Influence du siARN sur l'expression de la MT1-MMP dans les cellules	
endothéliales.	144
II.3.2. Dosage Elisa de la MT1-MMP.	146
II.3.3. Immunolocalisation de la MT1-MMP.	147
II.3.4. Influence du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2.	148
II.3.2. Dosage Elisa de la MT1-MMP. II.3.3. Immunolocalisation de la MT1-MMP. II.3.4. Influence du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2. II.3.5. Influence du siARN 107 sur la tubulogenèse induite par les PDE. II.4. Spécificité des siARN. II.6. Transfection stable du siARN 107 dans les cellules HT-1080. PARTIE III: Signalisation intracellulaire induite par la fixation des peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les cellules endothéliales. III.1. Influence des peptides d'élastine sur la production de NO par le cellules endothéliales-Implication de S-Gal. III.2. Implication de la NO synthase dans la régulation de l'expressio de la MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.1. Influence d'inhibiteurs de NO synthase sur la régulation de l'expression de MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.2. Influence du F-3325 sur la régulation de l'activation de la proMMP-2 médi les PDE. III.2.3. Influence de F-3325 sur la régulation de la tubulogenèse médiée par les PD III.3. Activation de la voie PI₃Kinase/Akt/Erk1/2 par les PDE dans le cellules endothéliales. III.3.1. Implication de la sous unité p110γ de la PI₃Kinase. III.3.2. Implication de la protéine kinase Akt. III.3.3. Implication de la protéine kinase Akt. III.3.3. Implication de la PI₃Kinase dans la régulation de l'expression de la MT1-M la tubulogenèse et la production de NO. III.3.4. Implication de Erk1/2 dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP la par les PDE. III.3.5. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk1/2 médié par les PDE. III.3.7. Rôle d'Akt dans l'activation d'Erk1/2 médié par les PDE. III.3.8. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.9. Rôle d'Akt dans l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.1. Influence des PDE sur la production de GMPc. III.4.1. Influence des PDE sur la production de GMPc. III.4.2. Influence des PDE sur la production de l'expression de la MT1-MMP.	149
	151
II.6. Transfection stable du siARN 107 dans les cellules HT-1080. PARTIE III: Signalisation intracellulaire induite par la fixation les peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les ellules endothéliales. III.1. Influence des peptides d'élastine sur la production de NO par les cellules endothéliales-Implication de S-Gal. III.2. Implication de la NO synthase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.1. Influence d'inhibiteurs de NO synthase sur la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.2. Influence du F-3325 sur la régulation de l'activation de la proMMP-2 médiée par les PDE. III.2.3. Influence de F-3325 sur la régulation de la tubulogenèse médiée par les PDE. III.3. Activation de la voie PI₃Kinase/Akt/Erk1/2 par les PDE dans les cellules endothéliales. III.3.1. Implication de la sous unité p110γ de la PI₃Kinase. III.3.2. Implication de la protéine kinase Akt. III.3.3. Implication de la PI₃Kinase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP, la tubulogenèse et la production de NO. III.3.4. Implication de Erk1/2 dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE.	151
PARTIE III : Signalisation intracellulaire induite par la fixation	
• •	
cellules endothéliales.	153
endothéliales. 11.3.2. Dosage Elisa de la MT1-MMP. 11.3.3. Immunolocalisation de la MT1-MMP. 11.3.4. Influence du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2. 11.3.5. Influence du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2. 11.4. Spécificité des siARN. 11.6. Transfection stable du siARN 107 dans les cellules HT-1080. PARTIE III : Signalisation intracellulaire induite par la fixation des peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les cellules endothéliales. III.1. Influence des peptides d'élastine sur la production de NO par les cellules endothéliales-Implication de S-Gal. III.2. Implication de la NO synthase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.1. Influence d'inhibiteurs de NO synthase sur la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.2. Influence du F-3325 sur la régulation de l'activation de la proMMP-2 médiée pe les PDE. III.2.3. Influence de F-3325 sur la régulation de la tubulogenèse médiée par les PDE. III.3. Activation de la voie PI ₃ Kinase/Akt/Erk1/2 par les PDE dans les cellules endothéliales. III.3.1. Implication de la sous unité p110y de la PI ₃ Kinase. III.3.2. Implication de la protéine kinase Akt. III.3.3. Implication de la protéine kinase Akt. III.3.4. Implication de la PI ₃ Kinase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP la tubulogenèse et la production de NO. III.3.5. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.6. Cinétique d'activation de P38 par les PDE. III.3.7. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.7. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.1. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.1. Rôle d'Akt dans l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.4. Stimulation de la voie GMPc/PKG/MEK1/2/Erk1/2 par le NO conduisant à la régulation de l'expression de la MT1-MMP. III.4.1. Influence d'un donneur de NO sur l'expression de la MT1-MMP. III.4.2. Influence d'un donneur de NO sur l'expression de la MT1-MM	154
III.2. Implication de la NO synthase dans la régulation de l'expression	
	156
	156
endothéliales. II.3.2. Dosage Elisa de la MT1-MMP. II.3.3. Inmunolocalisation de la MT1-MMP. II.3.4. Influence du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2. II.3.5. Influence du siARN 107 sur la tubulogenèse induite par les PDE. II.4. Spécificité des siARN. II.6. Transfection stable du siARN 107 dans les cellules HT-1080. PARTIE III: Signalisation intracellulaire induite par la fixation des peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les cellules endothéliales. III.1. Influence des peptides d'élastine sur la production de NO par les cellules endothéliales-Implication de S-Gal. III.2. Implication de la NO synthase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.1. Influence d'inhibiteurs de NO synthase sur la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE. III.2.2. Influence du F-3325 sur la régulation de l'activation de la proMMP-2 médiée les PDE. III.2.3. Influence de F-3325 sur la régulation de la tubulogenèse médiée par les PDE. III.3.1. Implication de la voie PI ₃ Kinase/Akt/Erk1/2 par les PDE dans les cellules endothéliales. III.3.1. Implication de la sous unité p110y de la PI ₃ Kinase. III.3.2. Implication de la PI ₃ Kinase dans la régulation de l'expression de la MT1-MM la tubulogenèse et la production de NO. III.3.4. Implication de la Fl ₃ Kinase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP mét par les PDE. III.3.5. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk1/2 médié par les PDE. III.3.6. Cinétique d'activation de PSA par les PDE. III.3.7. Rôle d'Akt dans l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.7. Rôle d'Akt dans l'activation d'Erk1/2 médiée par les PDE. III.3.1. Influence des PDE sur la production de GMPC. III.4.1. Influence des PDE sur la production de GMPC. III.4.2. Influence d'un donneur de NO sur l'expression de la MT1-MMP. III.4.3. Influence d'un donneur de NO sur l'expression de la MT1-MMP. III.4.4. Implication de la voie raf-1/Erk1/2.	
	158
	158
•	
	159
	159
<u>.</u>	160
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
	161
	164
	165
	166
	167
<u> </u>	
-	168
• • • • • • • • • • • • • • • • • • •	168
<u> •</u>	168
•	169
III.4.4. Implication de la voie raf-1/Erk1/2.	170
Discussion et perspectives.	173
Bibliographie	186

Liste des Abréviations.

ADAM A Desintegrin and Metalloproteinase

ADAMTs A Desintegrin and Metalloproteinase with ThromboSpondin repeats

ADN Acide désoxyribonucléique

AMPc Adénosine 3',5'- monophosphate cyclique

AngII Angiotensine II

AP-1 et 2 Activator Protein-1 et 2 AP2 Adaptator Protein complex 2

APS Amonium persulfate

ARNm Acide Ribonucléique messager
ATP Adénosine 5'-triphosphate
b-FGF basic-Fibroblast Growth Factor

BET Bromure d'étidium
BH4 Tétrahydrobioptérine
BSA Bovin Serum Albumin
CBD Collagen Binding Domain
CCL CC chemokine ligand
CXCL CXC chemokine ligand
DEPC Diéthylpyrocarbonate

DMEM Dulbecco's Modified Eagle MediumdNTP Désoxynucléotide triphosphate

dsRNA double strand ARN **EBP** Elastin Binding Protein

EDRF Endothelial Derived Relaxing Factor
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF Epidermal Growth Factor

Egr-1 Early growth response protein 1

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Elk-1 ETS-like transcription factor-1 eNOS endothelial Nitric oxide Synthase

EPO Erythropoiétine

ERK Extracellular Signal-Regulated Kinase

FAD Flavine Adénine Dinucléotide
FITC Fluorescein isothiocyanate
FMN Flavine mononucléotide
FN Domaines fibronectine
GAG Glycosaminoglycanne

GAPDH Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase

GCs Guanylyl Cyclase soluble GFP Green Fluorescent Protein

GM-CSF Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor.

GMPc Guanosine 3',5'- monophosphate cyclique

GPI GlycosylphosphatidylinositolGRO Growth regulated geneGTP Guanosine 5'-triphosphate

HA Hémagglutinine

HIF Hypoxia Inducible Factor

HMECs Human Microvasculature Endothelial Cells

HRP Horse Radish Peroxidase

HUVECS Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM Intercellular adhesion molecule

IgImmunoglobulineIGFInsulin Growth FactorIgGImmunoglubiline G

IL Interleukine

iNOS Inductible Nitric Oxide Synthase

IP Immunoprécipitation

IP₃ Inositol 3, 4, 5-trisphosphate

kb
kDa
kiloDalton
Ke
kappa-élastine
KO
Knock-Out
LB
Luria Bertani

let letal

LDL Low Density Lipoprotein

LDL-RP Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein

LG Domaine laminine G line age-abnormal

LMMA N^G-monomethyl-L-arginine **L-NAME** N^G-nitro-L-arginine méthyl ester

LOX Lysyl Oxydase

MAGP-1 Microfibrills Associated Glycoprotein 1

MAPK Mitogen-Activated Kinase

MCP-1 Monocyte Chemoattractant Protein

MEC Matrice Extracellulaire MEK MAPK/Erk Kinase

miARN micro ARN

MMPs MétalloprotéinaseMT-MMP Membrane Type-MMP

Nase Neuraminidase Neu-1 Neuraminidase 1

NFAT1c Nuclear factor of activated T-cells 1c

NF-κB Nuclear Factor κB

nNOS Neuronal Nitric Oxide Synthase**NADH** Nicotinamide adenine dinucleotide

NO Nitric Oxyde

NOS Nitric Oxide Synthase

PAGE Polyacrylamide Gel ElectrophoresisPAI-1 Plasminogene activator inhibitior type 1

PAR-1 Protease-activator receptor 1
PAZ Piwi Argonaute Zwille

pb paire de bases

PBS Phosphate Buffered Saline

PCAM Platelet Endothelial Cell adhesion Molecule-1

PCOLCE Pro-Collagen C-Proteinase Enhancer

PCR Polymerase Chain Reaction

PDE Peptides issus de la Dégradation de l'Elastine

PDGF Platelet Derived Growth Factor
PDK Phosphoinositide-Dependent Kinases
PEA-3 Polyoma Enhancer A binding protein-3

PFA Paraformaldehyde

PI₃Kinase Phosphatidylinositol3-kinase Pl₃-P Phosphatidylinositol 3-phosphate

PIP₁ Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PIP₂ Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PIP₃ Phosphatidylinositol 3,4,5-bisphosphate

PKC Protéine Kinase A
PKC Protéine Kinase C
PKG Protéine Kinase G

PMA Phorbol Merystate Acetate

PP Protéine Protectrice

RdRP RNA-directed RNA polymerase

RECK Reversion inducing Cysteine riche protein with Kasal motifs

RER Réticulum Endoplasmique Rugueux **RNA-Induced Silencing Complex RISC RTK** Recepteur à Tyrosine Kinase SDF-1 Stromal cell-Derived Factor-1 **SDS** Sodium Dodécyl Sulfate S-Gal Spliced Galactosidase small interfering ARN **siARN** SP-1 Specific Protein 1

stARN small temporal ARN
SVF Sérum de Veau Foetal
TAE Tris Acétate EDTA
TBE Tris-borate EDTA
TBS Tris Buffered Saline

TBS-T Tris Buffered Saline Tween

Tcf-4 T cell factor 4

TEMED N,N,N',N'-Tetre-méthylènediamine

TE Tampon d'échantillon

Tet-R
 TFPI-2
 TGF
 TGF-/3 inhibitory element

Répresseur de la tétracycline
(tissue factor pathway inhibitor 2
Transforming Growth Factor
TGF-/3 inhibitory element

TIMP Tissue Inhibitor of Metalloproteinase

TNF-α TumorNecrosis Factor α

tTG Transglutaminase TSP Thrombospondine

uPA urokinase type Plasminogène Activator

UV Ultra-Violet

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor VCAM Vascular Cell Adhesion Molecule

β-Gal β-Galactosidase

Liste des figures.

<u>rigure 1.</u> Les différentes étapes de la progression tumorale.	20
Figure 2: Représentation schématique des différentes étapes de l'angiogenèse.	23
Figure 3: La vascularisation d'une tumeur est une étape essentielle à son	
développement.	25
Figure 4: Les principales étapes de l'angiogenèse tumorale.	26
Figure 5: Métabolisme du monoxyde d'azote.	27
Figure 6: Modèle d'activation de la GCs par le NO.	29
Figure 7: Structure de l'ADNc de la tropoélastine humaine.	41
Figure 8: Représentation schématique des domaines fonctionnels du promoteur du gène	
de l'élastine.	42
Figure 9: Modèles structuraux proposés de l'élastine.	43
Figure 10: Schématisation de l'étirement des fibres d'élastine.	43
Figure 11: Domaine en répitition de type VGVAPG dans l'exon 24.	44
Figure 12: Schématisation de la sécrétion et assemblage de l'élastine.	46
<u>Figure 13:</u> Schématisation de l'épissage alternatif du transcrit primaire de la β-Gal.	50
Figure 14: Résumé des données de la littérature concernant les voies de signalisation	
induites par le complexe récepteur de l'élastine.	53
Figure 15: Représentation schématique des voies de signalisation médiées par les	
peptides d'élastine.	53
Figure 16: Organisation moléculaire des MMPs.	55
Figure 17: Localisation des sites éléments liant des facteurs de transcription	
dans les promoteurs des MMPs.	62
Figure 18 : Activation extracellulaire des MMPs sécrétées.	64
Figure 19: Processus d'activation de la proMMP-2.	66
Figure 20: Inhibiteurs des MMPs dans l'environnement péricellulaire.	70
Figure 21: Rôle des MMPs dans la progression tumorale.	73
Figure 22: Expression des MMPs et des TIMPs lors de l'invasion tumorale.	74
Figure 23: Deux voies de l'ARNi : par les siARN ou par les miARN.	86
Figure 24: Structure de l'enzyme Dicer.	87
Figure 25: Biosynthèse des miARN.	89
Figure 26: Mode d'activation du complexe RISC.	92
Figure 27: Comparaison des mécanismes d'action des siARN et des miARN.	93

<u>Figure 28:</u> Fonctionnement classique de la machinerie de l'ARN interférence.	94
Figure 29: Amplification des siARN grâce à RdRP. Deux différentes voies impliquées	
dans le phénomène d'ARNi.	95
Figure 30: Structure chimique de l'U0126.	100
Figure 31: Structure chimique du LY294002.	100
Figure 32: Structure chimique du H-89.	101
Figure 33: Structure chimique du KT-5720.	101
Figure 34: Structure chimique du F-3325.	102
Figure 35: Structure chimique du L-NIO.	102
Figure 36 : Structure chimique du DEA-NOate.	102
Figure 37: Structure chimique du 8 Br-cGMP.	103
Figure 38: Localisation des cibles sélectionnées choisies sur l'ADNc de la MT1-MMP	
humaine.	116
Figure 39: Schéma des différentes étapes de synthèse des siARN.	117
Figure 40: Principe du marquage des siARN (ou tout autre ARN) à la Cyanine 3.	119
Figure 41: Schéma d'une cassette codant pour un siARN.	121
Figure 42: Construction de la cassette siARN 107 (A) et du siARN dégénéré sc107	
correspondant (B).	121
Figure 43: Vecteur d'expression pRNA TIN H1.2/Neo (A).	122
Figure 43 (bis): Vecteur d'expression pRNA TIN H1.2/Neo (B).	123
Figure 44: Effet des PDE sur l'angiogenèse in vitro dans le modèle de CAM.	131
Figure 45: Effet des PDE sur la formation de capillaires dans un gel tridimensionnel	
de collagène de type I et de pseudotubes sur Matrigel.	132
Figure 46: Effet des PDE sur la migration des cellules HMECs.	133
Figure 47: Effet des PDE sur la survie des cellules endothéliales.	134
Figure 47 bis: Effet des PDE sur la survie des cellules endothéliales.	134
Figure 48: Effet de différents inhibiteurs du récepteur EBP sur la formation de	
pseudotubes induite par les PDE.	135
Figure 49: Effet des PDE sur l'expression de MT1-MMP.	136
Figure 50: Effet des PDE sur la libération de cytokines/facteurs de croissance/TIMPs.	138
Figure 51: Electrophorèse en gel de polyacrylamide des siARN 228 synthétisés en	
condition non dénaturante à 12% (p/v) avec BET.	142
<u>Figure 52:</u> Localisation intracellulaire du siARN 107 marqué à la Cyanine 3.	143
Figure 53: Cinétique d'extinction de l'expression de la MT1-MMP par le siARN 107.	144
Figure 53 bis: Quantification de la cinétique d'extinction de l'expression de la MT1-MMP	
par le siARN 107.	145

<u>Figure 54:</u> Effet des différents siARN synthétisés sur l'expression du gène de la MT1-MMP par RT-PCR.	146
<u>Figure 55:</u> Quantité totale de MT1-MMP présente après transfection avec le siARN 107 ou le ssiARN 107.	147
<u>Figure 56:</u> Effet du siARN 107 sur le marquage intracellulaire de la MT1-MMP par un anticorps couplé à la FITC.	148
Figure 57: Effet du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2 au niveau de la membrane cellulaire.	149
<u>Figure 58:</u> Conséquence de l'inhibition de l'expression de la MT1-MMP sur l'angiogenèse induite par les PDE.	150
<u>Figure 59:</u> Analyse par RT-PCR de l'effet du siARN 107 sur l'expression des MT-MMPs	
transmembranaires. <u>Figure 60:</u> Effet de la transfection du vecteur pRNATin Neo codant le siARN 107 ou	151
le ssiARN 107 sur l'expression et la synthèse de la MT1-MMP dans les cellules HT-1080.	152
Figure 61: Effet des PDE sur la synthèse de NO comparé au VEGF.	155
Figure 62: Effet du F-3325 sur la production de NO induits par les PDE.	156
Figure 63: Effet d'un inhibiteur de NO synthase sur la MT1-MMP induite par les PDE.	157
Figure 64: Effet du L-NIO, un inhibiteur de NO synthase, sur l'expression de la MT1-MMP	
induite par les PDE.	157
Figure 65: Effet de F-3325, un inhibiteur de NO synthase, sur l'activation de la proMMP-2	
induite par les PDE.	158
Figure 66: Effet d'un inhibiteur de NO synthase, le F-3325, sur la tubulogenèse.	159
Figure 67: Test d'activité de la PI ₃ Kinase après stimulation par les PDE.	160
Figure 68: Implication de la protéine Akt lors de la stimulation par les PDE.	161
Figure 69: Effet du LY294002 sur l'expression et la synthèse de la MT1-MMP induite par les	
PDE.	162
Figure 70: Confirmation de l'implication de la PI ₃ Kinase sur la production et l'activation de la	
MMP-2 induit par les PDE.	162
Figure 71: Effet d'un inhibiteur de PI ₃ Kinase, le LY294002, sur la tubulogenèse.	163
Figure 72: Effet du LY294002 sur la production de NO induit par les PDE.	164
Figure 73: Cinétique d'action des PDE sur la phosphorylation de Erk 1/2.	164
Figure 74: Implication de Erk 1/2 dans l'augmentation de la MT1-MMP induite par les PDE.	165
Figure 75: Effet des inhibiteurs de PKA (H-89 et KT-5720) et d'un inhibiteur de PI ₃ Kinase sur	
la phosphorylation de Erk 1/2 induite par les PDE.	166
Figure 76: Cinétique de phosphorylation de p38 après traitement par les PDE.	167

<u>Figure 77:</u> Effet du dominant négatif Akt sur l'activation d'Erk 1 induit par les PDE.	167
Figure 78: Effet d'un analogue du GMPc sur la synthèse de la MT1-MMP.	169
Figure 79: Effet d'un donneur de NO (DEA-NOate) sur l'expression et la synthèse de MT1-	
MMP.	170
Figure 80: Effet d'ODQ sur l'expression et la synthèse de la MT1-MMP induite par les PDE.	170
Figure 81: Influence du DEA-Noate sur la phosphorylation de Raf-1 (ser 338) et d'Erk1	
(Tyr 202).	171
Figure 82: Cinétique d'activation de Erk 1/2 par le DEA-NOate.	171
Figure 83: Schéma récapitulatif de la signalisation intracellulaire médiée par la fixation	
des peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les cellules HMECs.	172

Liste des Tableaux.

<u>Tableau I :</u> Médiateurs pro- et anti-angiogéniques.	22
<u>Tableau II:</u> Quelques types de collagènes ainsi que leurs propriétés.	36
<u>Tableau III:</u> Quelques exemples de séquences importantes de la tropoélastine.	44
<u>Tableau III:</u> Effets Biologiques de différents peptides issus de la séquence de la tropoélastine.	45
<u>Tableau IV:</u> Effets biologiques de différentes séquences de la tropoélastine.	48
<u>Tableau V</u> : Activités biologiques des peptides d'élastine.	48
<u>Tableau VI:</u> Liste des substrats matriciels et non matriciels des MMPs	71
<u>Tableau VI bis</u> : Liste des substrats matriciels et non matriciels des MMPs (suite)	72
<u>Tableau VII:</u> Exemples de miARN dont la fonction biologique et /ou les cibles ARNm	
sont caractérisées.	90
<u>Tableau VII:</u> Effets de différents inhibiteurs sur la tubulogenèse et la migration cellulaire.	137
<u>Tableau IX:</u> Concentrations finales de siARN obtenus après synthèse.	142
<u>Tableau X:</u> Implication du récepteur S-Gal dans les effets des PDE dans la libération de NO.	155
Tableau XI: Influence des PDE sur la production de GMPc.	168

INTRODUCTION

I. La progression tumorale.

I.1. Généralités

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

La plupart des tumeurs chez l'homme persistent insitu pendant une longue période (quelques mois à quelques années) dans un état quiescent avascularisé. En général, le développement de la tumeur est stoppé dès que celle-ci atteint une taille critique d'environ 1-2 mm³ en raison d'un manque d'apport en élément nutritifs. Par exemple, les mélanomes de moins de 0,76 mm d'épaisseur ne métastasent pratiquement jamais. Ils restent dans l'épiderme en dehors de la membrane basale, à distance du derme bien vascularisé. Les mélanomes dont l'épaisseur augmente sont associés à une néovascularisation au niveau du derme, avec souvent des images de cellules tumorales entourant les néo-vaisseaux capillaires. Ils ont alors acquis un pouvoir métastatique important. Une observation analogue peut être faite au niveau des cancers insitu du col utérin qui évoluent vers des cancers micro invasifs, non métastasiques jusqu'environ 3 mm d'épaisseur. Ainsi, les cellules cancéreuses ont un pouvoir de micro-invasion locale indépendant de leur pouvoir angiogène.

Pendant la phase avasculaire, la croissance tumorale est faible, le temps de doublement est très long. Cependant, l'index de marquage à la thymidine peut être aussi élevé que dans les tumeurs vascularisées. Il existe un état d'équilibre entre une production accrue et une perte cellulaire accrue, essentiellement par apoptose. La détection des cancers avasculaires est difficile, sauf sur une surface d'observation facile comme la peau, la rétine, la

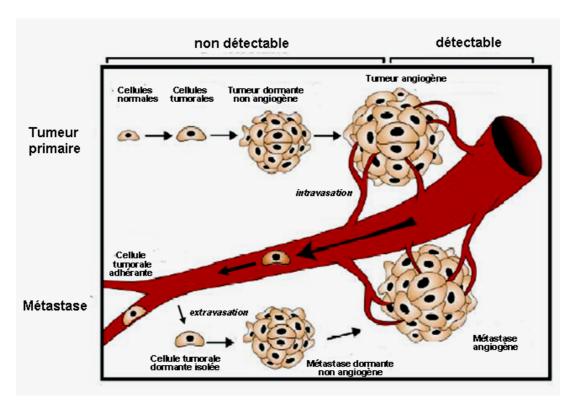
cavité buccale, le col de l'utérus, la vessie. Ces lésions sont planes ou exubérantes, fines, à croissance apparemment lente, et ne donnent pratiquement jamais de métastases.

Les tumeurs (primitives ou métastatiques), qui ont acquis un phénotype angiogénique, peuvent croître, envahir localement et métastaser, c'est la phase d'invasion tumorale. La néo-vascularisation joue un rôle prépondérant au cours de cette phase car elle permet les échanges de nutriments, d'oxygène, mais aussi l'évacuation des déchets cellulaires. On décrira plus loin les facteurs angiogéniques impliqués dans la stimulation de l'angiogenèse. A ce stade, il existe des régulations croisées entre les cellules tumorales et les cellules hôtes. L'hypoxie relative, qui existe près du centre de la tumeur en raison de la compression par la masse cellulaire, entraine la sécrétion par les cellules tumorales de facteurs de croissance comme le facteur de perméabilité vasculaire, appelé VEGF/VPF lequel va exercer un puissant effet angiogène sur les cellules endothéliales. En retour, les cellules endothéliales, qui sous l'action des facteurs de croissance se multiplient, fabriquent des facteurs tels que le facteur de croissance basique fibroblastique (FGFb), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance proche de l'insuline de type 1 (IGF-1), des cytokines comme les interleukines IL-1, IL-6, IL-8, et le facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages ou GM-CSF. Tous ces facteurs favorisent, à des degrés divers, selon le type cellulaire, la croissance des cellules tumorales in vitro. Ils ont probablement un rôle in vivo. Les cellules tumorales croissent préférentiellement le long des travées endothéliales. Il en résulte un processus paracrine de stimulation réciproque des cellules endothéliales et cancéreuses. Les cellules hôtes et notemment les macrophages particpent également à ces paracrines. Cette stimulation augmente la fuite des cellules tumorales vers la circulation sanguine, mais également vers le système lymphatique (hyperpression).

Au sein du foyer tumoral primaire, il arrive que certaines cellules se dissocient du massif primitif. Une fois dispersées, ces cellules acquièrent des propriétés de migration et de dégradation. Elles sécrètent certaines protéinases et notamment des métalloprotéinases matricielles ou MMPs. Ces MMPs ont la capacité de dégrader la majorité des éléments de la matrice extracellulaire et à ce titre permettent à une cellule ou à un groupe de cellules de progresser au sein de la matrice extracellulaire environnante ou stroma interstitiel. Certaines de ces cellules tumorales atteignent des vaisseaux sanguins ou lymphatiques et peuvent former des métastases à distance.

La formation de métastases dans des organes cibles est l'étape ultime de la progression tumorale. Au niveau clinique, c'est aussi une étape critique quant au pronostic de la pathologie cancéreuse. Certaines cellules tumorales pénètrent les vaisseaux par intravasation pour être transportées de manière passive par le système circulatoire vers

d'autres organes. Là, une grande majorité des cellules tumorales est éliminée par le système immunitaire et une minorité seulement y échappe. Parmi elles, certaines sont stoppées dans des vaisseaux de petites tailles. Là, par extravasation, elles traversent une nouvelle fois l'endothélium vasculaire pour former à terme un nouveau foyer tumoral appelé métastase dans leur nouvel environnement tissulaire. L'ensemble des phases de la progression tumorale est rapportée sur la figure 1.



<u>Figure 1:</u> Les différentes étapes de la progression tumorale. I. Phase d'initiation. II. Phase de promotion tumorale: Les cellules tumorales proliférent de manière anarchique et forment une tumeur primaire avascularisée dite *in situ* (état de dormance). III. Invasion tumorale: acquisition du pouvoir angiogène de la tumeur entrainant sa vascularisation. A ce stade, des cellules quittent la tumeur primaire, franchissent la lame basale en la dégradant et infiltrent les tissus sous-jacents. Ces cellules invasives peuvent pénétrer des vaisseaux sanguins par intravasation et envahir l'organisme par le sang. IV. Formation de métastases: des cellules tumorales circulantes quittent la circulation sanguine par extravasation et génèrent des tumeurs secondaires dans des organes cibles selon un schéma identique à celui de la tumeur primaire. L'état de dormance existe aussi pour certaines cellules métastatiques.

I. 2. L'angiogenèse.

I.2.1. Généralités.

Nous avons vu que la progression tumorale, du site primaire au site secondaire, est constituée d'une cascade d'évènements qui dépend du potentiel prolifératif des cellules tumorales et de leur capacité à envahir les tissus adjacents. Dans ce processus, la néovascularisation ou néo-angiogenèse joue un rôle prépondérant non seulement pour la croissance tumorale mais aussi pour l'intravasation des cellules tumorales et la colonisation

des tissus à distance (métastases). L'angiogenèse implique la formation de capillaires à partir de micro-vaisseaux préexistant. C'est un processus morphogénétique conduisant au remodelage et à la maturation des vaisseaux. L'angiogenèse doit être différenciée de la vasculogénèse qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir de cellules souches appelées angioblastes issues de la moelle. On considère cependant qu'une partie de la néoangiogenèse est liée à la différenciation de cellules souches circulantes ou mésenchymateuses en cellules endothéliales. L'angiogenèse joue un rôle dans une multitude de processus physiologiques ou pathologiques comme le développement embryonnaire, le cycle menstruel, l'arthrite rhumatoïde, l'artérosclérose, et la croissance tumorale et métastasique.

I.2.1.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires

L'initiation de la réponse angiogénique connu sous le nom de « switch » angiogénique est sous le contrôle d'un équilibre dynamique entre les facteurs proangiogéniques (endogènes ou exogènes) et anti-angiogéniques qui agissent dans l'environnement immédiat des cellules endothéliales. La rupture de cet équilibre peut favoriser la formation de nouveaux vaisseaux ou mener à la stagnation voire même la régression de ces derniers (Hanahan et Folkman, 1996). Des études *in vitro* et *in vivo* ont identifié plusieurs classes de molécules impliquées lors des différentes étapes de l'angiogenèse notamment les facteurs de croissance, les cytokines, les intégrines ($\alpha_V \beta_3$, $\alpha_V \beta_5$, $\alpha_5 \beta_1$...), les protéinases (MMPs, ADAMTS, cathepsines...), le système urokinase/plasminogène, les inhibiteurs de MMPs et de la plasmine, les composés de la MEC mais aussi les protéines d'adhésion intercellulaire (VCAM, PCAM, ICAM-1 et-2).

Au cours des vingt dernières années nous avons assisté à l'émergence du concept de matrikines, qui sont des fragments ou des domaines de macromolécules générés par protéolyse partielle de la MEC et doués d'activités biologiques, ainsi qu'à celui de matricryptines, qui sont des fragments cryptiques « dissimulés » au sein de macromolécules et dont l'activité est révélée par changements conformationnels. Nombre de ces fragments issus de la protéolyse ont été identifiés comme modulateurs de l'angiogénèse au sein des tumeurs, parmi ceux-ci il y a l'angiostatine et le kringle 5 (fragments protéolytiques du plasminogène) (O'Reilly et coll 1994), l'endostatine et la restine (fragments protéolytiques issus du collagène de type XVIII et XV, respectivement) (Ramchandran et coll., 1999), un fragment de 16 kDa issu de l'extrémité N-terminale de la prolactine (Clapp et coll., 1993), la vasostatine provenant de la calréticuline, la kinostatine (fragments de haut poids moléculaire du domaine 5 du kinogène) (Pike et coll., 1998), le domaine PEX de la MMP-2, plusieurs domaines non collagénique provenant du collagène de type IV (Brooks et coll., 1998), l'anastéline (première

répétition de type III de la fibronectine) (Yi et Ruoslahti, 2001), l'endorepelline (extrémité Carboxy terminal du perlécanne) (Mongiat et coll., 2003). Plus récemment, il a été démontré que des fragments de l'élastine jouaient un rôle important dans l'angiogénèse et l'invasion tumorale.

Les médiateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse sont rapportés dans le tableau I.

Molécules Pro-angiogéniques	Molécules Anti-angiogéniques	
Facteurs de croissance/cytokines	Facteurs de croissance/cytokines	
Vascular endothelial growth factor (VEGFA, VEGFB-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E)	Angiopoïétine-2 (en absence de VEGF)	
Placental growth factor (PIGF)	Platelet factor-4	
Fibroblasts growth factor (FGF-1, FGF-2, FGF-4)	Interleukine-12	
Angiopoïétine-1 (Ang-1)	Interféron α , β , γ (IFN α , β , γ)	
Angiopoïétine-2 (Ang-2) (en synergie avec VEGF)	7.7.	
Hepatocyte growth factor (HGF)	Pigment epithelial derived factors (PEDF)	
Platelet derived growth factor (PDGF)		
Transforming growth factor-α, β (TGF-α, β)	Inhibiteurs de protéases	
Insulin growth factor-1 (IGF-1)	Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP1-4)	
Tumor necrosis factor-α (TNF-α)	PAI-1 (faible concentration)	
Interleukine-8	Domaine hémopexine de la MMP-2	
Chimiokines de type CXC	Maspine	
	Protéine 10 inductible par l'interféron (IP-10)	
Ephrines et éphrines récepteurs		
	Protéines de la MEC et matrikines	
Enzymes et inhibiteurs	Thrombospondines-1, -2	
MMPs (e.g. MMP-2, MMP-9, MT1-MMP)	Vastatine dérivé du collagène VIII	
Aminopeptidase (CD13/aminopeptidase N (APN)	Arrestène (domaine NC1 chaîne α1(IV))	
Activateur du plasminogène de type urokinase	Canstatine (domaine NC1 chaîne α2(IV))	
Thymidine phosphorylase	Tumstatine (domaine NC1 chaîne α3(IV))	
PAI-1 (forte concentration)	Domaine NC1 de la chaîne a6(IV)	
	Endorepelline (domaine c-terminal du perlécanne)	
Hormones et autres	Anastelline (1 ^{ère} répétition de type III de la fibronectine)	
Kallikréine	SPARC et peptides dérivés	
Facteur XIII	Endostatine (domaine NC1 collagène XVIII)	
Angiogénine	Restine (domaine NC1 collagène XV)	
Intégrines		
Facteur tissulaire (TF)	Autres matrikines	
Inhibiteur de fixation 1, 3 de l'ADN (ID1, ID3)	Angiostatine et kringle 5 dérivés du plasminogène	
Autres molécules	Fragment de 16 Kda de la prolactine	
Monoxyde d'azote (NO)	Fragment dérivé de l'antithrombine	
Peroxyde d'hydrogène	Vasostatine (dérivé de la calréticuline)	
Monoxyde de carbone	Kininostatine (dérivé du domaine 5 du kininogène)	
Prostaglandines		

Tableau I: Médiateurs pro- et anti-angiogéniques.

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est un processus complexe multifactoriel qui se déroule en plusieurs étapes lesquelles sont régulées temporellement :

1- Stimulation des cellules endothéliales par des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, FGF-2 et angiopoïétine-1 (Thomas, 1996). Cette stimulation induit la production de NO et la

vasodilatation des vaisseaux ainsi que le détachement des péricytes (cellules pluripotentes d'origine mésenchymateuse) (Doberty et Canfield, 1999).

- 2- Protéolyse de la membrane basale due à la sécrétion et à l'activation des métalloprotéinases (MMPs) et d'autres protéinases en réponse à des signaux exogènes comme les cytokines, les facteurs de croissance et les interactions cellules-matrice (Kalebic et coll., 1983).
- 3- Prolifération et migration des cellules endothéliales à travers la matrice extracellulaire (MEC) et sous l'influence de facteurs de croissance, des MMPs et des intégrines (Cornelius et coll., 1995).
- 4- Formation et maturation de nouveaux capillaires impliquant la différenciation de cellules musculaires lisses et de péricytes.
- 5- Remodelage du « lit » vasculaire (c'est-à-dire la lame basale et la matrice extracellulaire) autour du nouveau vaisseau sanguin.

Ces différentes étapes sont schématisées sur la figure 2.

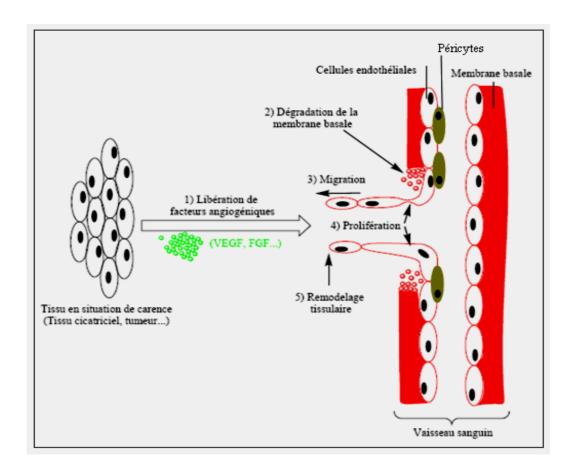


Figure 2: Représentation schématique des différentes étapes de l'angiogenèse.

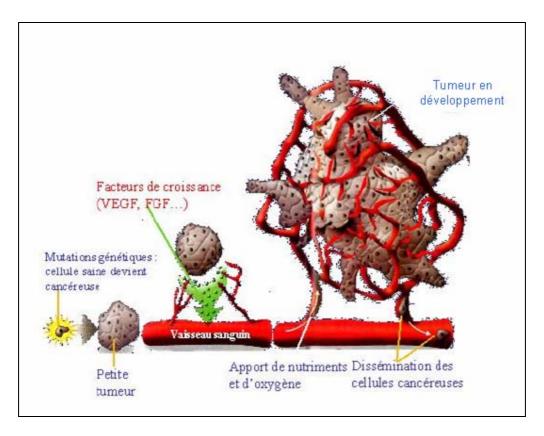
Dans la plupart des processus angiogéniques, et notamment en réponse à une ischémie, des processus inflammatoires précèdent l'apparition de néo-vaisseaux. Les macrophages recrutés et activés dans ces territoires sont probablement à l'origine de la production de

cytokines pro-inflammatoires qui activent les MMPs. Les lymphocytes T participent également à la réponse angiogénique d'un tissu inflammatoire et/ou ischémique (Mach et coll., 1999) ; ils sécrètent du VEGF qui peut lui-même activer l'expression de MMPs par les cellules endothéliales (Unemori et coll., 1992). De plus, la molécule d'adhésion CD 154 (ligand de CD 40), un médiateur central de la réponse induit par les lymphocytes de type T-helper, augmente directement la production de MMPs par les macrophages, les cellules musculaires lisses et l'endothélium (Libby et coll., 2001).

I.2.2. Angiogenèse tumorale.

Lors des toutes premières phases de développement, une tumeur (foyer primitif ou métastases) est sans connexion avec le système vasculaire préexistant dans le tissu. La simple diffusion passive de l'oxygène et des nutriments ne pouvant assurer une croissance tumorale au-delà de quelques mm³. Il existe un équilibre entre les cellules en prolifération et en apoptose, on parle de phénomène de dormance pour ce genre de tumeurs. La connexion vasculaire s'avère assez rapidement indispensable. Cette connexion implique une néoangiogenèse qui résulte d'effets complexes produits par des facteurs de croissance proangiogéniques et des inhibiteurs (Figure 3). Dans un certain nombre de tumeurs, les effecteurs positifs angiogéniques peuvent être des produits d'oncogènes et les effecteurs négatifs des produits de gènes suppresseurs des cancers. Les multiples mutations survenant lors de la tumorigenèse entraînent les changements génétiques responsables de l'activation d'oncogènes et de l'inhibition de suppresseurs et induisent le « switch » angiogénique. De plus, cette complexité s'accroît si l'on prend en compte le microenvironnement tissulaire qui fait intervenir les interactions cellulaires avec la MEC environnante ainsi que les progéniteurs circulants des cellules vasculaires. Plusieurs mécanismes peuvent rendre compte d'une néoangiogenèse tumorale. C'est Folkman qui évoqua pour la première fois la possibilité que les cellules tumorales pourraient sécréter des facteurs de croissance proangiogéniques (comme FGFb ou VEGF) agissant sur les cellules endothéliales des vaisseaux situés à proximité de la tumeur et favorisant ainsi le bourgeonnement de néovaisseaux. À côté des nombreuses cytokines proangiogéniques que les tumeurs peuvent exprimer, il faut également prendre en compte la diminution d'expression de molécules antiangiogéniques. Un autre mécanisme consécutif à l'hypoxie existant au centre d'une tumeur due à la compression par les cellules tumorales environnantes pourrait induire une expression accrue de VEGF dont les gènes sont régulés par un facteur sensible à l'hypoxie, l'Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF 1α). Cette hyperexpression de VEGF par les cellules endothéliales aurait pour conséquence une prolifération autocrine ou paracrine des vaisseaux.

25



<u>Figure 3:</u> La vascularisation d'une tumeur est une étape essentielle à son développement.

Plus récemment, il a été démontré que des progéniteurs sanguins de cellules endothéliales existaient dans la circulation chez l'adulte. Ces progéniteurs peuvent cibler, d'une part, un site de néoangiogenèse post ischémique et contribuer à la réparation tissulaire en rétablissant le système vasculaire, et d'autre part, un site de néoangiogenèse tumorale et participer ainsi à la vascularisation d'une tumeur. On ne connaît pas encore les mécanismes qui régulent la libération de ces cellules d'origine hématopoïétique ni les signaux qui permettent de cibler ces cellules au site angiogènique, ni même enfin l'importance de ce phénomène dans le cancer chez l'homme. Un dernier phénomène, décrit depuis 1999, souligne la complexité de la vascularisation d'une tumeur. Dans certains cancers, notamment très agressifs, les vaisseaux intra-tumoraux peuvent être constitués par des cellules tumorales qui vont s'organiser pour former un réseau vasculaire. En d'autres termes, par transdifférenciation, les cellules cancéreuses miment les cellules endothéliales jusqu'à former des vaisseaux fonctionnels. Ce phénomène a d'ailleurs été appelé « vasculogenic mimicry » (ou vasculo mimétisme) (Ribatti et coll., 2003). Le néovaisseau ainsi formé peut être totalement bordé par ces cellules tumorales différenciées en cellules endothéliales ou être une mosaïque de ces cellules transdifférenciées et de cellules endothéliales normales.

Les différentes étapes de l'angiogenèse tumorale peuvent être résumées de la manière suivante (Figure 4) :

- -A- Tumeur primaire avasularisé à l'état de dormance. Cette dernière est alors dite bénigne.
- -B- Sous l'influence de facteurs proangiogénique l'endothélium subit une vasodilatation, suivie du détachement puis de la migration des péricytes au sein de la tumeur.
- -C- Les cellules endothéliales prolifèrent à la base du bourgeonnement et migrent au front : c'est le bourgeonement angiogénique.
- -D- Les cellules s'organisent en tubules, elles reconstituent leur membrane basale afin de former un nouveau vaisseau qui sera stabilisé par l'attachement de péricytes.
- -E- Formation de vaisseaux tumoraux fonctionnels permettant l'irrigation de la tumeur en élements nutrtifs.

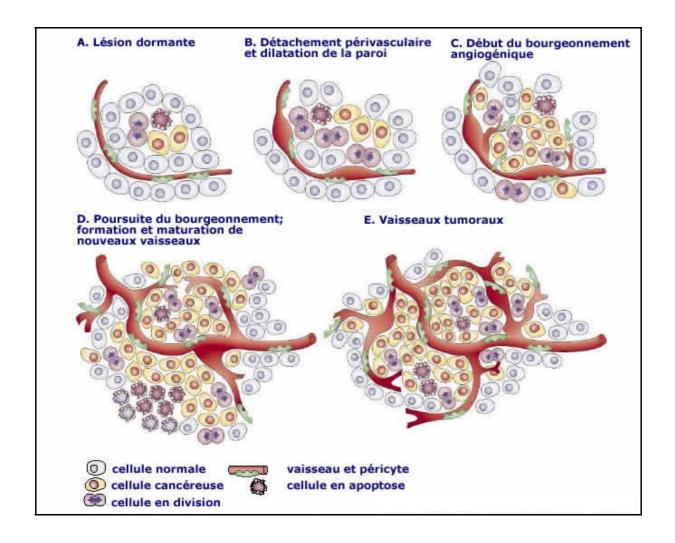
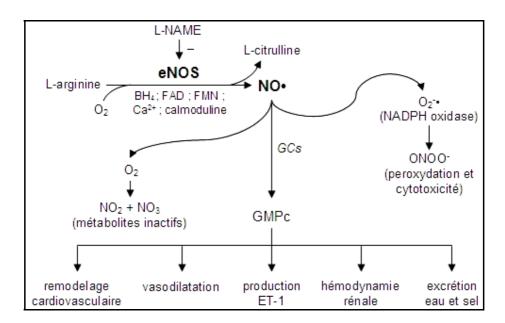


Figure 4: Les principales étapes de l'angiogenèse tumorale. (D'après Bergers et Benjamin, 2003)

I.2.3. Rôle du monoxyde d'azote (NO) dans l'angiogenèse.

I.2.3.1. Généralités.

Furchgott et Zawadski ont démontré en 1980 que la relaxation artérielle induite par l'acétylcholine nécessitait un endothélium intact lequel produisait une substance pouvant diffuser et agir sur les cellules musculaires lisses (Furchgott et Zawadski, 1980). Cette substance fut nommée Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF) jusqu'à ce que Palmer et son équipe la caractérisent et découvrent en 1987 qu'il s'agissait du NO (Palmer et coll., 1987). Le NO ayant suscité beaucoup d'intérêt au cours des années qui suivirent, sa découverte fut récompensée par l'attribution du Prix Nobel de médecine en 1998 à R.F. Furchgott, L.J. Ignarro et F. Murad. Cette molécule gazeuse hydro et liposoluble peut agir à l'intérieur comme à l'extérieur des cellules et possède un large spectre d'actions physiologiques (Figure 5), tant au niveau rénal que cardiovasculaire, pulmonaire et gastrointestinal. En outre, parce que le NO est un puissant vasodilatateur endogène, la baisse de sa biodisponibilité pourrait être en partie responsable de l'élévation des résistances périphériques.



<u>Figure 5:</u> Métabolisme du monoxyde d'azote. Synthèse, dégradation et actions physiologiques du monoxyde d'azote. (BH₄) tétrahydrobioptérine, (FAD) flavine adénine dinucléotide, (FMN) flavine mononucléotide, (GCs) guanylate cyclase soluble, (ONOO peroxynitrite, (L-NAME) analogue synthétique de la L-arginine inhibant eNOS.

I.2.3.2. Biosynthèse et mode d'action du NO.

Le NO est un composé diatomique labile possédant une action paracrine et autocrine. En milieu biologique, sa demi-vie est estimée entre 1 et 5 secondes voire 30 secondes étant donné qu'il peut réagir avec le fer des noyaux héminiques, avec les dérivés de l'oxygène ainsi qu'avec les groupements thiols. Ainsi, le NO est rapidement inactivé par les ions superoxydes ou transformé en métabolites inactifs, les nitrites (NO₂-) et les nitrates (NO₃-) en contact avec l'oxygène. La liaison du NO aux composés possèdant des groupements thiols conduit à la formation de S-nitrosothiol ce qui constituerait un évenement important pour l'activité et le transport du NO. Ces composés peuvent subséquemment agir comme donneurs de NO et ainsi augmenter substantiellement sa demi-vie. Le NO est produit par l'enzyme nitric oxide synthase (NOS) dont il existe trois isoformes : deux sont constitutives soit la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS) alors que la troisième est inductible (iNOS). Toutes ces isoformes utilisent l'acide aminé L-arginine, l'oxygène et le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) comme substrats pour aboutir à la formation de NO et de L-citrulline. La tétrahydrobioptérine (BH₄), la calmoduline/Ca²⁺, le FAD (Flavine-Adénine Dinucléotide) et le FMN (Flavine Mononucléotide) sont des cofacteurs nécessaires au processus catalytique. Au niveau cellulaire, le NO se lie à une guanylate cyclase soluble (GCs) intracellulaire (l'unique cible connue du NO). La GCs est une enzyme hétérodimérique constituée d'une sous-unité α de 73 à 88 kDa et d'une sous-unité β de 70 kDa. La sous-unité β comprend un hème de type b. Le fer associé à l'hème forme un lien de coordination avec l'histidine proximale 105. Ce lien proximal est le plus faible connu chez les protéines hémiques à ce jour. Lorsque le NO se fixe à la GCs, il y a formation d'un complexe 5C-NO en raison de la rupture du lien proximal (Ballou et al. 2002). Le modèle d'activation de la GCs par le NO est complexe et montre que la conversion de la forme 6C-NO en 5C-NO est catalysée par une seconde molécule de NO (Zhao et al. 1999). Lorsque de l'imidazole est ajouté à la forme 5C-NO, la forme 6C-NO est obtenue (Zhao et al. 1998). Le réarangement conformationel de la protéine qui fait suite à la rupture du lien proximal lors de la fixation du NO est responsable de l'augmentation de près de 400 fois de l'activité de la GCs. La GCs catalyse la conversion du 5'-guanoside-triphosphate (GTP) en GMPc, un second messager intracellulaire du NO. De plus, étant donné que la GCs ne fixe pas l'oxygène de façon stable, elle peut faire la différence entre O2 et NO dans l'organisme (Stone et al. 1994). Ce modèle d'activation est présenté au niveau de la figure 6.

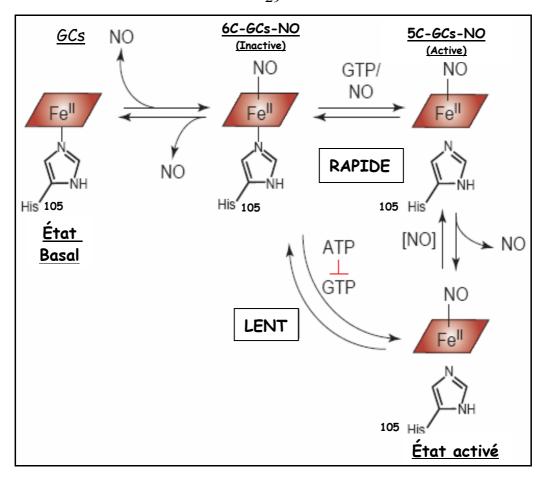


Figure 6: Modèle d'activation de la GCs par le NO. (D'après Cary et coll., 2006)

Endothelial nitric oxide synthase : eNOS aussi appelée NOS III dont le gène est présent sur le chromosome 7 est ancrée à la membrane plasmique des cellules endothéliales des vaisseaux de gros et de moyen calibres, des myocytes cardiaques et des plaquettes. eNOS est présente dans la paroi des vaisseaux corticaux et médullaires de tous les segments du rein ainsi que dans les cellules endothéliales glomérulaires (Dussaule et coll., 1996) avec une prééminence au niveau de la macula densa et du tubule collecteur (Gabbai et coll., 1995). Il a été établi par ailleurs que les cellules endothéliales mésentériques n'exprimaient pas eNOS bien qu'elles puissent générer du NO via iNOS suite à une stimulation par des cytokines (Papapetropoulos et coll., 2001). eNOS est exprimée de façon constitutive, son activité dépend du calcium intracellulaire et de la calmoduline (Brenner et coll., 2004). Elle peut être inhibée de façon compétitive par des analogues synthétiques de la L-arginine dont le N^G-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) ou le N^G-monomethyl-L-arginine (LMMA) (Ricciardolo et coll., 2004). Il existe également des inhibiteurs endogènes d'eNOS. De nombreux stimuli physiques et humoraux augmentent la synthèse de NO par eNOS avec pour voie d'activation commune l'élévation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. L'augmentation de la tension des fibres musculaires exercée par la pression sanguine est l'un des principaux facteurs régulant la synthèse de NO à chaque instant afin de maintenir un tonus basal adéquat (Ricciardolo et coll., 2004).

Inducible nitric oxide synthase: iNOS ou NOS II, dont le gène est présent sur le chromosome 17, est exprimée dans divers types cellulaires dont les macrophages et les granulocytes et son activité serait indépendante du calcium cytoplasmique. L'exposition *in vitro* et *in vivo* de cellules musculaires lisses à certains médiateurs impliqués lors de l'inflammation dont l'IL-1 et le TNF-α, aux endotoxines microbiennes ou aux lipopolysaccharides provoque une induction d'iNOS. Une fois induite, iNOS demeure active pendant des périodes de 4 à 24 heures, produisant près de 100 fois plus de NO que les NOS constitutives (Schroeder et coll., 1995).

Neuronal nitric oxide synthase : nNOS ou NOS I, dont le gène est présent sur le chromosome 12, possède une localisation cytosolique et se retrouve dans certains neurones centraux et périphériques. nNOS est exprimé en réponse à une stimulation nerveuse. Elle est présente dans toutes les zones du cerveau, mais particulièrement dans le cervelet, l'hippocampe et la zone olfactive (Vallance, 2003). Dans le rein, nNOS est localisé dans les cellules de la *macula densa* et des tubules (Dussaule et coll., 1996). Finalement, elle est également retrouvée au niveau du corps caverneux de la verge chez l'homme.

Mode d'action: La plupart des actions cellulaires du NO impliquent l'activation de la guanylate cyclase soluble retrouvée dans le cytosol. Cette enzyme catalyse la formation de GMPc à partir de GTP. L'augmentation de GMPc active une protéine kinase G qui provoque la phosphorylation de protéines impliquées dans les processus de relaxation musculaire, de prolifération cellulaire, d'agrégation plaquettaire et d'expression de molécules d'adhésion (Schlossmann et coll., 2003).

I.2.3.3. Mécanismes de régulation.

La libération du monoxyde d'azote par l'endothélium est stimulée entre autres par l'Angiotensine II (AngII) (récepteur AT₂), l'ET-1 (récepteur ET_B), l'estradiol (Shaul, 2002), la sérotonine (récepteur 5-HT_{1D}), la bradykinine (récepteur B₂) (Agata et coll., 2000 ; Shaul, 2002), l'histamine, la thrombine, les catécholamines, les peptides natriurétiques (Brunner et coll., 2001) et la vasopressine. Ces derniers vont conduire à l'augmentation du taux de calcium libre intracellulaire, activant ainsi eNOS (Govers et coll., 2001 ; Shaul, 2002). Au contraire, l'activation d'eNOS par les forces d'étirement et de cisaillement subit par l'endothélium survient indépendamment de la variation du calcium intracellulaire (Shaul,

2002). D'un autre côté, certains facteurs sont aussi connus pour inhiber l'expression d'eNOS dont le TNF-α, l'EPO, l'hypoxie et une concentration élevée de LDL oxydés (Govers et coll, 2001). Concernant le lien entre le NO et les bradykinines, Agata et collaborateurs ont décrit une augmentation de ce premier dans les carotides de rats ayant reçu un adénovirus exprimant la kallikréine dont la fonction la mieux caractérisée est de cliver le kininogène de faible masse moléculaire en kinines (Murakami et coll., 1999). Cette surproduction de NO était totalement renversée par l'administration d'un inhibiteur du récepteur des bradykinines (Agata et coll., 2000) démontrant le lien existant entre la bradykinine et le système endogène vasodilatateur.

I.2.3.4. Rôles physiologiques du monoxyde d'azote.

Dans la paroi vasculaire, le NO diffuse de l'endothélium du côté luminal et adluminal vers la cellule musculaire lisse en traversant librement les membranes cellulaires. Ses actions cardiovasculaires sont nombreuses. Au niveau de la cellule endothéliale, il inhibe la production d'ET-1, l'oxydation des LDL, l'expression de molécules d'adhésion et par conséquent, l'adhésion des plaquettes et des leucocytes (Ricciardolo et coll., 2004). Il favorise la relaxation des fibres musculaires lisses des vaisseaux, du cœur, du système digestif, du tractus génito-urinaire, des voies respiratoires et de l'utérus. Il inhibe également l'agrégation plaquettaire et empêche la prolifération des cellules du muscle lisse et module la perméabilité vasculaire de même que les mécanismes inflammatoires (Boulanger, 1999; Kurowska, 2002; Shaul, 2002; Shaul, 2003). Dans le rein, l'inhibition des NOS induit une contraction des cellules mésangiales et augmente à la fois la fraction de filtration et l'excrétion urinaire du sodium (Gabbai et coll., 1995). En corollaire, le NO antagonise la constriction induite par l'angiotensine II et assure donc en permanence un tonus basal vasodilatateur préférentiellement sur l'artériole afférente, lui conférant un rôle important dans la filtration glomérulaire (Dussaule et coll., 1996). Plusieurs études rapportent que le NO stimulerait la sécrétion de rénine par la macula densa en réponse à une déplétion en sodium ou à l'administration de furosémide (un agent hypotenseur), d'où une implication dans le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire (Sayago et coll., 2001). Au niveau du cerveau, le NO produit localement agit comme neurotransmetteur et neuromodulateur pouvant contribuer à l'autorégulation du flux sanguin et à la prévention de vasospasmes cérébraux (Ricciardolo et coll., 2004). Il a également été associé au processus épileptique, au comportement alimentaire et à la mémoire (Vallance, 2003). Au niveau gastro-intestinal, il agirait dans le plexus mésentérique comme un neurotransmetteur pour réguler la relaxation des fibres musculaires lisses de l'intestin, nécessaire au péristaltisme. Son déficit pourrait être impliqué dans des pathologies neuromusculaires comme la maladie de Hirschprung, l'achalasie et l'œsophage «casse-noisette» (trouble moteur de l'œsophage) (Schroeder et coll., 1995). Finalement, le NO participe au processus d'érection pénienne, de dilatation bronchique et a récemment été impliqué dans la perception de la douleur (Vallance, 2003). L'augmentation des peroxynitrites (ONOO⁻) et l'implication du NO dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson reste à confirmer.

On confère au NO de nombreuses fonctions en commençant par un puissant effet vasodilatateur. Sur ce point, le tonus vasculaire musculaire lisse dépendant du NO fait intervenir de nombreuses voies métaboliques : (1) ouverture de canaux potassiques ATPdépendant conduisant à l'hyperpolarisation cellulaire ; (2) diminution du Ca²⁺ intracellulaire via l'inhibition de canaux calciques associée à une réduction de la libération du Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique; (3) inhibition de la phospholipase C; (4) phosphorylation de protéines accélérant la relaxation et inhibition de la kinase Rho (Sauzeau et coll., 2000). En plus de ces actions directes sur les cellules, il a été démontré que le NO favorisait la vasorelaxation indirectement (1) en diminuant la dégradation de l'adénosine monophosphate (AMP) via l'inhibition de la phosphodiestérase II, (2) en inhibant la production d'ET-1 ainsi que la synthèse de rénine – et par conséquent d'AngII – et (3) en neutralisant les anions superoxydes O₂ ou d'autres espèces réactives de l'oxygène (ROS). Par ailleurs, il est impliqué dans les mécanismes anti-thrombotiques donc de protection vasculaire et possède un rôle de neurotransmetteur en plus d'agir sur le système immunitaire. Dans le diabète, le manque de NO est associé aux dommages vasculaires inflammatoires, athérosclérotiques et prothrombotiques qui augmentent le risque d'infarctus du myocarde (Endemann, et coll., 2004). De surcroît, le NO a été associé au métabolisme des lipoprotéines de faible densité (LDL) et Kurowska (Kurowska, 2002) fait mention d'une relation inversement proportionnelle entre la concentration plasmatique des métabolites du NO et le niveau de LDL cholestérol plasmatique total. Plusieurs modèles ont été utilisés pour approfondir l'impact physiopathologique du NO dans l'organisme. Des souris rendues déficientes pour eNOS par génie génétique présentent une hypertension suggérant que l'organisme ne peut compenser cette délétion par d'autres mécanismes régulateurs de la pression sanguine et du tonus vasculaire. L'inhibition de eNOS par le L-NAME se traduit chez les animaux sains par une vasoconstriction et une hypertension dose-dépendante sans hypertrophie cardiaque et s'accompagne d'une synthèse accrue d'ET-1 dans le plasma et l'aorte thoracique (D'Amours, et coll., 1999; Gaballa et coll., 2000). L'utilisation d'un bloqueur du récepteur ET_A peut réverser les effets du L-NAME (Alonso et coll., 2003). Par ailleurs, chez l'animal spontanément hypertendu (SHR), l'administration d'un plasmide contenant l'ADNc humain codant eNOS provoque une baisse de pression artérielle significative pendant 5 à 6 semaines (Lin et coll., 1997).

Un nombre important de facteurs pro-angiogénique favorise l'expression d'eNOS stimulant ainsi la production de NO. Le VEGF favorise l'expression de eNOS, et stimule la biosynthèse du NO dans les cellules humaines de veines ombilicales (HUVECs) (Hood et coll., 1998). Les mêmes phénomènes ont été observés dans les segments vasculaires de l'aorte thoracique de lapin, où le VEGF stimule la synthèse de NO. Dans ce modèle, la préincubation de L-arginine augmente la libération du NO d'un facteur 2. De la même manière, lorsque que le TGF-ß ou le FGFb sont utilisés comme stimuli proangiogénique, les cellules endothéliales sécrètent du NO (Tiefenbacher et Chilian, 1997). La libération de NO induite par des facteurs pro angiogéniques semble jouer un rôle central dans les effets de ces derniers. Les cellules HUVECs cultivées dans un gel à 3D (3 dimensions) libèrent du NO et sont capables de former des structures en pseudotubes lorsqu'elles sont stimulées par FGFb ou le VEGF. La formation de ces pseudotubes par ces facteurs de croissance est abolie par l'utilisation d'antagoniste de NOS, comme le L-NAME. De la même façon, l'inhibition de NOS annihile les effets in vitro pro angiogénique de la substance P ou du TGF-\(\beta\). Dans le modèle d'angiogénèse de corné de lapin, les effets pro angiogénique du VEGF sont bloqués par le L-NAME (Ziche et coll., 1997a). Le NO est aussi un facteur de survie endothéliale, inhibant l'apoptose, et favorisant la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur migration. Cette capacité du NO à favoriser la migration des cellules endothéliales serait due au processus de « podokinesis » (Noiri et coll., 1998). En outre, le NO augmente les interactions cellules endothéliales-matrice via l'induction de l'expression de l'intégrine $\alpha_v \beta 3$ et/ou en augmentant la dégradation de la matrice extracellulaire par l'activateur du plasminogène de type urokinase via l'augmentation de la synthèse de FGFb (Ziche et coll., 1997b). De plus, les effets vasodilatateurs du NO pourraient contribuer à ses effets proangiogénique. L'augmentation du débit sanguin dans la microcirculation squelettique est un des facteurs capable d'accélérer la prolifération des cellules endothéliales. Le NO pourrait également, en influençant indirectement la croissance des cellules endothéliales, augmenter localement le flux sanguin. Enfin, il faut noter que le NO peut induire la synthèse et la libération de VEGF à partir de cellules vasculaires (Dulak et coll., 2000).

I.2.3.5. Rôle dans la régulation des MMPs.

Récemment il a été montré que le NO était capable de stimuler l'expression de plusieurs MMPs dans différents types cellulaires. Par exemple, le NO a été décrit comme étant capable d'induire l'augmentation de MMP-9 dans les cellules musculaires lisses de rat (Marcet-Palacios et coll., 2003), les chondrocytes articulaires de lapin (Sasaki et coll., 1998), les cellules trophoblastiques humaines (Novaro et coll., 2001) et les cellules endothéliales (Steinle et coll., 2002). D'autres études ont aussi démontrées que la MMP-2 pouvait être

induite par le NO notamment dans les cellules endothéliales (Steinle et coll., 2002). Plus récemment, le NO a été décrit comme activateur de l'expression ainsi que de l'activité de la MMP-13 dans les cellules endothéliales aortiques bovine (Zaragoza et coll., 2002 ; Zaragoza et coll., 2005). Dans d'autres études, le NO a aussi été décrit à plusieurs reprises comme un inhibiteur de l'expression des MMPs (Chen et coll., 2004b ; Phillips et coll, 2004).

Lors de l'activation de la MMP-13 par le NO, l'équipe de Zaragoza et collaborateurs a montré que celle-ci mettait en jeu les voies de signalisation PKG puis Raf-1/Erk1/2 et que ceci mener à l'activation du facteur transcriptionnel AP-1 dans les cellules endothéliales.

II. La matrice extracellulaire (MEC).

La MEC est composée majoritairement de collagènes, de glycoprotéines, d'élastine et de protéoglycannes. Ces molécules ont un rôle non seulement physique de soutien tissulaire mais aussi un rôle biologique dans la régulation du phénotype cellulaire (migration, prolifération, différentiation, apoptose). En outre, elle peut également servir de réservoir de noimbreuses molécules dont, entre autre, des facteurs de croissance et leurs inhibiteurs. Les composants de la MEC sont synthétisés par de nombreux types cellulaires, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, cellules épithéliales, et forment avec ces cellules un tissu conjonctif vascularisé.

II.1. Les protéines fibrillaires.

II.1.1. Les collagènes et les fibres de 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 α , sont enroulées les unes autour des autres en une super-hélice en forme de corde. La chaîne α possède environ 1 000 acides aminés. Elle est disposée en une hélice tournée vers la gauche avec trois acides aminés par tour et de le glycocolle tous les trois acides aminés. De ce fait, une chaîne α est composée d'une série de triplets d'acides aminés Gly-X-Y, dans lesquelles 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 glycocolle, tous deux importants dans la formation et la stabilité de l'hélice à trois brins. La proline, du fait de sa structure cyclique, favorise la formation de l'hélice gauche des chaînes α et stabilise la conformation de la triple hélice. Du fait de sa taille et de sa position centrale à l'intérieur de la triple hélice, le glycocolle permet un contact étroit entre les trois chaînes hélicoïdales afin de former la super hélice finale de collagène.

Les collagènes constituent une vaste famille de protéines de structure. Jusqu'à présent 25 chaînes α différentes de collagènes 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 II).

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

<u>Tableau II:</u> Quelques types de collagènes ainsi que leurs propriétés.

Les principaux types de collagènes fibrillaires 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 tissu comme le tendon, l'os, la peau et d'autres tissus conjonctifs complexes. Son rôle premier est de maintenir la structure des tissus. Ces collagènes sont des collagènes fibrillaires ou collagènes formant des fibrilles, dotés de la structure en corde. Après avoir été sécrétées dans l'espace extracellulaire, ces molécules de collagène s'assemblent en polymères d'ordre supérieur, les fibrilles de collagènes, 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. Celles-ci s'agrègent souvent en faisceaux plus larges de types câbles, de plusieurs micromètres de diamètre, qui forment les fibres de collagène que l'on peut observer en microscopie optique.

Le collagène de type IV ne s'asemble pas en fibrilles mais en reseau qui se superposent en plusieurs couches pour former un feuillet qui constitue la majeure partie de la membrane basale. 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). Il existe aussi un certain nombre de protéines de « type collagène », y compris le type XVII qui possède un domaine transmembranaire 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.1.2. L'élastine et les fibres élastiques.

Les tissus tels que les poumons, les artères, les ligaments et la peau sont soumis à de fortes contraintes mécaniques tout au long de l'existence d'un individu. Pour absorber ces contraintes, ces tissus se déforment et reviennent à leur état d'origine continuellement. Leur bon fonctionnement est ainsi dépendant de leurs propriétés élastiques assurées par les fibres élastiques contenues dans la MEC (Kielty et coll., 2002).

L'analyse morphologique de ces fibres en microscopie électronique met en évidence une partie externe, dense aux électrons, matérialisant un réseau microfibrillaire formé principalement de glycoprotéines (fibrillines et glycoprotéines associées aux microfibrilles). La partie centrale parait amorphe, peu dense aux électrons, et est constituée très majoritairement d'élastine mais aussi de quelques microfibrilles (Rosenbloom et coll., 1993).

Les études ultrastructurales qui ont suivi ont révélé que l'élastine n'est pas un composé amorphe comme il a été d'abord supposé. Bien au contraire, l'élastine est structurée et constituée de véritables fibres. La disposition des fibres composant l'élastine lui confère ses propriétés rhéologiques qui peuvent être différentes selon le tissu considéré (Pasquali-Ronchetti et Baccarani-Contri, 1997). Par ailleurs, les fibres élastiques interagissent avec de nombreuses composantes de la MEC mais aussi avec certaines molécules d'adhésion cellulaires.

Nous consacrerons plus loin un chapitre particulier sur l'élastine.

II.2. Les protéines non fibrillaires.

II.2.1. Les glycoprotéines de structure.

Les glycoprotéines sont des protéines ayant subi des modifications posttraductionnelles consistant en des glycosylations variées. On distingue les O-glycosylations et les N-glycosylations, qui consistent en la fixation d'oses sur un résidu serine ou thréonine et un résidu asparagine, respectivement. Parmi les glycoprotéines, un certain nombre ne formant pas de fibres ou n'étant pas agencées en structure spécialisées comme la lame basale sont nommées « protéines matricellulaires » (Bornstein et Sage, 2002). Ces protéines ont la particularité d'être constituées de domaines en répétition. La présence de ces domaines homologues donne aux protéines de la MEC des caractéristiques dites modulaires. On suppose que ce type d'organisation est apparu par duplication, les exons dupliqués ayant évolué indépendamment, générant une grande diversité (Doolittle, 1995). Les principaux domaines sont les domaines fibronectine (FN), les domaines laminine G (LG) et les domaines epidermal growth factor (EGF) (Hohenester et Engel, 2002). Des études utilisants des peptides correspondants à des séquences de différents domaines montrent que de courtes séquences peptidiques (parfois 3 aminoacides) suffisent à l'activation de réponses cellulaires (Yamada et Kleinman, 1992). Une glycoprotéine pourrait donc porter des fonctions distinctes véhiculées par différents domaines. Mais la très forte homologie entre les domaines portés par différentes protéines oblige à considérer une possible redondance. Il a été montré que le clivage des glycoprotéines par des protéinases extracellulaires n'aboutit pas forcément à la perte des activités biologiques de la molécule mais au contraire peut permettre l'apparition de nouvelles activités. Ainsi, le clivage peut libèrer des domaines fonctionnels (Shapiro et coll., 1998), et peut aussi révéler des domaines qui sont inactifs dans la protéine non clivée (cryptic fragments) (Hocking et Kowalski, 2002).

II.2.2. Les polysaccharides.

II.2.2.1. Les Glycosaminoglycannes (GAG).

Les glycosaminoglycannes (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.

II.2.2.2. 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. Les chaînes polysaccharidiques sont principalement assemblées sur ce noyau protéique dans l'appareil de Golgi. Tout d'abord, un 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.

Les protéoglycannes sont généralement faciles à distinguer des 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 protéoglycanne 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 atteindre de très grandes masses moléculaires, par exemple l'aggrécane a une masse moléculaire de 3.10⁶ Da avec plus de 100 chaînes de GAG. D'autres sont bien plus petits et ne possèdent que 1 à 10 chaînes de GAG. 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 facteurs de croissance, des protéinases et leurs inhibiteurs ce qui favorise la régulation de 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 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 dans le but de retarder sa libération ; (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 son récepteur cellulaires de surface.

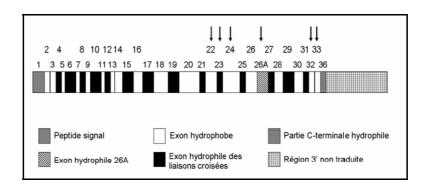
Les GAG et les protéoglycannes peuvent s'associer pour former d'énormes complexes polymériques au sein de la MEC qui à leur tour peuvent s'associer également à des protéines de la matrice fibreuse comme le collagène et aux réseaux de protéines comme la membrane basale, afin de créer des structures extrêmement complexes. La décorine, qui se fixe sur les fibrilles de collagènes, est essentielle pour la fibrillogenèse. Toutefois, tous les protéoglycannes ne sont pas des composants sécrétés dans la MEC. Certains sont des composants intégraux des membranes plasmiques et leur coeur protéique se trouve soit inséré au travers de la bicouche lipidique soit fixé par une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI). Certains de ces protéoglycannes agissent comme co-récepteurs et collaborent avec les récepteurs protéiques cellulaires de surface, à la fois pour ancrer les cellules à la MEC et pour initier la réponse des cellules à certaines protéine. 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 récepteur aux protéines matricielles. Dans les fibroblastes, on retrouve les syndécanes au niveau des plaques d'adhésion focale, où ils modulent la fonction des intégrines en interagissant avec la fibronectine à la surface cellulaire et avec le cytosquelette ainsi que les protéines de signalisation intracellulaire. Il est maintenant établi que les protéoglycannes peuvent jouer un role 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) modifient leur profil de synthèse de protéoglycannes en fonction de leur capacité à générer des métastases. D'une facon générale, le pouvoir invasif des cellules cancéreuse 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).

III. L'élastine.

III.1. Structure.

III.1.1. Structure du gène de l'élastine.

Le gène de l'élastine est en exemplaire unique dans le génome humain et localisé sur le chromosome 7 en position 7q11.2 (Fazio et coll., 1991). Sa taille est de 45 kb et il contient 34 exons avec un rapport intron/exon en taille d'environ 19/1 rendant compte d'exons relativement petits intercalés au milieu de grands introns (Bashir et coll., 1989). Les caractéristiques structurales de l'ADNc de l'élastine (Figure 7) reflètent la structure de son produit, la tropoélastine, en cela que les exons codant les domaines hydrophobes et hydrophiles (ceux intervenant dans la formation des liaisons croisées) sont localisés de façon alternée sur le gène. L'exon 26A est spécifique de l'espèce humaine mais sa fonction est encore inconnue aujourd'hui. Les exons 34 et 35 de l'élastine bovine sont absents du gène humain prouvant que des variations inter-espèces existent (Vrhovski et Weiss, 1998). Par ailleurs, les exons 22, 23, 24, 26, 32 et 33 peuvent subir des épissages alternatifs mais on n'en connaît pas la signification. Enfin, l'exon 36 est particulièrement conservé (>70 %) entre les différentes espèces. Cet exon code pour la partie C-terminale de la protéine en amont d'une longue région 3' non traduite et dont la fonction est liée à la stabilisation de l'ARNm affectant alors la synthèse d'élastine (Hew et coll., 1999).

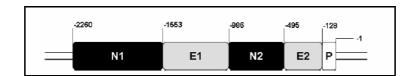


<u>Figure 7:</u> Structure de l'ADNc de la tropoélastine humaine. Les exons marqués d'une flèche sont potentiellement éliminés lors de l'épissage alternatif (d'après Vrhovski et Weiss, 1998).

III.1.2. Contrôle de l'expression.

L'élastogenèse est un mécanisme mis en place essentiellement au stade précoce du développement des individus. Il a été démontré *in vivo* que l'activité du promoteur de l'élastine décroît en fonction de l'âge (Hsu-Wong et coll., 1994). Ce promoteur peut être divisé en plusieurs régions régulatrices (Figure 8) (Rosenbloom et coll., 1993). Le promoteur

basique du gène semble se situer dans la région comprise entre -1 et -128 pb dans la région 5' flanquante du gène de l'élastine. Ce promoteur basique possède deux sites AP-2 potentiels ; en revanche aucune boîte TATA n'a pu être mise en évidence et les boîtes CAAT présentes ne sont pas fonctionnelles. D'autres sites AP-2 et « Specific Protein » (SP)-1 ont pu être établis dans la région s'étendant de -129 à -495 pb expliquant une forte régulation positive du promoteur basique par cette région notamment par la voie AMPc. Une deuxième région de régulation positive a pu être montrée dans la séquence -987 à -1553. Cette région étant encadrée par deux régions de régulation négative de -496 à -986 et de -1554 à -2260. Les mécanismes régulant l'expression du gène de l'élastine ne se limitent pas à l'activation de son promoteur puisque plus de huit sites de départ de transcription ont été relevés (Rosenbloom et coll., 1993; Bashir et coll., 1989; Rosenbloom et coll., 1991). De plus, les régions introniques du gène semblent posséder elles aussi des éléments de régulation. Il a été montré que le premier intron du gène bovin, dont la séquence est très proche de celui de l'Homme, possède des éléments de régulation négative (Manohar et Anwar, 1994). Dans les cellules activées en présence de facteurs de croissance ou d'hormones, la synthèse d'élastine peut être affectée soit au niveau transcriptionnel en régulant l'activité du promoteur, soit au niveau post-transcriptionnel en affectant la stabilité de l'ARNm de l'élastine. Ainsi, le TNF-α et le b-FGF induisent une répression de l'expression du gène (Kahari et coll., 1992) (Brettell et McGowan, 1994) (Rich et coll., 1999), alors que les glucocorticoïdes, l'»Insulin Growth Factor » (IGF)-1, l'IL-10 et l'IL-1β ont un effet opposé (Pierce et coll., 1995) (Mauviel et coll., 1993; Reitamo et coll., 1994; Rich et coll., 1993). Le TGF-\beta1 a été montré comme un régulateur positif de la synthèse d'élastine en augmentant la stabilité de l'ARNm par le biais de protéines cytosoliques se fixant à des endroits particuliers de l'ARNm de la tropoélastine (Kahari et coll., 1992; Zhang et Parks, 1999; Kucich et coll., 2002).

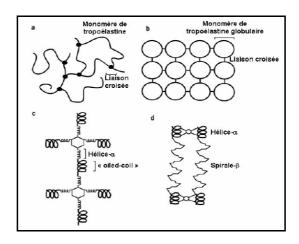


<u>Figure 8</u>: Représentation schématique des domaines fonctionnels du promoteur du gène de l'élastine. (P) est le promoteur basique, (E1) et (E2) sont les éléments de régulation positive, (N1) et (N2) sont les éléments de régulation négative (d'après Rosenbloom, FASEB J 1993).

III.1.3. Modèles structuraux.

L'élastine est une protéine abondante pouvant représenter 50% de la masse sèche des ligaments, 30% de l'aorte thoracique et des grands vaisseaux, 7% du poumon et 3% de la peau (Uitto, 1979). Par définition, l'élastine ne possède pas de structure stable dans la mesure où elle est en perpétuel mouvement. Cependant quatre modèles ont été décrits et répondent au

mécanisme d'élasticité (Figure 9). Le modèle le moins controversé actuellement est celui de la « goutte liquide » qui répond à la théorie d'élasticité bi-phasique. En effet, la déformation des domaines globulaires par étirement expose les groupements hydrophobes internes à l'eau environnante baissant ainsi l'entropie du système.



<u>Figure 9:</u> Modèles structuraux proposés de l'élastine. a. Modèle du "réseau aléatoire" correspondant à des chaînes pontées arrangées aléatoirement dans une architecture tridimensionnelle quelconque, **b.** Modèle de la "goutte liquide" correspondant à des molécules de tropoélastine globulaire liées par des liaisons croisées, **c.** Modèle "oiled coil" dans lequel des domaines de liaison croisée α-hélicoïdaux joignant deux chaînes ou plus ainsi qu'un "oiled coil" formé par les domaines hydrophobes, **d.** Modèle "fibrillaire" consistant en des liaisons croisées α-hélicoïdales et d'une hélice lâche, la spirale β, formée par les domaines hydrophobes répétitifs. Les spirales β peuvent s'associer pour former de longs filaments qui, avec l'aide des liaisons croisées, maintiennent plusieurs chaînes ensemble. (D'après Vrhovski et Weiss, 1998).

La force de restitution est conduite par l'augmentation de l'entropie remettant le système dans son état initial (Figure 10) (Weis-Fogh et Anderson, 1970). Les résultats obtenus en spectroscopie optique confortent cette architecture en monomères globulaires reliés par des liaisons croisées (Debelle et coll., 1995).

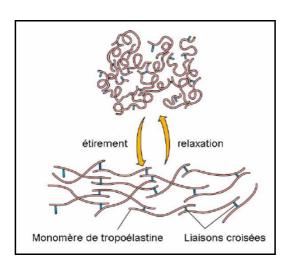


Figure 10: Schématisation de l'étirement des fibres d'élastine.

Une caractéristique majeure de l'élastine est son extrême insolubilité. Cette particularité provient de sa composition en acides aminés très hydrophobes tels que V, A, P et G pouvant représenter 75% de la protéine chez les vertébrés supérieurs (Rosenbloom et coll., 1993). Pendant très longtemps, l'insolubilité de l'élastine a gêné les recherches sur les mécanismes conduisant à la mise en place des fibres élastiques jusqu'à la découverte d'un précurseur soluble : <u>la tropoélastine</u>.

III.1.4. La tropoélastine.

Les tropoélastines de diverses espèces, à savoir l'homme (Indik et coll., 1987), le poulet (Bressan et coll., 1987), le boeuf (Raju et Anwar, 1987) et le rat (Pierce et coll., 1990), ont été séquencées et présentent toutes une forte homologie tant au niveau du gène que de la protéine. La protéine est caractérisée par deux types de domaines majeurs : des domaines hydrophobes riches en G, V, P et A présentant des motifs répétés tels que VGVAPG situés dans l'exon 24 (Figure 11); des domaines hydrophiles généralement riches en K et A impliqués dans les liaisons croisées et les interactions avec les composantes des microfibrilles (Tableau III).

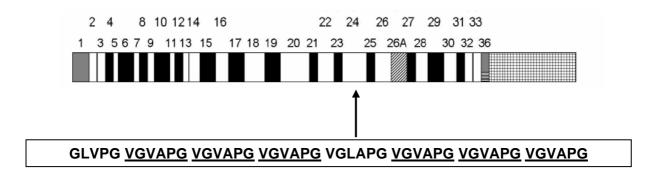


Figure 11: Domaine en répitition de type VGVAPG dans l'exon 24.

EXON	SEQUENCE	PROPRIETES
19	AAAKAAAKAAAY	Formation des liaisons croisées
24	(VGVAPG)n	Domaine de fixation aux cellules
36 (34)	ACLGKACGRKRK	Domaine de fixation aux microfibrilles

<u>Tableau III:</u> Quelques exemples de séquences importantes de la tropoélastine.

III.1.5. Sécrétion et assemblage.

La molécule de tropoélastine comme toute les protéines sécrétees est synthétisée à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER). Elle subit très peu de modifications post-traductionnelles : clivage de la séquence signal et hydroxylation de certains résidus prolyl. Pour être secrétée, la tropoélastine se complexe rapidement à l'Elastin Binding Protein (EBP) qui joue alors le rôle de protéine chaperonne empêchant l'agrégation intracellulaire de la tropoélastine (Figure 12). Ce complexe EBP-tropoélastine est incorporé dans des vésicules de transport jusqu'à la surface cellulaire où l'EBP se lie avec une protéine protectrice (PP) de 55 kDa et une neuraminidase (Nase) de 61 kDa. Les résidus galactosyl provenant de la fibrilline, protéine des microfibrilles, se lient au site lectine de l'EBP engendrant une baisse de l'affinité entre l'EBP et la tropoélastine. Cette dernière est alors libre de se fixer à un site d'assemblage d'une glycoprotéine associée aux microfibrilles (MAGP). Ainsi assemblés, les monomères d'élastine sont ensuite liés par des liaisons croisées à l'élastine insoluble. L'EBP se détache de son complexe membranaire et peut être en grande partie ré-internalisée par endocytose. Dans l'endosome, l'EBP est recyclée en se réassociant avec une nouvelle molécule de tropoélastine. Ce recyclage semble essentiel pour une sécrétion et un assemblage extracellulaire efficace de l'élastine (Hinek, 1996). Dès sa libération dans l'espace extracellulaire, la tropoélastine est transférée à un site d'assemblage localisé sur la MAGP responsable de l'ancrage de la tropoélastine par sa cystéine C-terminale sur l'architecture microfibrillaire (Brown et coll., 1992; Mecham, 1991). La tropoélastine est ensuite rendue insoluble par la formation de liaisons croisées avec l'élastine déjà présente (Bressan et Prockop, 1977).

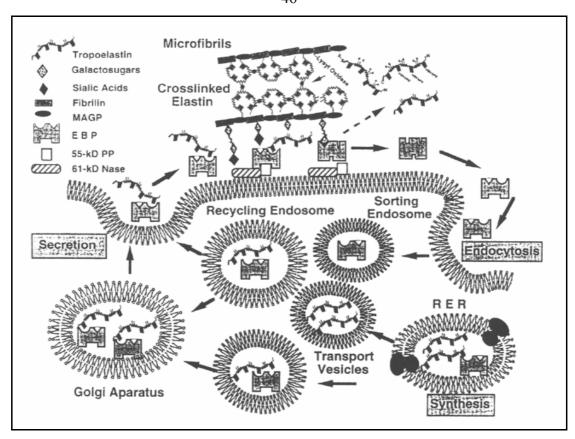


Figure 12: Schématisation de la sécrétion et assemblage de l'élastine. (D'après Hinek, 1996).

La formation des liaisons croisées est initiée par une enzyme particulière : la lysyl oxydase (LOX). Cinq enzymes lysyl-oxydase-like (LOXL) ont été caractérisées (LOX, LOXL, LOX2, LOX3 et LOXC). Ces isoformes possèdent de grandes homologies au sein de leur domaine catalytique C-terminal mais diffèrent par leur région N-terminale susceptible de leur conférer leur spécificité. Jusqu'à présent, seules les formes LOX et LOXL semblent impliquées dans la formation des liaisons croisées de l'élastine. La réaction initiale consiste en une désamination oxydative des résidus lysyls par la lysyl oxydase pour former un groupement allysine. Toutes les autres réactions faisant suite à cette modification sont spontanées et ont lieu entre des résidus lysyls et allysines suffisamment proches pour former les liaisons croisées comme l'allysine aldol, la lysonorleucine, la merodesmosine et les liaisons croisées tétrafonctionnelles propres à l'élastine, comme la desmosine ou l'isodesmosine (Reiser et coll., 1992).

III.2. Dégradation de l'élastine : les peptides d'élastine.

Les propriétés hydrophobes de l'élastine et sa richesse en liaisons croisées font de cette macromolécule un polymère très résistant. Sa demi-vie chez l'homme est estimée à 70 ans (Rosenbloom et coll., 1991). Cependant, plusieurs protéinases sont capables de dégrader l'élastine insoluble et sont regroupées sous le nom d'élastases (Menashi et coll., 1989). Le remplacement de l'élastine étant quasiment inexistant dans les conditions physiologiques

normales, ces élastases sont donc sécrétées au cours de processus physiopathologiques comme la progression tumorale ou au cours de processus inflammatoires. Les élastines à sérine, représentées par l'élastase pancréatique, l'élastase leucocytaire et la cathepsine G, sont les élastases les plus abondantes chez les mammifères. Parmi les peptides générés par hydrolyse partielle de séquences peptidiques dérivés de l'exon 24 de l'élastine en présence d'élastase leucocytaire, certains possèdent la séquence consensus GXXPG (Lombard et coll., 2006) dont on a démontré qu'elle adopte une conformation en coude β de type VIII nécessaire à son interaction avec le récepteur de l'élastine. Une autre sérine protéinase des leucocytes, la protéinase 3, est également capable de générer des peptides possèdant la séquence GXXPG (Lombard et coll., 2005). Certaines MMPs, comme les MMP-2, -9, -7 et -12, sont également des élastases efficaces (Hornebeck et coll., 2002 ; Pardo et Selman, 1999 ; Fulop et Larbi, 2002). D'autres protéinases appartenant à la famille des cystéines protéinases comme les cathepsines K, L et S sont capables aussi de fragmenter l'élastine (Punturieri et coll., 2000). En résumé, ces enzymes sont capables de générer à partir de l'hydrolyse de l'élastine une grande variété de petits peptides dont certains contiennent la séquence de type GXXPG ou XGXXPG dont VGVAPG connue pour interagir avec le récepteur de l'élastine (Barroso et coll., 2006). Le terme de « peptide d'élastine » ne s'apparente pas uniquement aux produits de digestion enzymatique de l'élastine (lysat enzymatique) mais également aux produits issus de la protéolyse chimique. Par exemple, l'hydrolyse de l'élastine insoluble par l'acide oxalique conduit à la formation de deux groupes de peptides hétérogènes en taille, l'α-élastine et la βélastine (Partridge et coll., 1955), et celle par la potasse éthanolique à la formation de κélastine (Jacob et Hornebeck, 1985).

In vivo, les peptides issus de la dégradation de l'élastine (PDE) ne sont pas de simples produits de dégradation inertes générés au sein de la MEC. Au contraire, ces PDE sont capables de modifier le comportement de nombreux types cellulaires et répondent en ce sens à la définition de « matrikine » dont les effets biologiques sont décrits dans les tableaux IV et V.

e /	6 11 1	F// .	D///
<u>Séquences</u>	<u>Cellules</u>	<u>Effets</u>	<u>Références</u>
VG V APG	Monocytes	Chimiotactisme	(Bisaccia et al., 1998; Hance et al., 2002; Senior et al., 1984)
	Fibroblastes	Chimiotactisme Prolifération	(Senior et al., 1984) (Kamoun et al., 1995; Tajima et al., 1997)
	Cellules musculaire lisse	Prolifération	(Mochizuki et al., 2002)
		Ostéogenèse	(Simionescu et al., 2005)
	Lymphocytes	Polarisation Th-1	(Debret et al., 2005)
	Cellules endothéliales	Chimiotactisme Induction de l'angioge	(Long et al., 1989)
		That the tangloge	(Robinet et al., 2005)
<u>PG AIPG</u>	Fibroblastes	Chimiotactisme	(Grosso and Scott, 1993a; Grosso and Scott, 1993b)
LREGDP55	Monocytes	Chimiotactisme	(Bisaccia et al., 1998; Long et al., 1989)
<u>GFGVGAGVP</u>	Fibroblastes Cellules endothéliales	Chimiotactisme Chimiotactisme	(Long et al., 1989) (Long et al., 1989)
<u>GLGVGAGVP</u>	Cellules endothéliales	Chimiotactisme	(Long et al., 1989)
<u>VPG VG</u>	Cellules musculaires lisses	Prolifération	(Wachi et al., 1995)

<u>Tableau IV:</u> Effets Biologiques de différents peptides issus de la tropoélastine.

Cellules	Effets	Références
Monocytes	Chimiotactisme	(Chen et al., 1997; Jacob et al., 1987;Kamisato et al., 1997; Senior et al., 1980; Uemura and Okamoto, 1997)
	Modification du flux ionique Libération ROS Inhibition de la synthèse de cholestérol	(Jacob et al., 1987) (Fulop et al., 1986) (Varga et al., 1997)
Lymphocytes	Prolifération Induction de l'apoptose	(Poggi and Mingari, 1995) (Peterszegi et al., 1999)
Fibroblastes	Chimiotactisme	(Mecham et al., 1989)
	Prolifération	(Ghuysen-Itard et al., 1992; Kamoun et al., 1995;Tajima et al., 1997)
Cellule Musculaire lisse	Chimiotactisme Prolifération Modification du flux ionique	(Ooyama et al., 1987) (Mochizuki et al., 2002) (Jacob et al., 1987)
<u>Cellules</u> <u>Endothéliales</u>	Induction de l'angiogenèse effet vasodilatateur et libération de NO	(Robinet et al., 2005) (Faury et al., 1998a)

<u>Tableau V:</u> Activités biologiques des peptides d'élastine.

Dans le cadre de notre étude nous nous sommes restreints aux peptides contenant la séquence VGVAPG et qui répondent au terme d' « élastokines ».

III.3. Le complexe récepteur de l'élastine.

III.3.1. Mise en évidence d'un récepteur membranaire.

La plupart des effets biologiques induits par les PDE sont imputés à la présence d'un complexe membranaire faisant office de récepteur cellulaire (Duca et coll., 2004). Les premiers travaux sur l'induction d'un effet chimiotactique par la tropoélastine, ou des fragments issus de l'élastine insoluble, sur des fibroblastes ou des leucocytes humains a amené l'hypothèse selon laquelle l'élastine devait posséder un véritable récepteur à la surface de ces cellules (Senior et coll., 1984). Cette hypothèse fut largement consolidée suite à la démonstration d'un réel appariement entre des fibres élastiques purifiées et des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Enfin, des études chromatographiques par affinité ont révélé la présence d'un complexe récepteur à la surface de nombreux types cellulaires tels que des fibroblastes, des myocytes vasculaires, des neutrophiles, des monocytes et diverses cellules tumorales humaines dont des cellules de mélanomes (Hinek et coll., 1988). Le complexe récepteur de l'élastine est constitué de deux sous-unités (de 55 et 61 kDa) liées à la membrane, et une sous-unité périphérique capable de se fixer à l'élastine et nommée EBP (Mecham et coll., 1989a). Si la plupart des études menées sur l'EBP lui confère une masse moléculaire apparente de 67 kDa, il est toutefois intéressant de noter que certains auteurs ont pu associer cette protéine à une masse apparente de 59 kDa à la surface de cellules telles que la lignée cellulaire de carcinome pulmonaire de Lewis, et de fibroblastes issus du ligament cardinal de patientes atteintes d'un prolapsus utérin (Blood et coll., 1988; Yamamoto et coll., 2002).

III.3.2. Description des sous-unités.

-A- L'EBP.

Le séquençage partiel de l'EBP à partir de cellules musculaires lisses de mouton a révélé une grande homologie entre cette protéine et un variant d'épissage de la β-galactosidase (β-Gal) humaine conduisant à un mutant enzymatique inactif (Hinek et coll., 1996). Cette protéine proche de la β-Gal, nommée S-gal (Spliced-galactosidase), a perdu son activité enzymatique mais a conservé un domaine de fixation de residus galactosyl. De plus, cette protéine n'est plus adressée au lysosome mais à la surface cellulaire (Morreau et coll., 1989). Une séquence de 32 acides aminés dans la partie centrale de S-gal comportant le motif VVGSPSAQDEASPL a été impliquée dans l'interaction avec l'élastine (Figure 13) (Hinek et

coll., 1996). Il est aujourd'hui accepté que S-gal et EBP ne sont qu'une seule et même entité (Privitera et coll., 1998). Ce récepteur a aussi été décrit comme le récepteur de la laminine (Mecham et coll., 1989b)

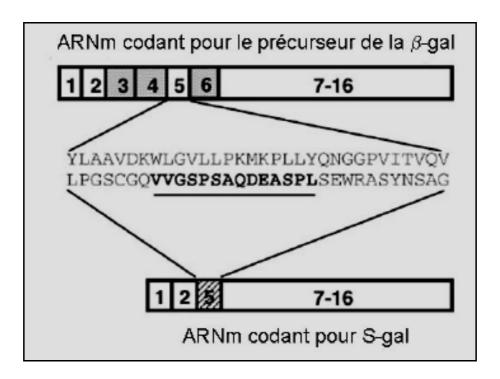


Figure 13: Schématisation de l'épissage alternatif du transcrit primaire de la β-Gal. Les exons 3, 4 et 6 sont épissés et le cadre de lecture de l'exon 5 est décalé pour faisant apparaître une région de 32 acides aminés caractéristique de S-gal (d'après Privitera et coll., J Biol Chem 1998).

Les similitudes entre le complexe récepteur de l'élastine et le mécanisme d'action de la β -Gal ne se limitent pas à S-gal puisque l'EBP, comme la β -Gal, est reliée à deux autres sous-unités: une PP de 55 kDa, et une Nase de 61 kDa.

-B- La protéine protectrice (ou cathepsine A).

La présence d'une sous-unité de 55 kDa au sein du complexe récepteur de l'élastine pouvant correspondre à une protéine protectrice (PP) a été démontrée par immuno-marquage à la surface de cellules musculaires lisses aortiques et dans le complexe retenu par affinité dans des colonnes contenant de l'élastine (Hinek et coll., 1996). La PP est d'abord synthétisée en un précurseur de 55 kDa puis clivée en sa forme mature correspondant à deux peptides de 20 et 32 kDa reliés par des ponts disulfures (Morreau et coll., 1992). Cette protéine porte son nom en raison de son rôle au sein du lysosome où elle protège la β-Gal et la Nase d'une digestion lysosomale. Pour la Nase, cette protection semble dépendante d'une simple interaction entre les deux molécules (Lukong et coll., 2001). Indépendamment de sa fonction protectrice, la PP est dotée d'activités sérine estérase (E.C. 3.2.1.23). Ainsi, la PP peut se comporter d'une part comme une carboxypeptidase à pH acide, et d'autre part comme une estérase et une désaminase carboxy-terminale à pH neutre (Galjart et coll., 1991).

-C- La neuraminidase.

La Nase liée au complexe récepteur est la Nase lysosomale (NEU1 ; E.C. 3.2.1.18) secrétée sous la forme d'une pré-pro-enzyme de 45,5 kDa pouvant être glycosylée et tronquée pour former une protéine transmembranaire mature de 48,3 kDa (Callahan, 1999). Cependant, le degré de glycosylation variable peut engendrer des masses moléculaires pouvant atteindre 66 kDa pour la Nase lysosomale placentaire humaine (Van der Horst et coll., 1989). La fonction enzymatique de la NEU1 consiste à libérer un résidu d'acide sialique non réducteur situé en position N-terminale des glycoprotéines, oligosaccharides, polysaccharides, gangliosides ou encore des glycolipides. La distribution cellulaire de la Nase dépend de la phosphorylation d'une région C-terminale 412 YGTL 415. Ainsi, en absence de phosphorylation, la Nase et sa PP associée ont une localisation préférentielle à la membrane du lysosome. Lorsque la 412 Y est phosphorylée, la majeure partie des complexes Nase/PP est retrouvée à la membrane plasmique (Lukong et coll., 2001). L'implication d'une Nase dans la transduction d'un signal a déjà pu être démontrée, et notamment dans l'activation de cellules T et la sécrétion d'IL-4 par ces mêmes cellules en présence de Nase bactérienne (Chen et coll., 1997). De même, l'ajout de cette enzyme sur des monocytes provoque la désialylation de glycoconjugués non identifiés à la surface cellulaire, conduisant à l'activation de la voie Erk 1/2 (Stamatos et coll., 2004). Ces différentes données ont amené l'hypothèse que la NEU1 pourrait être au coeur du mécanisme de transduction du signal induit par le complexe récepteur de l'élastine.

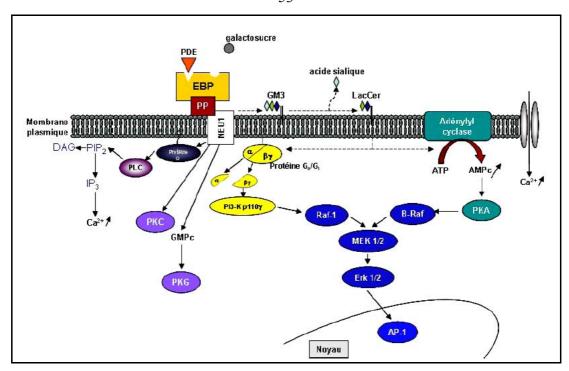
III .3.3. Transduction du signal intracellulaire.

La signalisation intracellulaire induite par le complexe récepteur de l'élastine n'est pas encore totalement élucidée. Les divers éléments bibliographiques font apparaître des mécanismes distincts selon l'effet observé (chimiotactisme, prolifération, sécrétion de protéinases,...), mais également selon le type cellulaire étudié.

Les premières études sur la signalisation induite par les PDE ont été menées sur des monocytes et ont montré que la stimulation par de la κ-élastine induit une augmentation du taux intracellulaire en AMPc, Guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique (GMPc) et Ca ainsi qu'une stimulation de respiratoire de ces cellules (Fulop et coll., 1986). Ces auteurs ont suggéré que l'augmentation du taux de GMPc pouvait être relié au chimiotactisme. Cette hypothèse fut confirmée un peu plus tard avec l'implication d'une Protéine Kinase G (PKG) (Uemura et Okamoto, 1997; Kamisato et coll., 1997). Le chimiotactisme des cellules de carcinome pulmonaire M27 par les PDE fait intervenir une PKC (Blood et Zetter, 1989).Dans

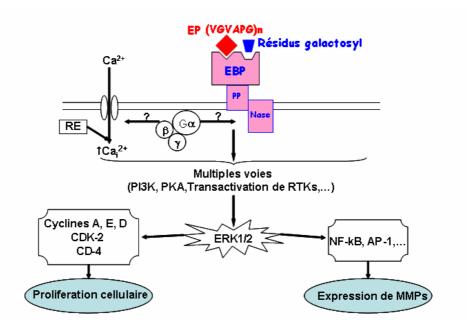
les polynucléaires neutrophiles, la stimulation par des PDE active l'explosion respiratoire. Dans ces cellules, le complexe récepteur de l'élastine semble couplé à une protéine-G sensible à la toxine pertussique, et l'inositol 3,4,5-trisphosphate (IP₃) est formé à partir de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) induisant une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Varga et coll., 1989 ; Varga et coll., 1990). Une telle augmentation de la concentration de calcium a également pu être mise en évidence dans des cellules endothéliales suite à l'ouverture de canaux calciques (Faury et coll., 1998). L'induction de la prolifération cellulaire par les PDE a été étudiée dans les cellules musculaires lisses de porc (Mochizuki et coll., 2002). Cette étude a révélé le recrutement de la cascade Raf/MEK/ERK par les PDE suite à l'activation d'une protéine-G sensible à la toxine pertussique et à la transactivation du récepteur de PDGF. De manière très intéressante, Duca et collaborateurs ont également pu mettre cette voie en évidence dans des fibroblastes dermiques humains dans le cadre d'une étude portant sur l'induction de sécrétion de MMP-1 par des PDE. Ces expériences ont permis de définir plus précisément les activateurs de cette voie et de montrer que deux mécanismes parallèles pouvaient intervenir dans l'activation de MEK; d'une part la voie AMPc/Protéine Kinase A (PKA)/B-Raf, et d'autre part le système protéine-G/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3Kinase)/Raf-1. L'activation de la cascade MEK/Erk 1/2 aboutit au recrutement du facteur de transcription AP-1 intervenant dans l'activation de promoteurs de nombreux gènes (Duca et coll., 2002 ; Duca et coll., 2005).

Le mécanisme d'action du complexe récepteur permettant de transmettre ces messages intracellulaires n'est pas totalement élucidé. Cependant, des travaux récents montrent que ce complexe récepteur est localisé au sein de « radeaux » lipidiques (« Rafts ») et que la clé du système semblerait résider dans l'activité sialidase de la NEU1. En effet, la stimulation de fibroblastes dermiques par des PDE est capable d'entraîner la libération d'acide sialique et la formation de lactosyl céramide (LacCer) à partir d'un glycoconjugué lipidique, le GM3, qui est un substrat préférentiel de la NEU1. Ce mécanisme est inhibé en présence de lactose (Duca, thèse d'université, 2004). Les principales voies de signalisation médiées par les peptides d'élastine sont représentées sur la figure 14.



<u>Figure 14:</u> Résumé des données de la littérature concernant les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine.

En résumé, cette signalisation médiée par les peptides d'élastine induit via ERK1/2 la prolifération cellulaire et l'expression de protéinases dont les MMPs (Figure 15).



<u>Figure 15:</u> Représentation schématique des voies de signalisation médiées par les peptides d'élastine. La fixation des peptides d'élastine sur EBP active ERK 1/2 via différentes voies de signalisation y compris par transactivation de récepteurs à tyrosine kinase (RTKs). Cette signalisation conduit à la prolifération cellulaire et à l'expression de MMPs. (D'après Antonicelli et coll., 2007, sous presse).

IV. Les Metalloprotéinases matricielles (MMPs).

La première activité collagénasique a été observée par Gross et Lapiere en 1962, lors de l'étude de la maturation de la queue de têtard. Depuis, 25 MMPs possédant une activité protéolytique dépendante d'un ion zinc et des ions calcium et appartenant aux groupes des matrixines ont été identifiées. Chacune de ces enzymes est capable de dégrader au moins un composant de la matrice extracellulaire. Pour cette raison on les a appelées : les Métalloprotéinases de la Matrice Extracellulaire (MMPs) (2,7).

IV.1. Structure des MMPs.

Les MMPs peuvent être subdivisées en huit groupes structuraux distincts : cinq correspondent à des MMPs sécrétées et trois à des MMPs membranaires. Cette subdivision correspond à la classification des MMPs basée sur la structure de ces protéinases (Figure 16). Les MMPs s'organisent en domaines et le plus petit représentant contient 3 domaines : une séquence signal amino-terminale (Pre) qui les dirigent vers le réticulum endoplasmique, un propeptide (Pro) contenant un groupement thiol (SH) interagissant avec un ion Zn²⁺ conférant à l'enzyme sa nature zymogène inactive ; un domaine catalytique possédant un site de fixation pour le zinc (Zn). En plus de ces domaines trouvés dans ces MMPs, d'autres MMPs (single hemopexin-domain-containing MMPs) un domaine C-terminal de type hemopexine (hemopexin-like domain) lequel est connecté au domaine catalytique par une région charnière. La première et la dernière répétition de ce domaine sont reliées par un pont disulfure (S-S). Ce domaine gouverne les interactions avec les TIMPs, avec certaines molécules associées à la surface cellulaire et avec leurs substrats. Les MMPs interagissant avec la gélatine (Gelatin-binding MMPs) contiennent des domaines ressemblant aux répétitions de type II de la fibronectine liant le collagène (Fi). Ces domaines au nombre de trois sont également appelés CBD pour Collagen Binding Domain. Les MMPs sécrétées et activées par la Furine (Furin-activated secreted MMPs), contiennent un motif de reconnaissance pour des protéinases à sérine intracellulaire de type Furine (f) trouvé entre leur propeptide et leur domaine catalytique permettant leur activation intracellulaire.

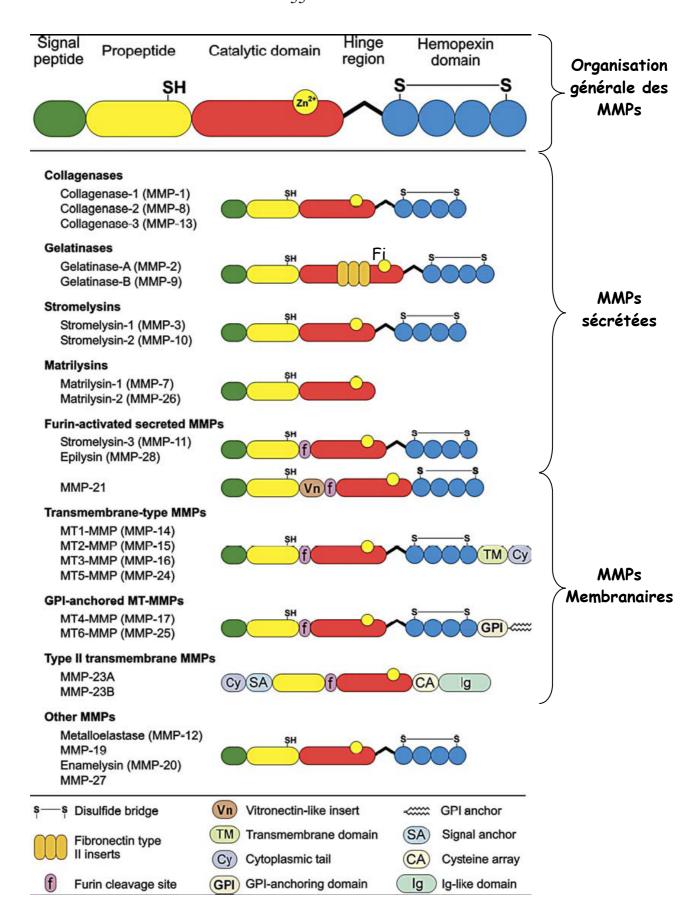


Figure 16: Organisation moléculaire des MMPs. (D'après Ala-aho et coll., 2005)

Ce motif est également trouvé au sein des MMPs possédant un domaine de type vitronectine (vitronectin-like insert MMPs) et au sein des MMPs membranaires (MT-MMPs). Ces dernières possèdent un domaine transmembranaire simple (TM), et un domaine cytoplasmique très court (Cy). Les MMPs ancrées au GPI (GPI-anchored MMPs) appartiennent au groupe des MMPs membranaires. La 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 immunoglobuline-like (Ig).

IV.2. Classification des MMPs.

IV.2.1. Les collagénases.

Le sous-groupe des collagénases comprend la MMP-1, la MMP-8, la MMP-13 et la MMP-18 (chez *Xenopus*). Ces collagénases sont capables de cliver les collagènes de type I, II et III mais également d'autres molécules de la MEC et protéines solubles. La MMP-1 (collagénase-1) fut le premier membre identifié des MMPs. L'expression de la MMP-1 est détectée au cours de nombreux processus physiologiques incluant le développement embryonnaire et la réparation ainsi que dans plusieurs processus pathologiques comme les ulcéres cutannés chroniques et de nombreux types de tumeurs malignes (Ala-aho et Kahari, 2005). La MMP-1 clive les collagènes de types I, II, III, VII, VIII et X, l'aggrécanne, ainsi que les inhibiteurs de sérine protéinases et la macroglobuline-α (Ala-aho et Kahari, 2005). Une étude récente a montré que la MMP-1 pouvait activer PAR1 (Protease Activated Receptor-1) par clivage du dipeptide Arg-Ser, clivé également par la thrombine, ce qui permettrait la croissance et l'invasion des cellules de carcinome de sein (Boire et coll., 2005). La MMP-8 (collagénase-2) est synthétisée par les neutrophiles lors de leur maturation dans la moelle osseuse, stockée dans leurs granules intracellulaires et libérée en réponse à des stimuli externes (Hasty et coll., 1990). De plus, la MMP-8 humaine est exprimée par les chondrocytes du cartilage articulaire, les cellules épithéliales bronchiques et les monocytes lors de bronchites. Les substrats majeurs de la MMP-8 sont les collagènes I, II et III et l'aggrécanne (Ala-aho et Kahari, 2005). La MMP-13 (collagénase-3) a été clonée à partir de tissus de cancer du sein humain (Freije et coll., 1994). Par rapport aux autres MMPs, la MMP-13 posséde un large spectre de spécificité de substrats et un profil d'expression restreint. Elle clive les collagènes fibrillaires de type I, II et III, la gélatine, les collagènes de type IV, IX, X et XIV, la tenascine C, la fibronectine, l'aggrécanne, le versicanne, et l'ostéonectine (Ala-aho et Kahari, 2005). La MMP-13 peut activer des chémokines comme MCP-3 (monocyte chemoattractant protein-3) et SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) (McQuibban et coll., 2000; McQuibban et coll., 2001) et semble impliquée dans l'activation du TGF-β3 (Deng et coll., 2000). Son expression est limitée au remodelage de la MEC, le développement osseux foetal et post-natal, la réparation et certains processus pathologiques mettant en jeu la destruction du collagène (paradontite, athérosclérose, ulcéres cutanés, etc...) (Ala-aho et Kahari, 2005).

IV.2.2. Les gélatinases.

On compte deux gélatinases : la MMP-2 (gélatinase A) et la MMP-9 (gélatinase B). Elles présentent la capacité de dégrader la gélatine grâce à leurs trois séquences répétitives FN II qui permettent la liaison à la gélatine et aux collagènex. Elles ont pour substrat un grand nombre de molécules de la MEC dont les collagènes de types IV, V et XI, la laminine, la protéine du core de l'aggrécanne et l'élastine. La MMP-2 présente la particularité de digérer également les collagènes de type I, II et III de la même manière que les collagénases (Aimes et Quigley, 1995; Patterson et coll., 2001). La forme active de la MMP-2 a une masse moléculaire de 62 kDa alors que la pro-MMP-2 a une masse moléculaire de 72 kDa. Dans la majorité des cancers, la MMP-2 serait secrétée par les fibroblastes, puis recrutée au niveau des cellules tumorales par le biais de l'intégrine $\alpha_v \beta_3$. En plus des composants matriciels qu'elle dégrade la MMP-2 est aussi capable d'activer le précurseur du TNF-α (Gearing et coll., 1995) et de dégrader l'IL-1β (Ito et coll., 1996). La MMP-2 a été décrite pour la première fois par (Liotta et coll., 1979). Ces auteurs ont isolé cette enzyme à partir d'une tumeur murine. La MMP-2 est unique parmi les MMPs puisqu'elle est exprimée de manière constitutive par un grand nombre de cellules différentes, possède une distribution tissulaire ubiquitaire et un mode d'activation qui diffère de celui des autres MMPs. La MMP-2 est capable d'activer la MMP-9 et la MMP-13 (Fridman et coll., 1995). Son rôle dans l'invasion tumorale et la dissémination métastatique a été largement décrit (Stetler-Stevenson, 1994; Chang et Werb, 2001; Egeblad et Werb, 2002; Polette et coll., 2004). L'implication de la MMP-2 dans l'invasion tumorale a été renforcée par l'étude de Itoh et coll. qui a montré que des souris déficientes en MMP-2 ont une angiogenèse et une progression tumorale réduites (Itoh et coll., 1998). La MMP-2 joue aussi un rôle dans la prolifération et la différenciation, l'adhérence et la migration (Yu et coll., 1997).

La MMP-9 a une spécificité de substrat très semblable à celle de la MMP-2. La MMP-9 a été découverte en 1974 par Sopata et Dancewicz dans les neutrophiles (Sopata et Dancewicz, 1974). En dehors des nombreux composés matriciels qu'elle dégrade, la MMP-9 régule aussi l'activité de cytokines et d'hormones puisqu'elle clive l'IL-1β et la substance P

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

IV.2.3. Les stromélysines.

Les stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11) ont une organisation en domaine similaire à celle des collagénases. Les MMP-3 (stromélysine-1) et -10 (stromélysine-2) ont une structure identique, un spectre large et similaire de substrats (collagènes de type III, IV, IX, et X, gélatine, laminine et protéoglycanne), et participent toutes deux à l'activation des pro-MMPs (Visse et Nagase, 2003). La MMP-3 est produite préférentiellement par les cellules stromales et sa surexpression est associée à l'invasion et aux métastases de divers types de cancer ainsi qu'à la progression des plaques d'athérosclérose (Sternlicht et coll., 2000). La MMP-10 semble exprimée par les cellules tumorales elles-mêmes dans différents carcinomes (O-charoenrat et coll., 2001; Kerkela et coll., 2001; Mathew et coll., 2002). La MMP-11, pour sa part, a une activité plus faible sur les molécules de la MEC (Murphy et coll., 1993) mais est capable de cliver les serpines de façon plus efficace (Pei et coll., 1994). Elle possède un domaine de reconnaissance de la furine RX(R/K)R dans sa partie C-terminale du pro-peptide et pour cette raison est activée de manière intracellulaire (Pei et Weiss, 1995). Une isoforme intracellulaire de 40 kDa de la MMP-11 (β-stromélysine-3) a été identifiée dans des cellules en culture et dans le placenta mais sa fonction demeure méconnue (Luo et coll., 2002). L'expression de la MMP-11 est associée au remodelage durant l'embryogenèse, la réparation, l'involution des tissus et la métamorphose. La MMP-11 semble posséder une

fonction anti-apoptotique qui permet la survie des cellules cancéreuses (Boulay et coll., 2001; Wu et coll., 2001). Ainsi, la MMP-11 pourrait intervenir dans les étapes initiales du processus d'invasion (Rio, 2005).

IV.2.4. Les matrilysines.

Les matrilysines MMP-7 et MMP-26 ne possèdent pas de domaine hémopexine. La MMP-7 (matrilysine-1) dégrade à la fois des composants de la MEC (collagène de type IV, laminine, entactine, ténascines C, vitronectine, fibronectine, protéolgycanne) (Wilson et Matrisian, 1996) et des molécules présentes à la surface cellulaire telles que la pro-αdéfensine, le Fas-ligand, le pro-TNF-α et la cadhérine-E (Remy et Trespeuch, 2005). Présente dans certains tissus à caractère glandulaire exocrine comme la glande mammaire, la prostate, le foie ou le pancréas, elle intervient dans la réparation tissulaire et la différenciation osseuse mais est surtout remarquable par sa présence ubiquitaire dans divers cancers notamment digestifs. Notamment, la MMP-7 est impliquée dans la formation des tumeurs et dans la dégradation tissulaire consécutive à l'extravasation des cellules tumorales (Remy et Trespeuch, 2005). Contrairement aux autres MMPs principalement stromales, elle est synthétisée par les cellules épithéliales et participe à l'invasion et la production de métastases (Yamashita et coll., 1998). La MMP-26 (ou endometase, matrilysine-2) est exprimée dans les cellules normales (endomètre) et certains carcinomes (endomètre, prostate, sein) (Zhao et coll., 2003; Zhao et coll., 2004). Elle digère quelques molécules de la MEC (collagène de type IV, gélatine, fibronectine) mais, à la différence des autres MMPs, est stockée en grande quantité dans la cellule (Marchenko et coll., 2004).

IV.2.5. Les MMPs de type membranaire ou MT-MMPs.

Les MT-MMPs incluent 4 MMPs de type transmembranaire (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP) et deux MMPs ancrées au Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) (MT4-MMP et MT6-MMP). Elles contiennent toutes une séquence de reconnaissance par la furine RX(R/K)R dans la partie C-terminale du pro-peptide. Elles sont activées de manière intracellulaire et sont ancrées ensuite à la membrane. Toutes les MT-MMPs hormis la MT4-MMP (MMP-17) sont capables d'activer la MMP-2 (English et coll., 2000). La MT1-MMP possède également une activité collagénolytique sur les collagènes de type I, II et III (Ohuchi et coll., 1997; Tam et coll., 2002). La MT1-MMP induit l'invasion et la prolifération des cellules tumorales dans une matrice de collagène (Hotary et coll., 2003; Sabeh et coll., 2004). La forme tronquée de la MT1-MMP privée de sa partie C-terminale contenant la partie transmembranaire (MT1-MMP soluble) en est incapable. Le site catalytique de la protéine est responsable de son activité protéolytique (Ohuchi et coll., 1997). Cependant, son activité

collagénase est modulée par d'autres domaines de la protéine. Notamment, le domaine hémopexine dans la partie C-terminale permettrait de lier le collagène de type I et de dérouler la triple hélice pour le clivage (Tam et coll., 2002; Tam et coll., 2004). D'autre part, Anilkumar et coll. ont montré que l'unique cystéine présente dans le domaine cytoplasmique est palmitoylée de manière post-traductionnelle et cette modification est essentielle pour la fonction de la MT1-MMP dans la migration cellulaire (Anilkumar et coll., 2005). Une fois apparue à la surface cellulaire, la MT1-MMP est rapidement internalisée. La MT1-MMP (MMP-14) a été identifiée comme un activateur spécifique de la pro-MMP-2 dans les tumeurs et joue un rôle important dans l'invasion de la membrane basale par les cellules tumorales (Sato et coll., 1994). De par son rôle dans l'activation de la MMP-2, la MT1-MMP est associée à un certain nombre de cancers : des adénocarcinomes de sein, des cancers broncho-pulmonaires et des cancers cervicaux (Gilles et coll., 1996; Nawrocki et coll., 1997; Polette et coll., 1997; Polette et Birembaut, 1998). En outre, la MT1-MMP joue un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale (Sounni et coll., 2002).

IV.2.6. Autres MMPs.

Sept MMPs ne sont référencées dans aucun des sous-groupes précédents. Parmi elles, les MMP-12, -20 et -27 ont des structures et des localisations chromosomiques identiques à celles des stromélysines. La métalloélastase (MMP-12) est exprimée majoritairement par les macrophages mais est trouvée également dans les chondrocytes hypertrophiés (Kerkela et coll., 2001b) et les ostéoclastes (Hou et coll., 2004). La MMP-12 digère l'élastine et de nombreuses molécules de la MEC. Enfin, elle joue un rôle important dans la migration des macrophages (Shipley et coll., 1996). La MMP-19 digère des éléments de la MEC et de la membrane basale (Stracke et coll., 2000). Egalement appelée RASI (Rheumatoid arthritis Synovial Inflammation), elle est trouvée dans les lymphocytes et le plasma de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de lupus érythémateux (Sedlacek et coll., 1998). Elle est également exprimée dans des kératinocytes en prolifération lors de la cicatrisation (Sadowski et coll., 2003). L'énamelysine (MMP-20) est exprimée dans l'émail néo-synthétisé des dents et digère l'amélogénine (Ryu et coll., 1999). La MMP-21 a été découverte à l'origine chez le Xénope (Yang et coll., 1997) et plus récemment chez la souris et l'homme (Marchenko et coll., 2003). Elle est exprimée invariablement dans les tissus foetaux et adultes ainsi que dans les cellules de carcinomes squameux et basaux (Ahokas et coll., 2003). Elle digère la gélatine mais aucun autre substrat de la MEC n'a encore été identifié. La MMP-23 est unique puisque c'est la seule MMP possédant un domaine de type Ig riche en cystéine à la place du domaine hémopexine (Velasco et coll., 1999). Elle a tout d'abord été considérée comme de type membranaire mais le pro-domaine contenant le

domaine transmembranaire est clivé par une convertase (Pei et coll., 2000). La MMP-27 a été trouvée pour la première fois dans les fibroblastes d'embryon de poulet (Yang et Kurkinen, 1998). La MMP-27 de poulet digère la gélatine et la caséine, et provoque une autolyse de l'enzyme. Peu de choses sont encore connues sur son activité chez les mammifères. L'épilysine (MMP-28) est exprimée dans de nombreux tissus tels que le poumon, le coeur, le tractus gastro-intestinal et le testicule. Elle pourrait participer à la réparation quand elle est exprimée par les kératinocytes basaux de la peau (Saarialho-Kere et coll., 2002). On la retrouve en grande quantité dans le cartilage de patients atteints d'arthrite osseuse (Kevorkian et coll., 2004) et de polyarthrite rhumatoïde (Momohara et coll., 2004). Les MMP-21, -23 et -28 ont une séquence de reconnaissance à la furine avant le domaine catalytique et sont donc activées de manière intracellulaire et secrétées sous forme d'enzymes actives.

IV.3. Mécanisme d'activation et de régulation des MMPs.

IV.3.1. Régulation transcriptionnelle des MMPs.

IV.3.1.1. Généralités.

Les promoteurs des gènes des MMPs sont sous le contrôle de facteurs de croissance, de cytokines et de promoteurs de tumeur par l'intermédiaire de voies de transduction intracellulaires. Les différentes voies aboutissent à la liaison de facteurs de transcription, activateurs ou répresseurs, sur des séquences spécifiques présentes au niveau des promoteurs des gènes des MMPs. Les sites de liaison de ces facteurs de transcription et leur identité a fait l'objet de plusieurs études. Une représentation schématique des régions promotrices est proposée au niveau de la figure 17. Deux éléments majeurs agissant en cis sont trouvés dans la majorité des promoteurs des MMPs : le site AP-1 (activator protein-1) et le site PEA-3 (polyoma enhancer A binding protein-3). AP-1 et PEA-3 interagissent respectivement avec les familles de facteurs de transcription fos/Jun et Ets. Il existe également d'autres éléments présents individuellement dans les promoteurs des MMPs. Ainsi, les promoteurs de la MMP-1, la MMP-7, la MMP-13 et la MT1-MMP ont tous un ou plusieurs éléments inhibant le TGF-\beta (TIEs) sur lesquels peuvent se lier les facteurs de transcriptions Smad (Lohi et coll., 2000). Les promoteurs des MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP contiennent des boîtes GC et lient le facteur de transcription Sp1 (Benbow et Brinckerhoff, 1997; Lohi et coll., 2000). De plus, le promoteur de la MMP-9 possède un site de liaison du NF-κB (nuclear factor-κB) (Westermarck et Kahari, 1999). La MMP-1 et la MMP-13 ont également été décrites comme répondant au facteur de transcription NF-kB (Vincenti et Brinckerhoff, 2002). Certaines MMPs, dont la MMP-7 et la MT1-MMP, possédent au moins un site de

liaison du facteur de transcription Tcf-4 et constituent ainsi des cibles du complexe de transcription caténine-β/Tcf (Brabletz et coll., 1999; Takahashi et coll., 2002). La combinaison des éléments se liant en *cis* ainsi que les interactions avec des facteurs de transactivation permettent une régulation spatiale et temporelle de l'expression des MMPs.

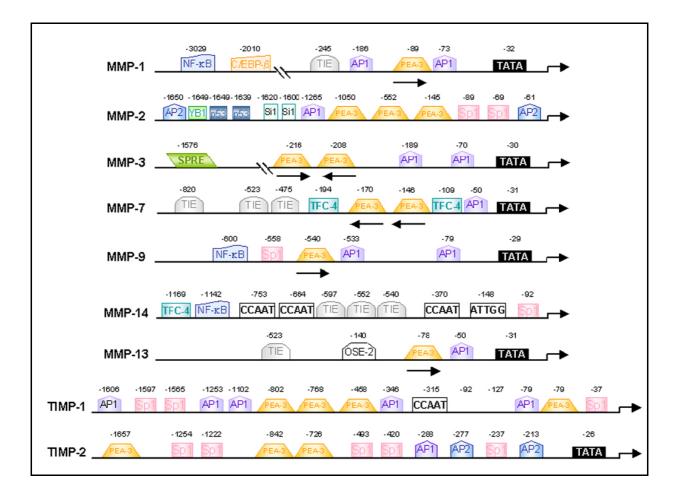


Figure 17: Localisation des éléments *cis* liant des facteurs de transcription dans les promoteurs des MMPs. C/EBP-h, CCAAT enhancer-binding protein; TIE, TGF-β inhibitory element; AP1, site de liaison de AP-1; PEA-3, polyoma enhancer A binding protein-3; OSE-2, osteoblastic *cis*-acting element; TATA, boîte TATA; AP2, site de liaison de AP-2; Sil, silencer; Sp1, site de liaison de Sp-1; NF-κB, site de liaison NF-κB; CCAAT, boîte CCAAT; Tcf-4, site de liaison du Tcf-4; SPRE, stromelysin-1 PDGF-responsive element. Modifié d'après (Deschamps et Spinale, 2006).

IV.3.1.2. Régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP.

Régulation transcriptionnelle de la MT1-MMP : La régulation du gène de la MT1-MMP semble particulièrement singulière. In vitro, elle est exprimée de manière constitutive par différents types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules enothéliales, et les cellules de muscle squelettique, et son expression est uniquement augmentée par le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) et le TNF-α, et diminuée par le dexamethasone (Lohi et Keski-Oja, 1995; Lohi et coll., 1996). De plus, l'expression de la MT1-MMP est augmentée en présence de la concanavaline A. L'expression de la MT1-MMP est également régulée par des interactions MEC-cytosquelette dans des fibroblastes lors de leur culture en gel 3D de

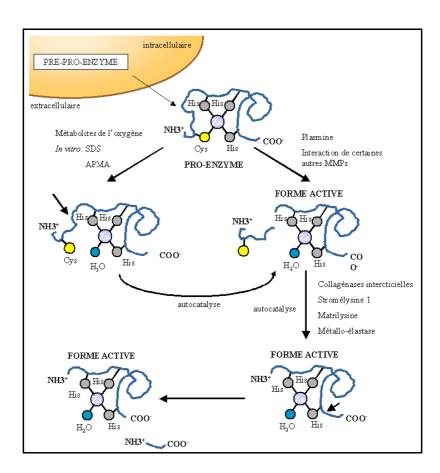
collagène, d'étirement mécanique ou en présence de cytochalasine D (Ailenberg et Silverman, 1996; Gilles et coll., 1997; Tyagi et coll., 1998). Le promoteur de la MT1-MMP ne contient pas de boîte TATA mais on constate la présence de séquences consensus CCAAT ou ATTGG. L'unique site de liaison de facteur de transcription présent est un site Sp1. Ce site est notamment essentiel à l'activité basale du promoteur de la MT1-MMP (Seiki, 2003). Le facteur de transcritpion Egr-1, en se fixant à sa séquence de liaison, assure la transcription de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales cultivées en gel de collagène (Haas et coll., 1999). Trois séquences avec une haute homologie pour l'élément TIE sont également trouvées dans ce promoteur. En amont de ces sites, on trouve un élément répondant à v-src qui permet l'induction de l'expression du gène de la MT1-MMP dans les cellules MDCK transformées par v-src (Cha et coll., 2000). La voie des MAPK semble également être impliquée dans la régulation de la MT1-MMP par la cadhérine-E (Ara et coll., 2000). La MT1-MMP qui contient un site de liaison au Tcf dans son promoteur est une cible du complexe caténineβ/Tcf-4. De manière intéressante, le CD44 et la laminine γ2 constituent également des cibles de ce complexe alors que tous deux coopèrent avec la MT1-MMP pour induire la migration (Koshikawa et coll., 2000; Kajita et coll., 2001). Récemment, il a été montré que la protéine ZO-1 des jonctions serrées, une fois délocalisée dans le cytoplasme, peut réguler le promoteur de la MT1-MMP en mettant en jeu l'activité transcriptionnelle des complexes caténine-β / Tcf (Polette et coll., 2005).

IV.3.2. Activation des MMPs.

IV.3.2.1. Mécanisme généraux.

La plupart des MMPs est sécrétée sous forme de zymogène et est activée dans l'espace extracellulaire (Figure 18). L'activation de ces zymogènes constitue une étape de régulation importante de l'activité des MMPs. La présence d'une région «leurre» dans le propeptide permet aux protéinases présentes dans les tissus ou le plasma ou d'origine bactérienne d'activer les pro-MMPs. Le clivage de cette région «leurre» enlève seulement une partie du pro-domaine et doit être complété par l'action d'autres MMPs actives pour ôter le pro-domaine entièrement (Nagase et coll., 1990). De nombreuses MMPs peuvent cliver *in vitro* le pro-domaine d'autres MMPs mais les mécanismes d'activation *in vivo* pour la majorité des MMPs restent peu clairs. Dans des systèmes expérimentaux, la plasmine a été décrite comme activant un grand nombre de MMPs latentes (Mignatti et Rifkin, 1996; DeClerck et Laug, 1996). En se fixant sur son récepteur cellulaire, l'urokinase-type plasminogen activator (uPA) permet l'activation du plasminogène en plasmine à la surface de la cellule, et ainsi une activation rapide des pro-MMPs (Kirchheimer et Remold, 1989). L'uPA est exprimé par de

nombreux types cellulaires impliqués dans le remodelage tissulaire, et son inhibition *in vitro* réduit significativement la dégradation matricielle. L'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, le PAI-1 (type-1 plasminogen activator inhibitor), a un effet inhibiteur sur l'uPA et constitue donc le contrepoids de la cascade d'activation des MMPs par la plasmine, et donc de l'activité métalloprotéasique matricielle. Les niveaux ultérieurs d'activation des MMPs constituent une boucle de rétrocontrôle, au cours de laquelle les MMPs sont capables de s'activer mutuellement et de s'auto-activer. Ainsi, la MMP-1 peut activer la MMP-2 latente. La forme latente de la MMP-13 pouvant être activée par la MT1-MMP, la MMP-3, la MMP-10 et la MMP-12 peut activer à son tour les formes latentes de la MMP-2 et de la MMP-9 (Knauper et coll., 1996). Néanmoins, le mécanisme d'activation le mieux connu est celui de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP. Certaines MMPs peuvent être activées au sein de la cellule, avant leur adressage. C'est en particulier le cas de plusieurs MT-MMPs qui ont une séquence spécifique RRKR dans leur prodomaine, reconnue par les furines, une famille de sérine protéinases.



<u>Figure 18:</u> Activation extracellulaire des MMPs sécrétées. Les pro-MMPs sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs qui peuvent être activés par des protéinases ou par des agents non protéolytiques. L'activation par des protéinases est assurée par le clivage de la région leurre. L'activation complète est achevée par la libération complète du pro-peptide par auto-catalyse. L'activation chimique est liée au switch des cystéines qui induit l'activation partielle des MMPs. Une dernière phase d'autocatalyse permet d'ôter le fragment restant du pro-peptide.

IV.3.2.2. Activation de la proMMP-2.

La pro-MMP-2 forme un complexe avec le TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2) via l'interaction entre son domaine hémopexine et le domaine C terminal de l'inhibiteur. La formation de ce complexe est essentielle à l'activation de la pro-MMP-2 par la MT1-MMP à la surface cellulaire (Itoh et Seiki, 2006). Le complexe se lie à une molécule de MT1-MMP active par le domaine N terminal inhibiteur du TIMP-2, ce qui a pour conséquence d'orienter la pro-MMP-2 face à une autre molécule de MT1-MMP. Les deux molécules de MT1-MMP interagissent mutuellement à la surface cellulaire par leur domaine hémopexine ce qui forme un complexe d'activation tétramérique. Une molécule de MT1-MMP agit comme récepteur du complexe pro-MMP-2-TIMP-2 et l'autre comme activateur de la pro-MMP-2. Un excès de TIMP-2 prévient le processus d'activation par inhibition de la seconde molécule de MT1-MMP. La pro-MMP-2 peut former également un complexe avec le TIMP-3 et le TIMP-4 d'une manière similaire. Le complexe pro-MMP-2-TIMP-4 interagit avec la MT1-MMP, mais ce complexe n'est pas productif quant à l'activation de la MMP-2 (Bigg et coll., 2001). La fonction biologique du complexe pro-MMP-2-TIMP-3 n'est pas connue. L'intégrine ανβ3 semble également participer à l'activation de la MMP-2 par la MT1-MMP. Il a été mis en évidence que la MT1-MMP peut activer l'intégrine $\alpha_v \beta_3$ par clivage protéolytique. Cette intégrine, une fois active, peut alors se lier à la forme intermédiaire de la MMP-2 pour compléter son activation par autocatalyse. Cette liaison permet également de séquestrer la MMP-2 sous forme active au niveau des invadopodes (Deryugina et coll., 2000; Deryugina et coll., 2001). Le mécanisme d'activation de la proMMP-2 est schématisé au niveau de la figure 19.

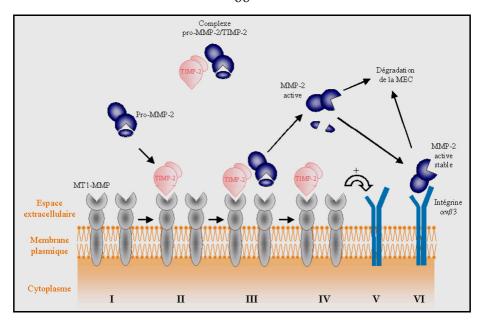


Figure 19: Processus d'activation de la pro-MMP-2. I. Les molécules de MT1-MMP forment des dimères ou des multimères à la surface cellulaire par interaction de leurs domaines homéopexine. II. Le TIMP-2 forme un complexe avec une première molécule de MT1-MMP. III. La pro-MMP-2 complexée au TIMP-2 lié quant à lui à la MT1-MMP est clivée par une seconde molécule de MT1-MMP adjacente. IV. La MMP-2 active est libérée et peut dégrader la MEC. V. L'intégrine ανβ3 est activée par la MT1-MMP et peut ainsi se lier à la MMP-2. VI. La liaison de la MMP-2 à l'intégrine ανβ3 provoque un changement de conformation stabilisant l'enzyme sous sa forme active après protéolyse. La concentration en TIMP-2 dans l'espace intracellulaire est critique pour assurer l'activation de la pro-MMP-2. Si le taux de TIMP-2 est trop élevé, il va saturer les molécules de MT1-MMP et de MMP-2 libres.

IV.3.3. Inhibition de l'activité des MMPs.

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

IV.3.3.1. Les TIMPs.

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

TIMP-1 : Le TIMP-1 est une petite protéine de 28 kDa riche en mannose dont le gène est localisé sur le chromosome 11 chez l'homme. Elle contient deux sites de

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

TIMP-2: Le TIMP-2 est une petite protéine de 21 kDa dont le gène est localisé sur le chromosome 17 chez l'homme. Le TIMP-2 présente 40% d'homologie avec la séquence en acides aminés du TIMP-1 (Stetler-Stevenson et coll., 1989). Son expression est majoritairement constitutive. Le TIMP-2 est capable d'inhiber un grand nombre de MMPs. Cependant, il a été rapporté comme inhibant préférentiellement la MMP-2 en formant un complexe stoechiométrique 1:1 avec celle-ci (Goldberg et coll., 1989; Kleiner, Jr. et coll., 1992). Le complexe pro-MMP-2/TIMP-2 stabilise la MMP-2 en prévenant l'auto-activation de la MMP-2.

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

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

Les TIMPs sont des protéines sécrétées mais peuvent être également localisés à la surface cellulaire en association avec des protéines liées à la membrane. Ainsi, les TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4 peuvent se lier à la MT1-MMP. Le TIMP-3 est séquestré au niveau de la

MEC par liaison à des protéoglycannes contenant du sulfate d'héparanne ou potentiellement du sulfate de chondroïtine (Yu et coll., 2000). Les TIMPs peuvent jouer un rôle dans les processus biologiques n'impliquant pas leur activité anti-protéasique tels que la croissance et la survie cellulaire. Le TIMP-1 a été identifié tout d'abord comme un activateur de la voie érythrocytaire (Gasson et coll., 1985) et un agent stimulant la croissance de certaines lignées cellulaires (Bertaux et coll., 1991; Hayakawa et coll., 1992). Le TIMP-2 est également un activateur de la voie érythrocytaire (Stetler-Stevenson et coll., 1992) et stimule la croissance des cellules de lymphome (Hayakawa et coll., 1994) et des fibroblastes (Corcoran et Stetler-Stevenson, 1995). Plus récemment, Sobue et coll. ont montré que le TIMP-1 et le TIMP-2 stimulent la résorption osseuse par les ostéoclastes via les voies tyrosine kinase et MAP kinase (Sobue et coll., 2001). Le TIMP-1 est capable de se lier à la surface cellulaire des cellules de carcinome mammaire MCF-7 et de subir une translocation dans le noyau (Ritter et coll., 1999) bien qu'aucun récepteur ni de fonction particulière du TIMP-1 nucléaire ne soient encore identifiés. L'accumulation de TIMP-1 dans les noyaux de fibroblastes gingivaux a été montrée comme étant maximale en phase S du cycle cellulaire (Li et coll., 1995). Le TIMP-2 semble agir de manière spécifique par des récepteurs de haute affinité qui sont liés à des protéines G et aux voies de l'AMPc (Corcoran et Stetler-Stevenson, 1995). Des taux élevés de TIMP-3 favorisent l'apoptose dans de nombreux types cellulaires in vitro et in vivo (Ahonen et coll., 1998; Baker et coll., 1999; Bond et coll., 2000). Lors du développement, les taux élevés de TIMP-3 interviennent dans les cellules utérines durant l'implantation de l'embryon et sont liés à la survie de ces cellules différenciées (Alexander et coll., 1996). Le TIMP-4 est le promoteur de l'apoptose dans les fibroblastes cardiaques mais inhibe l'apoptose dans les cellules cancéreuses mammaires in vitro et dans les tumeurs mammaires in vivo. Il a été montré que l'expression des TIMPs peut également être associé à la progression tumorale. En effet, la surexpression du TIMP-1 et du TIMP-2 est observée dans des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt (Stetler-Stevenson et coll., 1997). Dans ce même type de lignées, l'expression élevée de TIMP-1 est corrélée à l'expression accrue de marqueurs de survie et le TIMP-1 confère une résistance à l'apoptose induite par le ligand Fas (Guedez et coll., 1998a; Guedez et coll., 1998b). De façon contradictoire, le TIMP-2 peut, à la fois, promouvoir l'apoptose dans un modèle in vivo de cancer colorectal (Brand et coll., 2000) mais aussi protèger les cellules de mélanome B16 de ce processus (Valente et coll., 1998). Le TIMP-4 est lui surexprimé dans les cellules de carcinome mammaire et favorise la croissance tumorale en inhibant l'apoptose (Jiang et coll., 2001). Pour sa part, le TIMP-3 supprime efficacement l'invasion et induit l'apoptose de cellules tumorales d'origine diverses (Ahonen et coll., 1998; Baker et coll., 1999). Comme l'indiquent ces différents travaux, les TIMPs induisent des effets divergents sur la mort cellulaire programmée des cellules tumorales.

IV.3.3.2. La macroglobuline- α_{2}

La macroglobuline- α_2 humaine est une glycoprotéine plasmatique de 772 kDa contenant 4 sous-unités identiques de 180 kDa. Elle inhibe la plupart des protéinases (comme les MMPs et les ADAMs) en formant un complexe qui les retient et qui va rapidement être éliminé par fixation sur un récepteur LDL-RP (Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein) puis endocytose et dégradation (Moestrup et coll., 1993). Il a été montré que la MMP-13 s'associe avec le récepteur LDL-RP sur les cellules ostéoblastiques menant à son internalisation (Barmina et coll., 1999). Hahn-Dantona et coll. ont montré que la MMP-9 complexée au TIMP-1 peut être internalisée par liaison au récepteur LDL-RP (Hahn-Dantona et coll., 2001). Enfin, la macroglobuline- α_2 peut exercer des fonctions sans relation avec son rôle d'inhibiteur de protéinases notamment en liant le TGF- β et des cytokines (Armstrong et Quigley, 1999).

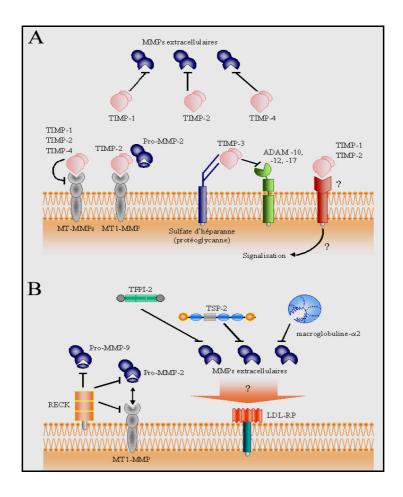
IV.3.3.3. Autres inhibiteurs connus.

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

La thrombospondine-2 (TSP-2) constitue un autre inhibiteur de MMPs. Elle peut réguler la MMP-2 par la formation d'un complexe qui facilite son endocytose par le récepteur scavenger. De façon similaire, la thrombospondine-1 (TSP-1) peut inhiber l'activation de la pro-MMP-2 et de la pro-MMP-9 et moduler la production de MMP-2 (Egeblad et Werb, 2002). Un peptide contenu dans le domaine NC1 du collagène de type IV et appelé tumstatine est capable d'inhiber les MMP-2, -9, -13 et la MT1-MMP (Pasco et coll., 2004).

RECK (Reversion inducing Cysteine riche protein with Kasal motifs) constitue une glycoprotéine de 110 kDa qui contient des domaines du type des inhibiteurs des sérines protéinases et s'associe avec la membrane cellulaire via des ancrages au GPI (Takahashi et coll., 1998). RECK est exprimé naturellement dans les tissus humains mais semble surexprimés dans de nombreuses lignées cellulaires dérivées de tumeurs. La surexpression de RECK dans de telles lignées induit la répression de la MMP-9 au niveau transcriptionnel ainsi

que la baisse du potentiel invasif. RECK inhibe également l'activation cellulaire de la pro-MMP-2 (Butler et coll., 1998). RECK pourrait posséder d'autres fonctions mais ceci reste encore à déterminer. L'ensemble des facteurs régulant l'activité des MMPs est schématisé au niveau de la figure 20.



<u>Figure 20:</u> Inhibiteurs des MMPs dans l'environnement péricellulaire. A. Inhibiteurs tissulaires des MMPs (TIMPs). B. Autres inhibiteurs. RECK, reversion inducing cysteine riche protein with Kasal motifs; LDL-RP, lipoprotein receptor-related protein; TSP-2, thrombospondin-2; TFPI-2, tissue factor pathway inhibitor-2. Modifiée d'après (D'après Baker et coll., 2002).

IV.4. Rôles des MMPs dans la progression tumorale.

IV.4.1. Généralités.

Les MMPs sont impliquées dans le remodelage de la MEC et par conséquent dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques comme le développement embryonnaire, la cicatrisation, l'angiogenèse, l'ossification, le cycle menstruel, le cycle pileux, la formation du corps jaune, la progression tumorale...De plus, l'activité des MMPs permet de moduler la migration cellulaire et de modifier la signalisation inhérente à la MEC. La dégradation de la MEC par les MMPs entraîne aussi la libération et la modulation de l'activité des différents facteurs de croissance et inhibiteurs de croissances lié à la MEC soit

par clivage direct de ces facteurs, soit par le biais des liaisons à la MEC ou soit par la modulation de l'activité des antagonistes de ces molécules. Les MMPs dégradent en fait littéralement toutes les protéines de la MEC, les différents substrats de ces enzymes se recoupant d'une manière importante (Tableau VI et VI bis).

MMPs responsables	Substrats clivés	Effets biologiques observés
•	Collagène de type I	Migration des kératinocytes et ré-épithélialisation
MMP-1	Non identifié	Agrégation plaquettaire
	PAR-1	Activation de PAR1
	Protéoglycanne à sulfate de chondroïtine	Croissance neurale
MMP-2	Non identifié	Différenciation des cellules mésenchymateuses avec phénotype inflammatoire
1,11,111 2	Endothéline	Génération de vasoconstricteur
	Adromédulline	Conversion de vasodilatateur en vasoconstricteur
	SDF-1α	Apoptose neuronale menant à la neurodégénérescence
	Membrane basale	Apoptose des cellules épithéliales mammaires
MMP-3	Membrane basale	Formation alvéolaire épithéliale mammaire
IVIIVIP-3	Cadhérine-E	TEM (cellules épithéliales mammaires)
	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine
	Fibronectine	Différenciation des adipocytes
	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine
MMP-7	Fas ligand	Apoptose assurée par le récepteur Fas
IVIIVIP-/	Pro-TNF-α	Pro-inflammatoire
	Ligand RANK	Activation des ostéoclastes
	EGF liant l'héparine	Vasoconstriction et croissance cellulaire
	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine
	ICAM-1	Résistance des cellules tumorales
	Précurseur de TGF-β	Biodisponibilité du TGF-β
MMP-9	Collagène de type IV	Néovascularisation du thymus
	Galactine-3	Apoptose des chondrocytes et recrutement des ostéoclastes
	IL-2Rα	Réponse à l'IL-2 réduite

Tableau VI: Liste des substrats matriciels et non matriciels des MMPs.

MMPs responsables	Substrats clivés	Effets biologiques observés
MMP-11	IGFBP-1	Augmentation de la biodisponibilité de IGF-1
		et prolifération cellulaire
MMP-12	Plasminogène	Génération de fragment de type angiostatine
MMP-13	Collagène de type I	Activation des ostéoclastes
	Collagène de type I	Tubulogenèse du rein
	CD44	Migration cellulaire
MT1-MMP	Lamine 5β3	Migration cellulaire
	MUC-1	Attachement de l'embryon à l'épithélium utérin
Collagènases	Collagène de type I	Apoptose
MMP-1, -2 et -3	Fibronectine	Migration cellulaire
MMP-1, -2, -3, -7 et -19	IGFBP-3	Augmentation de la biodisponibilité de IGF-1 et prolifération cellulaire
MMP-1, -2 et -9	Dégradation de l'IL-1β	Anti-inflammatoire
MMP-1, -2,-3, -13 et MT1-MMP	MCP-3	Anti-inflammatoire
MMP-1, -3 et -9	Transformation de l'IL-1β	Pro-inflammatoire
MMP-2, -3 et -7	Décorine	Augmentation de la biodisponibilité du TGF- β
MMP-2, -3, -7, -9 et -13	BM-40 (SPARC/Ostéonectine)	Augmentation de l'affinité au collagène
MMP-2, MT1-MMP, MMP-19	Chaîne γ2 de la Laminine 5	Migration des cellules épithéliales
MMP-3, MMP-7	Cadhérine-E	Rupture de l'agrégation cellulaire et invasion
MMP-3 et -13	Perlécane	Libération de FGFb
MT1-MMP et MT3- MMP	Transglutaminase	Adhérence cellulaire réduite et extension
MMD-	IGFBP-5	Augmentation de la biodisponibilité de IGF-1 et prolifération cellulaire
MMPs	Collagène de type XVIII	Génération de fragment de type endostatine
	CTGF	Activation du VEGF

Tableau VI bis: Liste des substrats matriciels et non matriciels des MMPs (suite).

IV.4.2. Rôles des MMPs dans la progression tumorale.

Le rôle des MMPs dans la progression tumorale a fait l'objet de recherches intensives depuis plus de deux décennies. Un rôle important fut initialement attribué à la capacité des MMPs de dégrader la matrice extracellulaire, favorisant ainsi l'invasion tumorale. Il est maintenant clairement établi que certaines MMPs ont une activité protéolytique également dirigée contre des protéines non matricielles lesquelles jouent un rôle crucial dans plusieurs autres étapes de la progression tumorale (Figure 21).

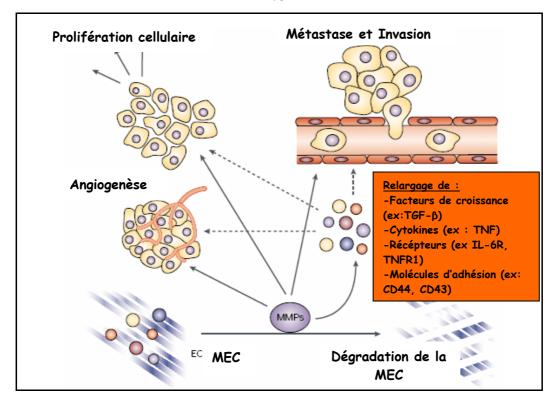


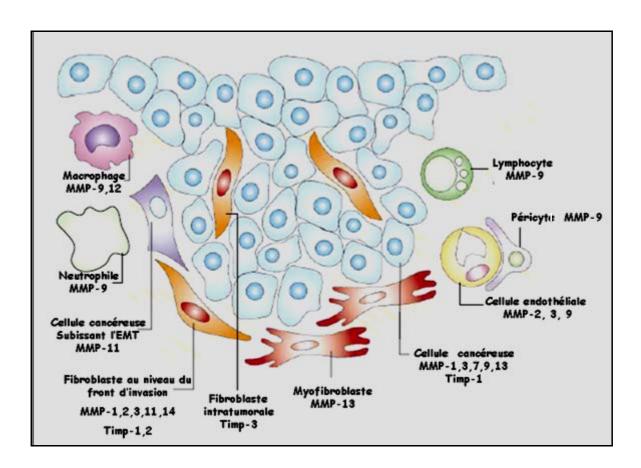
Figure 21: Rôle des MMPs dans la progression tumorale. (D'après Rao, 2003)

L'état actuel des connaissances attribue de multiples rôles aux MMPs dans le cancer. Certains de ces effets sont protecteurs pour l'organisme, comme par exemple :

- la libération du TGF-ß qui inhibe la croissance tumorale;
- la génération d'endostatine et d'angiostatine (molécules anti-angiogéniques) par la dégradation du plasminogène et du collagène XVIII;
- la modulation des signaux apoptotiques des intégrines;
- l'inactivation de la chimiokine CXCL12 (molécule pro-métastatique);
- promotion de la différenciation cellulaire (mécanisme inconnu).

La plupart des effets des MMPs sont par contre pro-tumoraux. Les MMPs agissent au niveau de la croissance tumorale, de la promotion de la survie cellulaire, de l'angiogenèse, de l'invasivité, de la transition épithéliale mésenchymateuse et de la diminution de l'immunité anti-tumorale par l'intermédiaire de nombreuses protéines (Tableau VI et VI bis). Paradoxalement, certaines de ces molécules telles le TGF-\(\beta\) sont impliquées à la fois dans les effets pro-tumoraux et dans les effets anti-tumoraux. Les métastases, contrairement aux tumeurs primaires, sont responsables de la plupart des décès. Fort de ce constat, il apparaît que l'utilisation de thérapies basées sur le blocage de leur formation offre une approche de premier ordre dans le cadre de la thérapie anti-tumorale (Chambers et coll., 2002). Dans ce but, la compréhension détaillée des mécanismes complexes impliqués dans l'invasion tumorale est requise. La participation du stroma à un tel phénomène, et particulièrement des

cellules stromales que sont les fibroblastes, est fondamentale. L'invasion tumorale est un évènement multifactoriel dans lequel la motilité cellulaire est associée à une protéolyse matricielle et implique des interactions entre les cellules tumorales et la MEC. Durant ce processus, les cellules malignes se détachent de la tumeur primaire, migrent et envahissent les tissus en passant au travers de barrières structurales, la MEC stromale et les membranes basales (Johansson et coll., 2000). Elles se retrouvent dans la circulation sanguine et créent des métastases dans des organes distants (Chambers et coll., 2002). Les MMPs jouent un rôle important dans ce processus aux différentes étapes que sont la croissance tumorale, l'invasion et la formation des métastases. Les contributions des MMPs dans ces différentes étapes sont illustrées au niveau de la figure 22.



<u>Figure 22:</u> Expression des MMPs et des TIMPs lors de l'invasion tumorale. De nombreux types cellulaires participent au développement tumoral en sécrétant différents types de MMPs (D'après Egeblad et coll., 2002).

IV.4.2.1. Perte d'adhérence.

Certaines MMPs, en particulier la MMP-3 et la MMP-7, ont tout d'abord été impliquées dans la perte d'adhérence cellulaire et la modification phénotypique des cellules épithéliales qui se produisent durant les premiers stades du développement d'une tumeur carcinomateuse. Ces enzymes peuvent en effet dégrader la cadhérine E et, de ce fait, rompre les adhérences intercellulaires des épithéliums et stimuler l'expression de gènes promoteurs

du cancer (proto oncogènes) en favorisant le transfert de la β -caténine à partir de la cadhérine E vers le noyau cellulaire.

IV.4.2. 2. Invasion.

L'invasion locale est la seconde étape de la progression tumorale dans laquelle ces protéinases sont impliquées. Plusieurs MMPs, en particulier les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) ont une activité protéolytique dirigée contre les protéines de la membrane basale (collagènes de type IV et V) et d'autres MMPs, comme la MMP-1 et la MT1-MMP, contre les collagènes interstitiels (collagènes de type I, II ou III) présent dans le tissu conjonctif qui délimite les cancers invasifs. Ce rôle des MMPs dans l'invasion tumorale a été parmi les mieux étudiés. Il a été démontré que les MMPs présentes au niveau du front invasif sont souvent produites non pas par les cellules tumorales mais par les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages) stimulées spécifiquement par les cellules cancéreuses.

IV.4.2. 3. Prolifération.

Une troisième étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs ont été impliquées est la prolifération des cellules tumorales. Ce rôle inattendu fut initialement suspecté suite à des observations montrant l'absence des effets des inhibiteurs de MMPs sur la croissance tumorale. Les mécanismes à l'origine de cet effet sont multiples et complexes. Ils impliquent tout d'abord les facteurs de croissance, les cytokines et leurs récepteurs. Plusieurs MMPs comme la stromélysine sont capables de digérer des protéines extracellulaires qui séquestrent les facteurs de croissance comme c'est le cas de l'IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein 3) qui se lie à l'IGF II (insulin-like growth factor II) ou du perlécane qui séquestre le FGFb (basic fibroblast growth factor). D'autres MMPs peuvent aussi augmenter l'activité biologique de cytokines et de facteurs de croissance comme cela a été démontré pour l'interleukine- 8 dont l'activité augmente 10 fois après activation par la MMP-9. Enfin, par leur capacité à cliver des récepteurs membranaires de cytokines (activité « libératrice ») et de ce fait diminuer leurs effets biologiques, plusieurs MMPs ont paradoxalement un effet anti-prolifératif. Les MMPs modulent également la prolifération des cellules tumorales à travers les modifications structurales que subissent les protéines de la matrice extracellulaire suite à leur protéolyse. De la même manière, l'exposition de cellules de mélanome à du collagène protéolysé leur permet de se protéger de l'apoptose. Enfin, il a récemment été mis en évidence que la MMP-11 diminuait l'apoptose des cellules tumorales par un mécanisme encore indéterminé.

IV.4.2.4. Angiogenèse.

L'angiogenèse est la quatrième étape de la progression tumorale dans laquelle les MMPs sont impliquées et où elles peuvent avoir un effet stimulateur ou inhibiteur. Plusieurs MMPs sont exprimées par les cellules endothéliales en réponse à un stimulus angiogénique et ces enzymes jouent un rôle important dans la tubulogénèse et la vascularisation des tumeurs. Certaines MMPs augmentent aussi la libération de facteurs angiogéniques comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) associé à la matrice extracellulaire. En revanche, les MMPs peuvent aussi avoir un effet négatif sur l'angiogenèse en produisant des facteurs antiangiogéniques à partir de molécules précurseurs. C'est le cas de l'angiostatine et de l'endostatine qui sont produites par les MMP-2, -7 et -9 ou la MMP-12 à partir de précurseurs comme le plasminogène et le collagène XVIII, respectivement.

IV.4.2.5. Intravasation, extravasation et croissance de tumeurs métastatiques.

Les MMPs jouent également un rôle dans le processus d'intravasation (passage de cellules tumorales du tissu vers le courant sanguin à travers l'endothélium). Il est postulé que cet effet provient de la capacité des MMPs à détruire la membrane basale qui entoure l'endothélium capillaire. L'implication des MMPs à ce titre est cependant tirée d'observations indirectes démontrant que des inhibiteurs de MMPs réduisent la formation de métastases spontanées à partir d'une tumeur primaire ou l'invasion d'une membrane basale reconstituée *in vitro*. Le rôle des MMPs dans l'extravasation (sortie des cellules tumorales du courant sanguin vers le tissu) est moins évident et controversé. Un groupe de chercheurs a notamment démontré que des inhibiteurs de MMPs étaient incapables d'inhiber la colonisation des poumons par des cellules tumorales injectées dans la circulation veineuse. Enfin, les MMPs pourraient aussi intervenir dans la croissance de tumeurs métastatiques. Cet effet des MMPs est complexe car il implique un effet sur l'angiogenèse et sur la prolifération cellulaire.

V. La MT1-MMP.

V.1. Généralité sur la MT1-MMP.

La MT1-MMP partage une structure de domaine commune avec les autres membres de la famille des MMPs, notamment un pré-propeptide (M1-R111), un domaine catalytique (Y112-G285), une région charnière (linker-1) (E286-I318), un domaine hemopexine (C319-C508), une région de liaison en tige (linker-2) (P509-S538), un domaine transmembranaire (A539-F562) et une queue cytoplasmique (R563-V582) (Sato et coll., 1994; Brinckerhoff et Matrisian, 2002; Seiki, 2003). Comme les autres MMPs, la MT1-MMP est produite sous forme de zymogène et nécessite donc une étape d'activation afin d'éliminer le propeptide (Nagase, 1997). La MT1-MMP possède un motif basique d'acides aminés (RRKR111) situé à la fin du propéptide et qui est clivé par la furine convertase (Sato et coll., 1996). Ainsi, l'activation de la MT1-MMP se déroule durant sa sécrétion dans le golgi (Mazzone et coll., 2004), et est exprimé à la surface des cellules sous sa forme active. La MT1-MMP peut dégrader un grand nombre des composés de la MEC comme le collagène de type I, II et III, la gélatine, la laminine 1 et 5, la fibronectine, la vitronectine, l'aggrécanne, la fibrine et le lumicane (d'Ortho et coll., 1997; Ohuchi et coll., 1997; Hiraoka et coll., 1998; Koshikawa et coll., 2000; Li et coll., 2004). La MT1-MMP est aussi capable d'activer la proMMP-2 (Sato et coll., 1994) et la proMMP-13 (Knauper et coll., 1996). Elle est Oglycosylée au niveau des résidus thréonine 291, 299 et/ou sérine 301 dans la région linker-1 et ces modifications semblent être essentielles pour l'activation de la proMMP-2 à la surface cellulaire (Wu et coll., 2004). Elle est aussi capable de cliver plusieurs protéines de surface comme CD44 (Kajita et coll., 2001), la transglutaminase (Belkin et coll., 2001), les intégrines de type α_v (Deryugina et coll., 2002) et le syndécanne-1 (Endo et coll., 2003).

V.2. La MT1-MMP dans l'angiogenèse.

La dégradation de la membrane basale est une étape nécessaire lors de la formation de nouveaux vaisseaux. Le rôle de plusieurs MMPs a été démontré dans les cellules endothéliales (ECs) et dans le contexte de l'angiogenèse. Plus particulièrement les gélatinases A et B, MMP-2 et -9, jouent un rôle dans la réponse angiogénique des ECs dans les modèles d'angiogenèse *in vivo* (Itoh et coll., 1998 ; Vu et coll., 1998). Ainsi, la MMP-9 joue un rôle crucial en synergie avec le MMP-2 lors du « switch » angiogénique nécessaire à la tumorogénèse comme il a pu être montré dans un modèle de cancer pancréatique. La MMP-9 agit en entraînant la libération du VEGF séquestré initialement au sein des protéoglycannes composant la matrice extracellulaire (Bergers et coll., 2000). Le rôle des autres MMPs dans

l'angiogenèse est tissu/organe dépendant. Par exemple, il a récemment été démontré que la MT3-MMP était préférentiellement impliqué dans la formation de nouveau capillaire dans l'endomètre (Plaisier et coll., 2004). La MT1-MMP, première MMPs identifié comme étant ancré à la membrane, est un élément clé dans la réponse angiogénique. Elle a été identifiée comme étant la principale enzyme responsable de la fibrinolyse (dégradation et remodelage d'une matrice de fibrine) durant les accidents vasculaire (Hiraoka et coll., 1998). L'utilisation de souris « invalidées» en MT1-MMP a confirmé le rôle essentiel de la MT1-MMP dans l'angiogenèse. En effet, ces souris montrent une désorganisation squelettique probablement due à un défaut de vascularisation du cartilage, un défaut de réponse à un stimulus proangiogénique comme le FGF-2, un défaut de formation de capillaires en réponse à des chémokines proangiogéniques, et un défaut de vascularisation des poumons. Plus récemment, le rôle de la MT1-MMP a été décrit dans le recrutement de cellules nécéssaire à l'angiogenèse (Lehti et coll., 2005; Filippov et coll., 2005). Ces données suggèrent que la MT1-MMP n'est pas indispensable au processus de vasculogénèse ni pour celui de l'embryogénèse, mais est nécessaire pour l'angiogenèse spécifique de certains tissus (cartilage, poumon) ou en réponse à certains stimuli (PDGF-B).

V.2.1. Rôle multiple de la MT1-MMP.

V.2.1.1. Activation de la proMMP-2.

L'activation de la proMMP-2 au niveau péricellulaire par un système multiprotéique (proMMP-2, MT1-MMP, TIMP-2, $\alpha_v \beta_3$) est à la genèse du mécanisme d'angiogenèse et de l'invasion de nombreuses cellules tumorales (Strongin et coll., 1995 ; Deryugina et coll., 2001). Différents travaux ont permis de comprendre le mode d'action de la MT1-MMP lors de l'activation de la proMMP-2. La MT1-MMP joue deux rôles distincts, elle se présente comme un récepteur de la proMMP-2 par l'intermédiaire du TIMP-2 et comme l'effecteur de la coupure enzymatique proprement dite (Butler et Coll., 1998). L'activation se déroule en deux étapes correspondant en fait à deux protéolyses successives du pro-domaine. L'activation de la proMMP-2 nécessite dans un premier temps la formation d'un complexe ternaire entre la MT1-MMP qui interagit avec le domaine N-terminal du TIMP-2 lequel par son domaine C-terminal fixe le domaine hémopexine de la proMMP-2. Dans un second temps, la proMMP-2 est clivée par une MT1-MMP adjacente conduisant à la formation d'une entité partiellement activée de la MMP-2 qui sera à son tour totalement activée par le clivage protéolytique soit par une MMP-2 mature, soit par d'autres types de protéinases (Deryugina et Coll., 2001). Par ailleurs, il a été montré que l'intégrine $\alpha_v \beta 3$ facilitait l'activation de la proMMP-2 en servant de plate forme pour des interactions autocatalytiques entre la MMP-2

partiellement activée et une MMP-2 mature (Brooks et Coll. 1996 ; Deryugina et Coll., 2001). Un autre modèle de l'activation impliquant la MT1-MMP et le TIMP-2 a été proposé. L'intégrine $\alpha\nu\beta3$ est capable de lier la MMP-2 (Brooks et Coll., 1996), et pourrait ainsi stabiliser celle-ci au niveau de la membrane plasmique de la cellule, permettant ensuite à une MT1-MMP d'activer la MMP-2 par protéolyse. Le TIMP-2 n'est pas cité dans ce travail; pour autant, la fraction de TIMP-2 non complexé à la MT1-MMP pourrait être impliqué dans cette activation et permettre l'inhibition de la MMP-2 pour ainsi réguler la forme active de la MMP-2 (Itho et coll., 1998). De façon récente, le rôle de l'intégrine $\alpha_{\nu}\beta3$ dans l'activation de la MMP-2 a été remis en cause, à partir du moment où cet hétérodimère ne serait pas capable de lier la métalloprotéinases sous sa proforme.

V.2.1.2. La dégradation de la MEC et l'invasion par les cellules endothéliales.

La MT1-MMP est nécessaire pour la dégradation de la fibrine notamment lors de la formation de nouveaux vaisseaux à l'intèrieur d'une matrice de collagène (Hiraoka et coll., 1998; Holmbeck et coll., 1999). De plus, un anticorps monoclonal anti-MT1-MMP altère l'invasion des cellules endothéliales humaines dans un gel de fibrine ou de collagène de type I (Galvez et coll., 2001). Enfin, des cellules MLEC (mouse lung endothelial cells) issus de souris invalidées MT1-MMP -/- montrent une déficience d'invasion comparativement aux cellules sauvages lors de l'invasion à travers un gel de matrigel démontrant ainsi l'importance de cette protéinase dans l'invasion par les cellules endothéliales (Oblander et coll., 2005).

V.2.1.3. La Migration de cellules endotheliales.

La MT1-MMP est nécessaire pour une migration endothéliale efficace sur divers composants de la MEC comme la gélatine, le collagène de type I, la fibronectine ou la vitronectine (Galvez et coll., 2001; Galvez et coll., 2002). Pour confirmer cette thèse, les cellules MLEC issues de souris invalidées MT1-MMP -/- migrent moins efficacement que les cellules sauvages (Galvez et coll., 2005). La MT1-MMP est aussi nécessaire lors de la migration en réponse à la sphingosine-1-phosphate dans les cellules endothéliales (Langlois et coll., 2004). Pour expliquer ces phénomènes, certains ont émis l'hypothèse que la MT1-MMP exposerait des sites cryptiques présents dans ses substrats naturels comme il a été démontré avec la laminine 5 dans les cellules tumorales (Koshikawa et coll., 2000).

V.2.1.4. Formation de capillaires.

La MT1-MMP est nécessaire pour la formation de capillaires. Ainsi des cellules endothéliales prétraitées avec un anticorps bloquant dirigé contre le domaine catalytique la MT1-MMP ou traité par les siARN entraînent une désorganisation de la formation de

capillaires formés par les cellules endothéliales et induite par des chémokine proangiogénique ou la sphingosine-1-phosphatase (Langlois et coll., 2004).

V.2.1.5. Recrutement d'autres cellules.

La formation de nouveaux capillaires se termine par le recrutement de cellules indispensables à la stabilité des néovaisseaux, comme les cellules péricytes. Le système PDGF/PDGF-R est essentiel à ce processus (Lehti et coll., 2005).

V.2.1.6. Autres fonctions.

La MT1-MMP est également impliquée dans la régulation de l'expression du VEGF-A et dans la prolifération des cellules tumorales (Sounni et coll., 2004 ; Golubkov et coll., 2005). Elle participe aussi à d'autres processus notamment la maintenance du lit vasculaire via l'apoptose de cellules endothéliales.

V.2.2. Régulation multiples de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales.

La MT1-MMP joue un rôle crucial dans différentes étapes de l'angiogenèse. C'est pourquoi, son activité doit être strictement régulée dans les cellules endothéliales afin de pouvoir contrôler et organiser ce processus physiologique et ainsi éviter une protéolyse excessive de la MEC ou de composants non matricielles.

V.2.2.1. Régulation de l'expression.

Le promoteur de la MT1-MMP ne possède pas de boite TATA. L'adhésion des cellules endothéliales sur une matrice 3D de collagène de type I augmente l'expression du gène de la MT1-MMP via le facteur de transcription Egr-1 qui est capable de reconnaître un site de type SP-1. Il a aussi été rapporté que dans les cellules mésangial glomérulaire, le facteur de transcription NFAT1c coopère avec SP-1 et Egr-1 dans la régulation de la transcription du gène codant la MT1-MMP (Alfonso-Jaume et coll., 2004).

V.2.2.2. Localisation subcellulaire et compartimentation.

L'état d'activation de la MT1-MMP est corrélé à sa localisation cellulaire au sein des cellules endothéliales. En effet, cette dernière, sous une forme inactive, présente une localisation diffuse au sein des cellules confluentes et une localisation sous forme d'amas au niveau des protusions membranaires corrélée à une augmentation de l'activité protéolytique de cette enzyme (Galvez et coll., 2001). De plus, lorsque les cellules endothéliales sont cultivées jusqu'à confluence sur du collagène de type I, l'activité protéolytique de la MT1-MMP diminue par translocation de l'enzyme au niveau des contacts inter-cellulaires. Les intégrines

de type $\beta 1$ au niveau des jonctions cellules-cellules et l'intégrine α_v β_3 au niveau des protusions membranaires pourraient jouer un rôle dans ces localisations en formant des complexes directs ou indirects avec la MT1-MMP (Galvez et coll., 2002). Le récepteur CD 44 pourrait aussi jouer un rôle dans la translocation de la MT1-MMP au niveau des protusions membranaires des cellules endothéliales comme cela a été montré dans d'autres types cellulaires (Mori et coll., 2002). L'adressage intracellulaire de la MT1-MMP vers d'autres microdomaines pourrait aussi jouer un rôle dans la modulation de la localisation de la MT1-MMP. En effet, l'équipe de Galvez et collaborateurs a démontré que la MT1-MMP était présente au niveau des cavéoles et que cette dernière était co-localisée avec la cavéoline-1 au niveau des protusions membranaires (Galvez et coll., 2004). Il a été démontré dans les cellules endothéliales en inhibant ainsi la synthèse de cavéoline-1 à l'aide de la technique d'interférence par l'ARN, que les cavéoles sont nécessaire à l'activation de la MT1-MMP lors de la migration et de la formation de vaisseaux (Galvez et coll., 2004). En conséquence, l'association entre la MT1-MMP et la cavéoline-1 est cruciale pour les fonctions de locomotion cellulaire (Labrecque et coll., 2004). Les cavéoles pourraient ainsi réguler l'activité de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales en modulant non seulement sa localisation intracellulaire mais aussi son internalisation.

V.2.2.3. Internalisation et trafique.

La MT1-MMP peut être internalisée via une voie classique clathrine et dynamine dépendante notamment dans les cellules tumorales (Jiang et coll., 2001). Cette voie fait intervenir la partie cytosolique de la MT1-MMP qui interagit avec la sous unité μ2 de la protéine adaptatrice 2 via un motif Leu-Leu (Uekita et coll., 2001). Cependant une autre voie d'internalisation a été proposée et démontré dans les cellules tumorales grâce à l'utilisation là aussi de la technique d'interférence par l'ARN dirigé contre la cavéoline-1 (Galvez et coll., 2004). Mais dans les cellules endothéliales, la seule voie décrite à l'heure actuelle pour l'internalisation de la MT1-MMP fait intervenir les cavéoles (Galvez et coll., 2004). Récemment, il a été proposé que la microtubuline du cytosquelette ainsi que le centrosome puisse jouer un rôle dans l'internalisation de la MT1-MMP (Remacle et coll., 2005). Le devenir de la MT1-MMP internalisée n'est pas encore totalement élucidé mais elle aurait pour fonction d'éliminer les fragments de la MT1-MMP inactifs, de recycler la MT1-MMP à la surface membranaire ou de diriger la MT1-MMP vers les lysosomes via l'interaction avec la tétraspanine ou CD 63 (Remacle et coll., 2003 ; Wang et coll., 2004 ; Takino et coll., 2003).

V.2.2.4. Dimérisation.

La dimérisation de la MT1-MMP peut se réaliser par l'interaction des domaines hémopéxine et/ou des domaines cytosoliques via en particulier le résidu Cyst 564. Ces différents types d'associations pourraient être en rapport avec différentes fonctions de la MT1-MMP (Itoh et coll., 2001 ; Rozanov et coll., 2001 ; Lehti et coll., 2002). La dimérisation semble être corrélée à une activité protéolytique exacerbée dans les cellules tumorales (Itoh et coll., 2001). Récemment, il a été démontré qu'environ 10% des molécules de MT1-MMP sont sous formes de dimère au niveau de la surface des cellules endothéliales en migration et que les chimiokines pro-angiogéniques CCL2 ou CXCL8 augmentent la formation de ces dimères d'un facteur 4 (Galvez et coll., 2005). Cette augmentation met en jeu les voies de signalisation PI3K, Rac GTPase et la polymérisation de l'actine. Les intégrines $\beta 1$ et l'intégrine $\alpha_v \beta_3$ induisent l'activation de la MT1-MMP ainsi qu'une localisation cellulaire différente dans les cellules endothéliales. L'interaction de la MT1-MMP avec CD44 pourrait jouer un rôle dans l'acheminement de cette dernière vers le front de migration. De plus, la partie cytosolique de la MT1-MMP peut interagir avec la sous unité $\mu 2$ de la protéine adaptatrice 2 (AP2) et avec le cupin dans d'autres types cellulaires.

V.2.2.5. Le relargage.

Le relargage de la MT1-MMP de la membrane plasmique dans le milieu extracellulaire a été très largement décrit par le groupe de Fridman qui a défini le rôle de chaque fragment issu de la MT1-MMP ainsi que leurs activités et leurs fonctions possibles dans différents types cellulaires (Toth et coll., 2002; Toth et coll., 2005).

V.2.2.6. Modifications Post-transcriptionnelles.

La Glycosylation de la MT1-MMP peut moduler l'activation de la proMMP-2 et donc moduler aussi son activité protéolytique dans les cellules tumorales. Le rôle de cette modification durant l'angiogenèse reste inconnu (Wu et coll, 2004). Il a récemment été rapporté que la Cystéine 564 de la région cytosolique de la MT1-MMP peut subir une réaction de palmitoylation et ainsi affecter à la fois son internalisation clathrine dépendante ainsi que ces fonctions dans la migration cellulaire (Anilkumar et coll., 2005).

VI. L'interférence par l'ARN.

VI.1. Introduction.

Le génome subit des altérations qui en absence de réparations peuvent provoquer des mutations, délétions ou translocations géniques. Certaines de ces altérations aboutissent à la synthèse d'une protéine anormale ou à sa surexpression. Ces altérations peuvent être à l'origine de maladies, dont beaucoup de cancers. Différentes techniques ont été développées depuis plusieurs années afin de palier à ces anomalies, notamment des approches concernant l'ARN anti-sens. De ces recherches une nouvelle technique a émergé, fondée sur une inhibition naturelle de l'expression génique : l'interférence par l'ARN (ARNi). L'ARNi est un processus qui a été conservé tout au long de l'évolution chez les Eucaryotes. Il fait aujourd'hui l'objet d'un intérêt grandissant dans le monde de la biologie cellulaire car il montre une grande efficacité dans l'inhibition génique. Par ailleurs, le phénomène d'ARNi permet de comprendre la fonction des différents gènes au sein d'un génome à travers l'inhibition de l'activité d'un gène et par conséquent la disparition de sa fonction.

VI.2. Historique de l'ARN interférence.

Le phénomène d'ARNi, depuis 1990, prend de plus en plus d'importance dans le monde de la biologie. Différentes études ont permis d'aboutir à la découverte de ce mécanisme et à sa compréhension.

VI.2.1. Découverte fortuite du phénomène d'ARN interférence.

La première manifestation du phénomène d'ARNi fut observée par l'équipe de Richard Jorgensen en 1990. Ce chercheur travaillait sur les mécanismes de coloration des pétunias et souhaitait intensifier la couleur des pétales. Pour cela, il introduisit dans l'organisme une copie du gène CHS (chalcone synthase), responsable de la coloration des fleurs. Contre toute attente, il observe que 42% des fleurs dans lesquelles le gène CHS était introduit présentaient une couleur blanche (contre 9% des fleurs contrôles) ou anormalement pale (Napoli et coll., 1990). L'analyse des ARN isolés à partir des fleurs blanches et protégés contres des ARNases a montré que le taux d'ARNm produit par le gène était fortement réduit par rapport au taux d'ARN des fleurs contrôles. La copie de gène introduite avait donc entraîné une inhibition de la pigmentation. Cette équipe a montré que ce gène n'avait pas été altéré (lors de l'introduction), en séquencant sa région codante et en la comparant avec la séquence du clone d'ADNc (ADN complémentaire) dont elle était dérivée. Ils ne constatèrent aucune différence. Il semblait donc que l'introduction du transgène CHS avait inhibé l'expression du gène endogène. Ainsi, l'addition d'un gène codant une protéine dont la

synthèse était déjà prise en charge par un gène endogène, entraîne une diminution voir un arrêt de la synthèse de la protéine. A l'époque, le phénomène fut appelé « co-suppression ». Ce phénomène fut ré observé bien plus tard dans le règne animal par les études menées par le groupe d'Andrew Fire chez le nématode C. elegans. Identifié sous le nom de PTGS chez les plantes pour « Post-Transcriptional Gene Silencing », ce mécanisme d'extinction de l'expression d'un gène par l'introduction d'ARN homologue, fut alors appelé « ARN interférence ». L'équipe d'Andrew Fire a montré que l'introduction d'ARN dans des cellules pouvait interférer avec la fonction d'un gène endogène et réduire spécifiquement l'expression de protéines. Par cette technique, l'expression de 96% des 2300 gènes (environ) du chromosome III de C. elegans était inhibée. Ils ont par ailleurs déterminé la fonction d'un gène impliqué dans la migration du noyau lors de la division cellulaire (Fire et coll., 1998). Ce mécanisme d'extinction génique est donc conservé à la fois chez les plantes, le nématode C. elegans et la drosophile. Celui-ci a évolué à partir d'un mécanisme naturel de défense antivirale (Guru, 2000; Kennerdell et coll., 2000). Au premier abord, il semblait peu probable que le mécanisme de l'ARNi fonctionne chez les vertébrés. En effet, l'introduction d'ARN dans les cellules de mammifères déclenche une forte réponse immune ou une réaction antivirale non spécifique, appelée réponse interféron. Il y a induction de la synthèse d'interféron α ou β et de cytokines pro inflammatoires conduisant à l'activation de deux types d'enzymes : la protéine PKR et la 2',5'-oligoadenylate synthétase. L'activation de ces voies bloque la synthèse des protéines cellulaires et provoque une dégradation non spécifique des ARN messagers dans les cellules atteintes. Ceci a pour but de bloquer la réplication de particules virales et de protéger les cellules voisines (McManus et coll., 2002). Les premières notions ont émergé des travaux des groupes de Carthew et de Sharp sur les extraits d'embryons de drosophile. Ils ont mis en évidence que l'extinction des gènes étaient spécifiques et dépendant de la séquence et que ce processus avait lieu au niveau posttranscriptionnel. La déstabilisation de l'ARN messager ciblé était provoquée par l'assemblage d'un complexe nucléasique au niveau de l'ARNm entraînant sa dégradation (Elbashir et coll., 2001; Dalmay, 2000).

VI.2.2. Découverte du phénomène chez les mammifères.

En 2001, un article sur l'ARNi parait dans « Nature » et entraîne un véritable engouement scientifique. En effet dans celui-ci, Sayda M. Elbashir montre que le phénomène existe également chez les mammifères. Au même moment, elle présente sa découverte au congrès annuel de la RNA Society. Dans cet article, l'équipe démontre que de petits fragments d'ARN inhibent rapidement, facilement et spécifiquement les gènes de cellules humaines. L'équipe a mis en évidence que la nature de la réponse cellulaire était contrôlée par

la taille de l'ARN introduit. De ce fait, l'introduction directe dans les cellules de mammifères de courts oligonucléotides (de 21 à 23 bases) pouvait bloquer spécifiquement l'expression du gène ciblé sans déclencher de réponse antivirale de type interféron (Elbashir et coll., 2001). Ces travaux ont permis d'élaborer de nouveaux outils dans le but d'invalider spécifiquement l'expression d'un gène chez les mammifères, tant au niveau de la recherche fondamentale (compréhension des génomes) que de la recherche appliquée (le traitement de maladies encore incurables devient envisageable). L'équipe d'Elbashir démontre dans l'article que l'ARNi supprime spécifiquement l'expression des gènes endogènes dans différentes lignées de cellules de mammifères, y compris dans les cellules embryonnaires de rein humain et les cellules HeLa (Elbashir et coll., 2001). Des expériences semblables sur des cellules de mammifères et des cellules de drosophiles ont été réalisées. Ainsi après transfection des cellules de drosophiles par un plasmide exprimant le gène de la luciférase, ils observent après 20 heures une fluorescence. La cotransfection avec un ARNi spécifique du gène de la luciférase inhibe l'expression de cette dernière et par conséquent aucune fluorescence n'est observée. Sur les cellules de mammifères, ils obtiennent une suppression spécifique nettement moins importante mais non négligeable de l'expression de la luciférase. Deux hypothèses sont alors proposées : l'expression trop importante du gène diminue sa dégradation par rapport à celle observée chez la drosophile ou l'accessibilité du gène cible est limitée ce qui diminue le taux d'ARN dégradé. L'équipe effectue d'autres recherches pour confirmer les résultats obtenus et conclut que le phénomène d'ARNi fonctionne dans les types de cellules utilisées même si la dégradation n'est pas de 100%.

VI.2.3. Situation actuelle.

Depuis les années 1990, et particulièrement depuis 2001, un grand nombre de chercheurs s'intéresse au phénomène de l'ARNi pour tenter de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Cependant, certains points restent inexpliqués : on ne sait actuellement pas pourquoi l'extinction de l'expression du gène n'est que partielle (Cogoni et coll., 2000). De nombreux laboratoires de biologie cellulaire, moléculaire ou de génétique travaillent aujourd'hui en utilisant le phénomène d'ARNi, notamment pour la compréhension du rôle et du fonctionnement de différents gènes. L'ARNi est aussi étudié dans le but de développer des approches thérapeutiques dans le traitement de maladies diverses : infections virales, cancers, maladies neurodégéneratives... Ces pathologies restent aujourd'hui sans traitements efficaces et ont souvent une origine inconnue. L'ARNi, qui est au stade expérimental du point de vue thérapeutique, constitue un véritable espoir dans le traitement de ces pathologies. Ce n'est qu'en 2004 que les premiers tests sur l'humain ont été effectués.

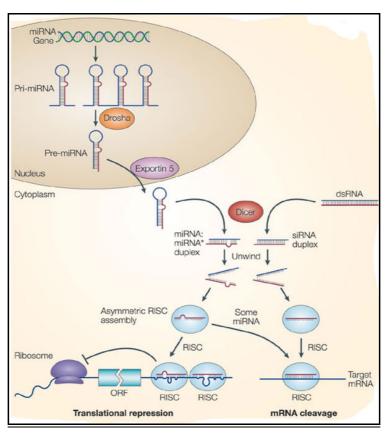
VI.3. Mécanisme de l'ARNi.

Dans l'état actuel des connaissances, le processus de l'ARNi consiste en deux étapes distinctes :

-<u>La phase d'initiation</u>: elle consiste en la production de petits ARN interférents à partir du brin d'ARN d'origine exogène. De façon intéressante, ces ARN interférents ne sont pas exprimés de façon endogène chez les mammifères.

-<u>La phase effectrice</u> : elle met en jeu une activité nucléasique qui détruit l'ARNm ciblé en le coupant. Elle est commune à tous les organismes (Ketting et coll., 2001).

Le mécanisme général d'interférence par les petits ARN est représenté au niveau de la figure 23.



<u>Figure 23:</u> Deux voies de l'ARNi : par les siARN ou par les miARN. La voie de l'ARNi peut être médiée par des siARN (à droite) ; ou la voie d'ARNi empreinte l'utilisation des miARN (à gauche). (D'après He et coll., 2004).

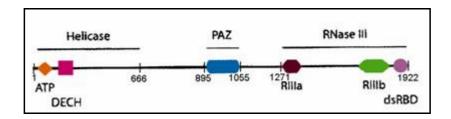
VI.3.1. Mécanisme de la phase d'initiation.

Le phénomène de l'ARNi est initié par la reconnaissance de l'ARNdb par un complexe nucléasique. Ce complexe découpe cet ARNdb en petits fragments de 21 à 25 nucléotides avec des extrémités 3' symétriques comportant 2 nucléotides sortants. Grâce aux études réalisées sur la drosophile, on peut caractériser cette activité enzymatique capable de reconnaître et de découper l'ARNdb. Cette activité est assurée par une ribonucléase de la famille de la RNase III appelée Dicer (Bernstein et coll., 2001).

VI.3.1.1. L'enzyme Dicer.

Cette enzyme, très conservée tant chez le nématode *C. elegans* que chez les mammifères, est localisée dans le cytoplasme, ce qui implique que l'ARNi est de façon prédominante, un processus cytoplasmique (Bernstein et coll., 2001). La protéine Dicer possède (Figure 24):

- -un domaine ARN hélicase dans sa région N-terminale,
- -un domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille), interagissant avec les ARNdb aux extrémités 3' sortantes,
- -deux domaines ARNase III,
- -un motif de liaison à l'ARNdb (RBD) dans sa région C-terminale (Tahbaz et coll., 2004 ; Jaronczyk et coll., 2005).



<u>Figure 24:</u> Structure de l'enzyme Dicer. Elle possède un domaine hélicase, un domaine PAZ (PAZ), deux domaines ARNase III (RIIIa et RIIIb) et un motif de liaison à l'ARNdb (dsRBD) (D'après Jaronczyk et coll., 2001).

L'étude de la structure de l'enzyme a permis de concevoir un fonctionnement en dimère antiparallèle (Jaronczyk et coll., 2001). Elle se divise en quatre sites actifs, dont les deux centraux seraient inactifs à cause de l'introduction de résidus dans le centre catalytique du deuxième domaine de Dicer. L'équipe de Bernstein a pu caractériser en 2001 l'existence de deux types de Dicer chez la drosophile. Des mutations sur le gène Dicer-1 empêchent l'inhibition de la traduction de l'ARNm alors que des mutations sur Dicer-2 perturbent la dégradation des certains ARNm. Cependant chez les mammifères, un seul type de Dicer a été découvert (Jiang et coll., 2005). De plus, on savait que Dicer-2 se liait à une protéine R2D2 (R2 car elle possède deux sous-unités et D2 pour Dicer-2), il a été récemment découvert que R3D1 se fixe de la même manière à Dicer-1 (Lee et coll., 2004).

VI.3.1.2. Fonction nucléasique de Dicer : formation des siARN.

La fonction principale de Dicer est de cliver l'ARNdb en petits fragments. Pour remplir cette fonction, Dicer doit reconnaître l'ARNdb et s'y lier. Dicer semble être localisée dans le réticulum endoplasmique, du moins pour l'enzyme humaine, ce qui lui procure une augmentation de spécificité. Elle peut alors discriminer les ARNdb devant rendre silencieux des gènes, de ceux essentiels à la traduction et à d'autres processus ARN dépendants. Une fois l' ARNdb reconnu, Dicer n'a pas besoin de Mg²⁺ pour s'y fixer, en revanche ce cation est indispensable pour le clivage. De plus, ces ions stabilisent la dimérisation Dicer/ARNdb. Le clivage de l'ARNdb ne nécessite pas d'ATP chez les mammifères, mais chez la drosophile et les nématodes, l'ATP se lie au domaine ATPase/hélicase de Dicer. Différentes hypothèses sont proposées pour comprendre l'intérêt de l'hydrolyse de l'ATP; elle pourrait permettre :

-le déplacement de Dicer le long de l'ARNdb et le déroulement local du substrat ;

-la libération du produit par l'enzyme et son transfert à la nucléase RISC (phase effectrice) ;

-un réarrangement structural de Dicer nécessaire pour la liaison et le clivage du substrat suivant (Tuschl et coll., 1999).

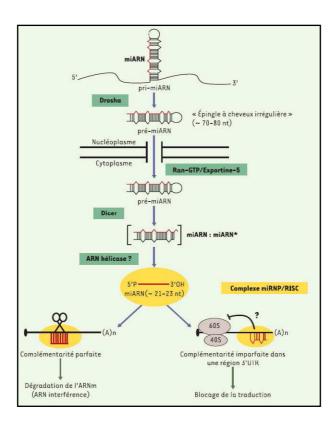
Dicer se compose de deux domaines catalytiques, d'où un clivage à intervalle de 22 nucléotides des deux brins de l'ARN fixé. Les modifications dans Dicer par rapport à la séquence consensus entraînent une modification différentielle dans l'espace des centres catalytiques, ce qui explique la variation spécifique dans la longueur des fragments produits. Ces fragments sont appelés small interfering ARN (siARN). Dicer clive l'ARNdb préférentiellement aux extrémités 3' sortantes. L'efficacité du clivage dépend de la longueur de l'ARNdb. Dicer reste liée au produit de clivage, ce qui ralentit l'activité enzymatique.

VI.3.1.3. Production des miARN: intervention de Drosha et Dicer

Dicer est également impliquée dans la production d'une autre classe de petits ARN, appelés micro ARN (miARN) (Ma et coll., 2003). Du fait de leur petite taille, les miARN sont longtemps passés inaperçus dans les processus classiques de purification d'ARN. Ils ont été identifiés, il y a une dizaine d'années chez le nématode *C. elegans*. Par la suite, ils ont été bien décrits chez *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* et *Homo*. *Sapiens*. De façon remarquable, certains miARN sont très conservés au cours de l'évolution, ce qui suggère une fonction biologique importante (Kim et coll., 2006). La maturation des miARN fait intervenir au moins deux protéines apparentées à l'ARNaseIII : Drosha et Dicer (Zeng et coll., 2005). Drosha chez l'Homme fait partie d'un complexe multiprotéique contenant de nombreuses hélicases et protéines du sarcome d'Ewing. Elle peut aussi être associée à DGCR8 (alias Pasha), une protéine se liant aux ARNdb (Zeng et coll., 2005). Elle

intervient dans le nucléoplasme où elle convertit un transcrit primaire (pri-miARN) constitué de plusieurs centaines de nucléotides dont certaines régions sont capable deformer des structures en épingles à cheveux, en pré-miARN, tiges boucles d'environ 70 nucléotides (Figure 25). Ces derniers sortent du noyau grâce à l'exportine 5 et sont pris en charge par Dicer qui après le clivage des pre-miARN formeront des mi ARN double brins d'environ 21 à 23 nucléotides similaires à des siARN. On estime cependant, que seul le brin dont l'extrémité 5' est le moins stablement appariée s'accumule dans le cytoplasme, ce qui suggère l'intervention d'une hélicase à ARN et la dégradation du brin non protégé. Chez les mammifères, des travaux semblent indiquer que la maturation des mi ARN pourrait également avoir lieu dans le noyau mais le mécanisme n'est pas encore connu. Chez les plantes, les précurseurs des mi ARN sont plus longs et ont une structure plus complexe.

Depuis 2002, plusieurs groupes se sont focalisés sur l'identification des séquences pouvant former des boucles et générer ces petits ARN de 21-23 nucléotides (Tuschl et coll., 1999). Leurs efforts ont conduit à l'identification d'environ 250 miARN chez l'Homme mais il est probable que ce nombre sera bientôt largement dépassé. Les premiers miARN découverts furent lin-4 et let-7, des « small temporal ARN » (stARN) qui interviennent dans le contrôle du développement de l'animal. La molécule d'ARN lin-4 (lineage-abnormal-4) régule négativement les gènes du développement lin-14 et lin-28.



<u>Figure 25:</u> Biosynthèse des miARN. Drosha et Dicer sont deux enzymes intervenant dans la maturation du miARN. A partir d'un ARN précurseur en tige boucle imparfaite ces enzymes produisent un ARN simple brin d'environ 21-23 nucléotides.

Plusieurs travaux suggèrent qu'elle exerce une répression post-transcriptionnelle en se fixant au niveau de séquences homologues situées dans la région 3'UTR des ARNm. D'une façon similaire, let-7 (lethal-7) est un régulateur transcriptionnel négatif qui cible les régions 3' UTR du messager lin-41 (Banerjee et coll., 2002). On peut citer d'autres miARN comme par exemple isy qui cible cog (gène déterminant l'asymétrie neuronale) chez C. elegans. Chez la drosophile miR-14, bantam et miR-2, entre autres, contrôlent la prolifération et/ou la différenciation cellulaires en modulant l'expression de gènes pro apoptotiques tel que hid (Brennecke et coll., 2003a; Brennecke et coll., 2003b). Chez les mammifères, certaines cibles restent inconnues, c'est le cas de l'ARNm ciblé par miR-18 (Chen et coll., 2004a) (Tableau VII).

miARN	Organismes	Gènes cibles	Fonctions biologiques contrôlées
lin-4	C. elegans	lin-14, lin-28	Mise en place des stades larvaires
let-7	id	lin-41, lin-57/hbl-1	Mise en place des stades larvaires
lsy-6	id	cog-l	Asymétrie neuronale droite/gauche
Bantam	D. melanogaster	hid	Apoptose, prolifération cellulaire
miR-14	id	?	Apoptose, métabolisme des lipides
miR-2	id	reaper/grim/sickle	Apoptose ?
miR-7	id	E(spl), Brd, hairy	Signalisation Notch?
miR-277	id	Multiples gènes	Voies de dégradation de la Valine, Leucine et Isoleucine ?
miR-165/-166	A. thaliana	Phabulosa, Phavoluta	Morphogenèse des feuilles
Jaw	id	gènes <i>TCP</i>	Morphogenèse des feuilles
miR-172	id	APATALA2	Développement floral
miR-127/-136	Mammifères	Rtl1 (rétrotransposon-like)	Extinction de Rtl ? Empreinte parentale ?
miR-181	id	?	Différenciation hématopoïétique
miR-15/-16/142/-155	id	?	Oncogenèse ?

<u>Tableau VII:</u> Exemples de miARN dont la fonction biologique et /ou les cibles ARNm sont caractérisées. La phase d'initiation se termine en aboutissant à la production de petits fragments, siARN ou miARN, grâce à la diversité de la ribonucléase Dicer et par l'intervention de Drosha.

Pour résumer, la différence entre miARN et siARN est ténue car les siARN ont d'abord été décrits comme des guides de clivages d'ARN cibles, c'est donc une définition fonctionnelle alors que les miARN sont de petits ARN simple brin de 21 à 23 nucléotides issus de la maturation de précurseurs repliés en épingle à cheveux, c'est donc une description structurale. Cependant, siARN et miARN sont capables tous deux de guider des clivages par interférence à ARN.

VI.3.2. Mécanisme de la phase effectrice.

Le but de cette étape est d'aboutir à l'inhibition de l'expression de gènes cibles. Les siARN ou miARN, après avoir été produits grâce à Dicer, vont par la suite guider le complexe effecteur endonucléasique « RNA-Induced Silencing Complex » (RISC) sur l'ARNm homologue à détruire.

VI.3.2.1. Le complexe RISC.

Le complexe RISC a été identifié à partir d'embryons de drosophile sous la forme d'un complexe précurseur de 250 kDa par le groupe de Zamore (Matranga et coll., 2005). Il se compose de plusieurs domaines (Matranga et coll., 2005 ; Scadden, 2005) :

-une protéine de la famille des Argonautes : Cette protéine peut varier selon les espèces. Néanmoins, la protéine Ago2 est très conservée entre les espèces. Son homologue chez l'Homme est le facteur d'élongation eIF2C, initialement caractérisé par son association aux ribosomes et son rôle dans la traduction des protéines. La protéine argonaute/eIF2 est de nature basique et a une masse moléculaire d'environ 100 kDa. De plus, sa nature basique au sein du complexe influence la fonction de RISC. En effet, dans les RISC s'associant aux siARN, on retrouve l'Argonaute Ago1 alors que dans les RISC contenant les miARN on trouve Ago2.

- le domaine PAZ, présent dans Ago2, s'apparierait avec le domaine PAZ de Dicer grâce au facteur R2D2 ou R3D1 ; cela permettrait alors de lier l'ARN simple brin .
 - le domaine Piwi en C-terminal.

-une hélicase permettant de dissocier l'ARNdb. Celle-ci est ATP-dépendante. A l'heure actuelle, on a montré qu'une hélicase (la GEMIN 3) coprécipitait avec efF2CD2 (composant argonaute de RISC humain) (Hutvagner et coll., 2004 ; Maniataki et coll., 2005).

VI.3.2.2. Activation de RISC.

Le complexe inactivé contient les siARN ou miARN sous leur forme « double brin » alors que la forme activée de RISC contient les formes relaxées simple brin qui servent de guide pour la reconnaissance de la cible. Il faut donc tout d'abord que RISC reconnaisse Dicer, et cela se fait grâce à son domaine Ago. Ensuite, l'hélicase composant RISC permet la dissociation des deux brins ; cette étape nécessite de l'ATP. On obtient ainsi un complexe RISC activé qui va pouvoir aller attaquer l'ARN cible (Kavi et coll., 2005). Le complexe RISC effectuerait un cycle catalytique en quatre étapes schématisées au niveau de la figure 26 (Tomari et coll., 2005) :

- étape 1 : la protéine Argonaute lie le brin guide par l'ancrage de l'extrémité 5' et des bases adjacentes dans la poche basique du domaine PIWI et des deux nucléotides libres de l'extrémité 3' dans la poche du domaine PAZ. Les contraintes topologiques indiquent que la région 3' du guide ne serait pas dans une forme hélicoïdale.
- étape 2 : l'ARN cible s'apparie au niveau de la région 5' du guide et le duplex d'ARN peut adopter une forme hélicoïdale sur environ 7 nucléotides, le tout premier nucléotide étant exclu de l'appariement.

- étape 3 : Le reste de l'ARNm vient s'apparier le long du brin guide ce qui nécessite un changement conformationnel de la protéine. Ce changement induit la délocalisation du domaine PAZ qui s'éloigne du domaine N terminal et/ou la rupture de l'interaction entre l'extrémité 3' du guide et le domaine PAZ. L'espace dégagé entre les domaines PAZ et Nter serait ainsi occupé par le duplex ARN guide / ARNm.
- étape 4 : le clivage a été induit par le positionnement du duplex qui permet de localiser l'ARN cible à proximité du motif catalytique du domaine PIWI et les deux fragments sont libérés. Le retour à la conformation initiale où le guide est ancré en 3' pourrait aider à la dissociation des fragments ou une hélicase à ARN pourrait aussi participer à cette étape.

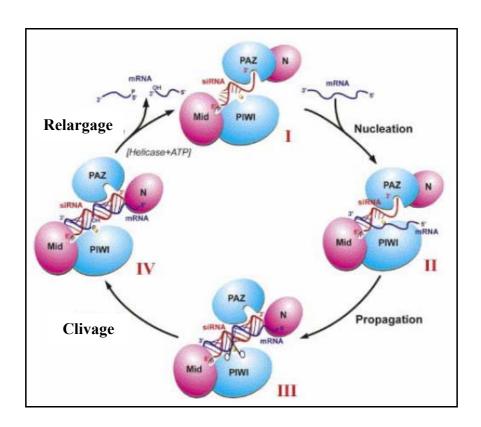
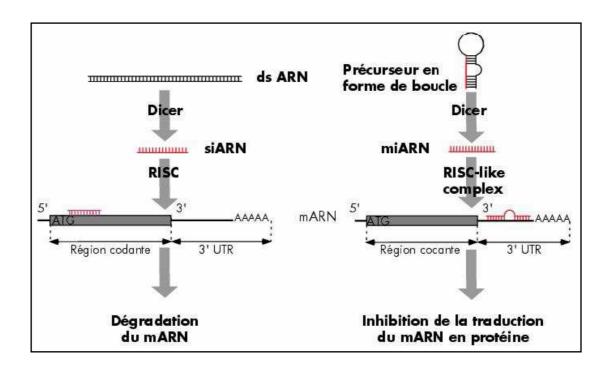


Figure 26: Mode d'activation du complexe RISC. (D'après Yuan, Pei et al. 2005)

VI.3.2.3. Deux mécanismes d'action : dégradation d'ARNm ou inhibition de la traduction.

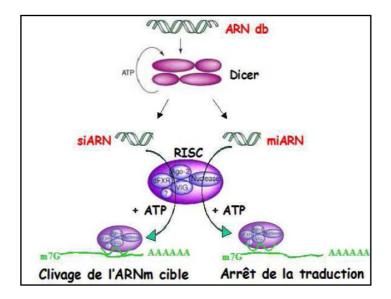
Une fois activé, RISC est guidé par l'ARNi vers l'ARNm auquel il se fixe. Les premiers travaux semblaient indiquer qu'il existait une différence fondamentale dans le mode d'action entre les siARN et les miARN et qui résidait dans la force de la liaison du fragment à l'ARNm cible. En effet, contrairement à la liaison des siARN sur leur séquence cible, la liaison du miARN est considérait comme imparfaite en formant des zones de mésappariement. Ceci eu pour conséquence de mettre en évidence deux mécanismes d'action différents. Dans le cas des siARN, il y a destruction de l'ARNm; le siARN est fixé par RISC

sur une région codante de l'ARNm cible. La fixation des miARN sur l'ARNm se fait de manière imparfaite sur une région 3' non codante, donc cela a pour conséquence de bloquer la traduction du gène et d'empêcher la synthèse de la protéine correspondante. A l'heure actuelle, on estime que les miARN et les siARN semblent pouvoir jouer les mêmes rôles, et seules la qualité de l'appariement entre le petit ARN et sa séquence cible déterminerait le mode de répression : si la complémentarité est parfaite, l'ARN cible est clivé par ARNi, et si elle est imparfaite, sa traduction est inhibée (Hutvagner et coll., 2002 ; Zeng et coll., 2003) (Figure 27).



<u>Figure 27:</u> Comparaison des mécanismes d'action des siARN et des miARN. Le siARN généré par l'action de l'enzyme Dicer se lie, par l'intermédiaire du complexe RISC, sur une région codante d'un ARN messager. La parfaite complémentarité de séquence entre le siARN et l'ARN messager provoque la dégradation de ce dernier. Le miARN est généré à partir d'un précurseur en forme d'épingle à cheveux par l'enzyme Dicer. Il est reconnu par un complexe qui ressemble au complexe RISC. Celui-ci provoque la liaison du miARN au niveau des régions 3' non codantes d'un ARN messager. La liaison imparfaite du miARN au niveau du messager provoque son inhibition post-transcriptionnelle et empêche la synthèse de la protéine correspondante.

Ainsi, l'appariement entre ARNm et siARN ou miRNA entraîne la formation d'ARN double brin ce qui déclenche en retour le système de défense naturel de la cellule contre les virus car ceux-ci présentent fréquemment ce type de structure. Cela peut donc présenter également un intérêt pour lutter contre les virus. L'endonucléase du complexe RISC clive alors l'ARNm. L'ARNm étant détruit, la protéine normalement traduite à partir de cet ARN ne peut plus être synthétisée. Soit la molécule hybride ARNm/miARN ou siARN est de complémentarité imparfaite et associée au complexe RISC va engendrer l'inhibition de la traduction du gène (Figure 28).



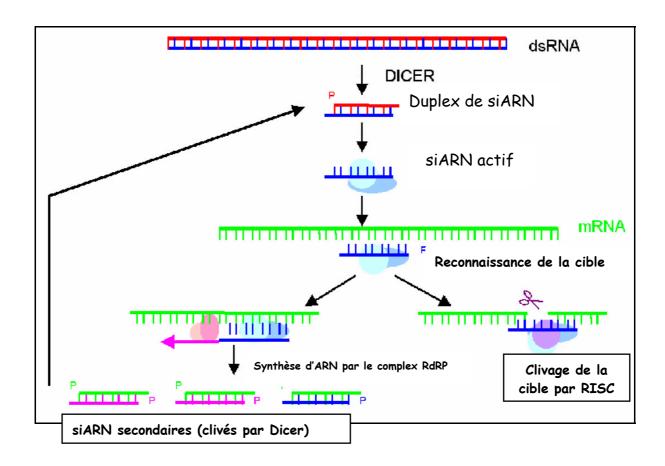
<u>Figure 28:</u> Fonctionnement classique de la machinerie de l'ARN interférence. L'ARN double brin est reconnu et clivé par Dicer en siARN et miARN. Ces petits ARN se lient ensuite à RISC formant ainsi un complexe, activé par de l'ATP, qui se lie à l'ARNm cible.

Il existe des similitudes importantes dans le mécanisme d'action des siARN et des miARN. Ainsi, il est possible que l'ARNi soit la voie ancestrale visant à contrôler les pathogènes qui aurait évolué vers le mécanisme des miARN pour contrôler les propres gènes de la cellule. Empêcher la traduction de l'ARNm plutôt que le détruire pourrait être un meilleur moyen d'en moduler l'expression. Ainsi la phase effectrice se termine. Quelque soit la méthode employée (siARN ou miARN), le résultat final reste le même : l'expression d'une protéine est inhibée (Doench et coll., 2003).

VI.3.3. Etape d'amplification.

L'inhibition de l'expression de protéine par le phénomène d'ARNi ne semble exiger qu'une très faible quantité initiale d'ARNdb. On suppose donc qu'il y a une étape d'amplification dans le phénomène d'ARN interférence du moins chez les nématodes, les plantes et les champignons. RdRP (RNA-directed RNA polymerase) est une polymérase qui intervient dans le phénomène de transitivité de l'ARNi pour augmenter l'efficacité d'interférence de l'ARN (Stein et coll., 2003). Il a été démontré que, chez *C. elegans*, l'ARNi implique la production de deux populations de siARN par l'intervention de RdRP (Sijen et coll., 2001). Le premier groupe de siARN (siARN primaires) provient de l'ARNdb initialement injecté et permet de rendre silencieuses des régions d'ARNm particulières par complémentation de séquence. La liaison siARN/ARNm cible induit le clivage de l'ARNm et produit alors une structure servant de signal à RdRP afin d'initier la synthèse de siARN secondaires. Ces siARN secondaires ont une séquence et une structure caractéristiques des

ARNs synthétisés par RdRP; ce sont des ARN anti-sens de l'ARNm clivé. Ils sont synthétisés par RdRP à partir de l'extrémité 3'OH du siARN primaire anti-sens servant d'amorce sur l'ARNm cible (Nishikura, 2001; Sijen et coll., 2001). Le résultat de cette réaction est la formation d'un nouvel ARNdb. Ce dernier est alors utilisé comme substrat par Dicer. Ce modèle dit de « PCR dégénérative » aboutit à une amplification du signal siARN (Figure 29). Ces siARN secondaires correspondant aux régions de transcrit en amont de la cible initiale peuvent aussi rendre silencieux les ARNm de séquence complémentaire à la leur, pour augmenter la réponse. On pense que les ARNdb primaires sont initialement reconnus de manière différente par rapport à la reconnaissance des ARNdb secondaires, produits par RdRP. L'amplification exponentielle du nombre de siARN permet des réponses plus sensibles et plus sélectives (Roignant et coll., 2003).



<u>Figure 29:</u> Amplification des siARN grâce à RdRP. Deux différentes voies impliquées dans le phénomène d'ARNi. A partir du ARNdb injecté, Dicer forme des siARN primaires. Ces fragments se lient ensuite à RISC pour aller reconnaître l'ARNm cible. A partir de là, soit on empreinte la voie classique aboutissant à la dégradation de l'ARNm, soit RdRP synthétise un nouveau brin qui sera par la suite clivé par Dicer, on obtient alors les siARN secondaire ; il y a une amplification du nombre de siARN dans la cellule. Et ainsi la boucle se referme.

L'absence d'homologue de RdRP chez la Drosophile et les Mammifères suggère soit que d'autres enzymes sont utilisées pour l'amplification, soit que le nombre de siARN primaires est suffisant pour produire une réponse efficace (Sijen et coll., 2001). On pense dans tous les cas que d'autres mécanismes d'amplification interviennent pour le phénomène d'ARNi.

But du travail

Au sein de notre laboratoire, différentes équipes ont montré que des peptides issus de la dégradation de macroprotéines de la matrice extracellulaire possèdent un certain nombre de propriétés biologiques sur différents types cellulaires, d' où leurs noms de Matrikines. Parmi ces Matrikines, on peut citer le peptide issu du domaine non collagénique 1 (NC1) de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV ou plus récemment celui du collagène XIX, dont des propriétes anti tumorales et anti angiogéniques ont été démontrées, mais aussi les peptides issus de la fragmentation de l'élastine contenant la séquence VGVAPG dénommés élastokines, qui ont été particulièrement étudiés dans notre laboratoire notamment sur les fibroblastes, où ils induisent la prolifération et une augmentation de la sécretion de la collagénase MMP-1 et sur les cellules de mélanomes et de fibrosarcomes HT-1080, oû ils induisent l'expression et l'activation de MT1-MMP et proMMP-2. L'activité de ces peptides nécessite une conformation en coude β de type VIII et sont médiés par le récepteur à l'élastine, S-Gal.

Cependant, les effets de ces élastokines ainsi que la signalisation induite par ces peptides n'ont jamais été etudiés de façon approfondie dans le processus de néoangiogenèse et en particulier sur les cellules endothéliales, or ces dernières sont indispensables à la progression tumorale et la dissémination métastatique.

Les résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire et ceux rapportés dans la littérature, évoquant un rôle des peptides d'élastine sur la vasodilatation de l'endothélium, nous a incité à étudier l'effet des élastokines issus de la dégradation de l'élastine dans des modèles invivo et invitro d'angiogenèse, à développer des outils thérapeutiques basés sur l'utilisation d'ARN interférents dans le but d'invalider les effets délétères de ces peptides sur l'invasion tumorale, et de déterminer les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'angiogenèse par les peptides d'élastine.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.

I.1. kappa-élastine.

L'élastine fibreuse insoluble extraite du ligament de la nuque de boeuf peut être solubilisée par la potasse en milieu éthanolique ; cette méthode d'hydrolyse génère des peptides d'élastine solubles en milieu aqueux appelés kappa-élastine (Ke). Le ligament (1 g) est mis en solution dans 100 mL d'un mélange éthanol-eau 80/20 (v/v) contenant de la potasse 1 M. Le mélange est agité pendant 1 heure à 37°C. Cette température favorise la solubilisation de l'élastine. Le surnageant est récupéré par centrifugation (10 min / 12 500 g / 4°C). Le culot d'élastine fibreuse non hydrolysée est soumis à un nouveau cycle d'hydrolyse organo-alcaline avec une nouvelle solution éthanol-eau 80/20 (v/v) contenant de la potasse 1 M. Toutes les heures, le surnageant obtenu est neutralisé par de l'acide perchlorique puis décanté pendant la nuit à 4°C. Après centrifugation, les sels de perchlorate formés qui ont sédimenté au fond du tube sont éliminés. Le surnageant contenant la Ke est dialysé contre de l'eau distillée puis lyophilisé. Les peptides ainsi générés présentent une grande hétérogénéité de masse moléculaire. Ils sont fractionnés en fonction de leur masse moléculaire par chromatographie d'exclusion-diffusion (gel de Séphadex G-100). La fraction homogène majoritaire de masse moléculaire de 75 kDa a été retenue pour nos différentes expérimentations.

I.2. Le peptide (VGVAPG) 3.

Le peptide synthétique VGVAPG répété 3 fois a été synthétisé en utilisant la stratégie de protection Fmoc. Cette synthèse a été réalisée par la société NEOSYSTEM (Strasbourg).

I.3. Inhibiteurs des voies de signalisation.

I.3.1. U0126, inhibiteur de MEK 1/2.

Le U0126 (Cell Signaling) est un inhibiteur spécifique de MEKI et MEK2. Cet inhibiteur entre en compétition avec le site de liaison à l'ATP de ces kinases et les inhibe de manière allostérique. U0126 a un IC 50 vis à vis de MEK 1 de 72 nM et de 58 nM vis à vis de MEK 2 (English et Cobb, 2002). Il inhibe la phosphorylation de Erk 1/2 (Figure 30).

Figure 30: Structure chimique du U0126.

1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis (2-aminophenylthio)butadiène.

I.3.2. LY294002, inhibiteur de la PI₃Kinase.

Le LY294002 (Cell Signaling) est un inhibiteur spécifique de PI₃Kinase. Il inhibe de façon compétitive la liaison de l'ATP sur la sous-unité catalytique p110 des PI₃Kinase de classe I_A, I_B et II (Vlahos et coll., 1994). Contrairement à la wortmannine, un autre inhibiteur de la PI₃Kinase, le LY294002 est stable en culture et n'a pas d'action sur les PI₃Kinase de classe III (Powis et coll., 1994 ; Stein et coll., 2000) (Figure 31).

Figure 31: Structure chimique du LY294002.

2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one.

I.3.3. H-89 et KT-5720, inhibiteur de PKA.

• H-89, inhibiteur de PKA.

Cet inhibiteur spécifique des PKA agit également de manière compétitive vis à vis de la liaison de P-ATP à son site de liaison. L'IC 50 de cet inhibiteur est de 48 nM (Chijiwa et coll., 1990). H-89 nous a été fournis par la société Calbiochem (Figure 32).

Figure 32: Structure chimique du H-89.

Br N-(2-((p-Bromocinnamyl)amino)ethyl)-5- isoquinoline sulfonamide.

• KT-5720.

Cet inhibiteur spécifique des PKA agit de manière compétitive vis à vis de la liaison de P-ATP à son site de liaison ($K_i = 56$ nM) (Kase H. et coll., 1987). KT-5720 nous a été fourni par la société Calbiochem (Figure 33).

Figure 33: Structure chimique du KT-5720.

(2,3,9,10,11,12-hexahydro-10-hydroxy-9-methyl-1-oxo-9,12-epoxy-1*H*-diindolo(1,2,3-fg:3_,2__,1_-kl)pyrrolo(3,4 i)(1,6)benzodiazocine-10-carboxylicacid hexyl ester)

I.3.4. F-3325 et L-NIO, Inhibiteur de NO synthase.

• F-3325, inhibiteur à spectre large de NO synthase.

Inhibiteur à spectre large des NO synthase. Entre en compétition avec le substrat naturel (la lysine) et détourne ainsi l'enzyme de ce dernier. Il possède un IC 50 de 3,3 μ M visà-vis de iNOS (souris), 92 μ M pour nNOS (rat) (Moore et coll., 1994). Il inhibe surtout iNOS mais à la concentration à laquelle nous l'avons utilisé, il peut inhiber eNOS (Figure 34).

<u>Figure 34:</u> Structure chimique du F-3325. N-(5-Amino-5-carboxypentyl)-acetamidine.

• L-NIO, inhibiteur de eNOS.

Inhibiteur non sélectif des NOS possédant un IC 50 de 3,9 µM pour eNOS (cellule endothéliale bovine) et iNOS (souris), entre en compétition avec le substrat naturel de l'enzyme (L-arginine) (Rees DD., et coll., 1990) (Figure 35).

$$H_3C$$
 NH
 H
 NH_2
 NH_2

Figure 35: Structure chimique du L-NIO. N⁵-(1-iminoethyl)-ornithine.

I.4. Activateur de la voie PKG/MEK 1,2/ERK1/2.

I.4.1. DEA-NOate, donneur chimique de NO.

Le DEA-NOate (Calbiochem Cat. N° 292500) est un donneur de NO, c'est-à-dire qu'au sein de la cellule ce dernier va se décomposer spontanément en solution selon une cinétique du premier ordre qui ne dépend donc que du pH et de la nature de l'amine (Wink DA et coll., 1993) (Figure 36).

<u>Figure 36:</u> Structure chimique du DEA-NOate. 2-(N,N-diethylamino)-diazenolate-2-oxide diethylammonium.

I.4.2. 8-bromo-cGMP, analogue du GMPc.

Le 8 Br-cGMP (Calbiochem Cat N° 203820) est un analogue perméable du GMPc, il est plus résistant à la phosphodiestérase que le GMPc. Il active préférentiellement la Protéine Kinase G (PKG) (Figure 37).

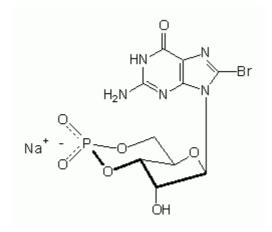


Figure 37: Structure chimique du 8 Br-cGMP.

1.5. Liste des Anticorps utilisés.

Anticorps	Caractéristiques
Anti-phospho Erk1/2 (T202/Y204) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique phospho T202/Y204 correspondant aux résidus trouvés à proximité de T202/Y204 de Erk1/2 humaines (Cell Signaling réf. 9101, distribué par Ozyme). Détecte les formes actives d'Erk1 et Erk2.
Anti-phospho p38 (T180/Y182) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique phospho T180/Y182 correspondant aux résidus trouvés à proximité de T180/Y182 de p38 humaine (Cell Signaling, réf. 9211). Détecte les formes actives de p38.
Anti-phospho Raf-1 (S338) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un phospho-peptide synthétique sur correspondant aux résidus trouvés à proximité de S338 de Raf-1 humaine (Cell Signaling, réf. 9121).
Anti-Erk1/2 (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique dérivé de la séquence d'Erk2 de rat. Détecte les formes totales d'Erk1/2 (Cell Signaling, réf. 9102).

Anti-p85 (IP)	Anticorps polyclonal produit au laboratoire par immunisation d'un lapin avec les protéines recombinantes correspondantes aux domaines SH2 N- et C- terminaux de la sous-unité p85 de la PI ₃ -Kinase fusionnée à une GST.
Anti-p110γ (WB et IP)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 331-530 de la pl10 γ humaine (Santa-Cruz Biotechnology, réf. sc-7177).
Anti-HA (IP)	Anticorps monoclonal dérivé de l'hybridome 12CA5 produit par la fusion de cellules de myélomes murines avec des splénocytes d'une souris immunisée avec un peptide YPDYVPDYA dérivé de la protéine hémagluttinine du virus Influenza humain. (Molecular Biochemicals réf. 1 666 606, Meylan, France).
Anti-Phospho Akt (S473) (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique (couplé à KLH) correspondant aux acides aminés situé autour de la serine 473 d'Akt murine. (Cell signaling, réf. 9271S).
Anti-Akt (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique (couplé à KLH) correspondant aux acides aminés situés en C-terminale de la séquence d'Akt murine. (Cell signaling, réf. 9272).
Anti-p38 (WB)	Anticorps monoclonal dérivé de l'hybridome résultant de la fusion de cellules de myélomes murines avec des cellules B de souris immunisées avec la protéine recombinante p38 (R&Dsystems, réf MAB869).
Anti MT1-MMP (WB)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 160-173 de la MT1-MMP humaine. (Calbiochem, réf. PC94L)
Anti-IgG de lapin couplé à la péroxydase (WB)	Anticorps secondaire permettant la détection en ECL (Cell Signaling, réf. 7074).
Anti-IgG de souris couplé à la péroxydase (WB)	Anticorps secondaire permettant la détection en ECL (Amersham Biosciences réf. NA931).

II. Méthodes.

II.1 Culture cellulaire.

II.1.1 Lignées utilisées.

II.1.1.1. Cellules endothéliales humaines issues de veine ombilicale (HUVECs).

Nous nous sommes procurés les cellules endothéliales humaines via la société PromoCell. Les cellules sont isolées selon les protocoles standard à partir de tissu humains normaux. Les cellules sont conditionnées en flacon de 25 cm² contenant 500 000 cellules. A la réception, le milieu de culture est remplacé par 10 mL de milieu de base (L-glutamine, NaHCO₃, antibiotiques) pour les cellules endothéliales, supplémenté avec 0,4 % (v/v) de facteurs de croissance épidermique (EGF), 1 µg/mL d'hydrocortisone, 1 ng/mL de facteur de croissance fibroblastique basique (FGFb), 50 ng/mL d'amphotéricine B et 50 µg/mL de gentamicine (milieu EGM). Après 12 à 48 heures d'incubation à 37°C sous atmosphère humide et en présence de 5 % (v/v) de CO₂, la subconfluence des cellules est observée : environ 80% de la surface de la boîte de culture est occupée par les cellules. Celles-ci sont alors trypsinisées, divisées en deux lots et remises en culture selon les instructions du fabriquant. Une boîte de culture contenant du milieu EGM (200 µl/cm²) est placée 30 minutes à 37°C sous atmosphère humide et en présence de 5 % (v/v) de CO₂. Les cellules sont ensuite rincées à l'aide d'une solution saline tamponnée par l'Hépes (HBSS) (constitué d'un tampon Hépes 10 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KCl 2,67 mM, NaCl 128 mM pH 7,2) et détachées par addition d'une solution de trypsine à 0,004 % (v/v) et EDTA à 0,03 % (p/v) dans le tampon HBSS (100 µl/cm²). Le détachement des cellules est suivi par observation sous microscope. Lorsque environ la moitié des cellules s'est détachée, la boîte de culture est délicatement agitée afin de détacher toutes les cellules. Le temps total de trypsinisation ne dois pas dépasser plus de 10 minutes. L'action de la trypsine est stoppée par addition d'une solution neutralisant la trypsine ou TNS (albumine sérique bovine, 0,1 % (p/v), inhibiteur de trypsine de soja, 0,05 % (p/v) dans le tampon HBSS, 100 µL/cm²). Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est remis en suspension dans 2 mL de milieu EGM. Un mL de cette suspension cellulaire est ensuite distribué dans les boîtes de culture préalablement placées à 37°C. Les cellules sont observées après 24 heures d'incubation ; au moins 80% des cellules doivent avoir adhérées. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu frais. Il est ensuite changé tous les deux jours jusqu'à subconfluence des cellules. Les cellules HUVECs sont utilisées entre le premier et le dixième passage.

II.1.1.2. Cellules endothéliales humaines issues de la microvasculature (HMECs).

La lignée de cellules HMECs (Human microvascular endothelial cells-1) a été fournie par le Dr. Ades (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). Les cellules HMECs sont représentatives de la microvasculature du derme et ont des propriétés similaires aux cellules issues de la culture primaire. Le milieu de culture contient 0,4 % (v/v) d'une solution supplémentée en facteur de croissance et d'héparine (ECGS/H), 5 % (v/v) de SVF, 10 ng/mL d'hydrocortisone, 50 ng/mL d'amphotericine et 50 ng/mL de gentamicine. Les conditions de culture sont identiques à celles des HUVECs. Les cellules HMECs sont utilisées entre le 25^{ème} et le 80^{ème} passage.

II.1.1.3. Lignée HT1080.

La lignée de cellules HT-1080 a été obtenue à partir de cellules humaines issues d'un fibrosarcome d'un mâle caucasien de 35 ans (Rasheed et coll., 1974). Le patient est décédé 3 mois plus tard sans avoir subi de chimiothérapie ou de radiothérapie. *Ex vivo*, ces cellules HT-1080 ont un fort pouvoir tumorigène.

II.1.2. Obtention de sous-cultures par trypsinisation.

Quand les cellules atteignent un état de confluence, elles sont soumises à une étape de trypsinisation afin d'obtenir un doublement de la population ce qui correspond à un « passage ». Elles sont rincées dans du PBS (phosphate ; 138 mM NaCl ; 2,7 mM KCl pH 7,4) puis détachées du flacon de culture par incubation pendant 5 minutes à 37°C en présence de trypsine (0,05 % (p/v)). Pour stopper l'action de la trypsine, du milieu à 10 % (v/v) de SVF est ajouté. Les cellules sont centrifugées à 1000 g pendant 5 min puis diluées dans du milieu contenant 10 % de SVF. Après numération des cellules grâce à une cellule de Thomas, le nombre de cellules désiré est ensemencé dans les flasques ou plaques de cultures adéquats. Toutes les cultures cellulaires sont effectuées à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de C0₂, Dans le cas des cultures d'entretien, le milieu est changé tous les 2 jours.

II.1.3. Mise au repos des cellules.

La mise au repos correspond à une privation en facteurs de croissance permettant d'une part que les voies de signalisation induites par ces derniers ne soient plus activées et d'autre part de synchroniser les cellules au même stade du cycle cellulaire, afin que celles-ci répondent de manière coordonnée à une stimulation par un agoniste. Les cellules cultivés dans les conditions précédemment décrites et ayant atteint un taux de confluence d'environ 90 %, sont lavés deux fois avec du PBS stérile (pH 7,4) thermostaté à 37°C afin d'éliminer le SVF

résiduel. Les cellules sont ensuite mises en présence de milieu en absence de SVF et de facteurs de croissance, pendant 18 heures à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de C0₂.

II.1.4. Stimulation des cellules.

Après la mise au repos, les cellules sont lavées une fois avec du PBS stérile (pH 7,4) thermostaté à 37°C. Dans le cas de l'utilisation d'inhibiteurs chimiques des voies de signalisation, les cellules sont préincubées de 1 heure à 3 heures en fonction de l'inhibiteur dans du milieu avant leur stimulation par les effecteurs. Les cellules sont ensuite stimulées pendant différents temps en présence de 1 μg/mL de kappa-élastine (Ke) ou de peptide synthétique (VGVAPG)₃. La réaction est stoppée par ajout de PBS glacé contenant 50 μM d'orthovanadate de sodium (Na₃VO₄), un inhibiteur de protéine tyrosylphosphatase (Gordon, 1991).

II.1.5. Formation de pseudo tubes par les cellules endothéliales cultivées sur un gel épais de matrigel.

Les cellules endothéliales cultivées sur un gel épais de Matrigel (Biosciences) (équivalent de la membrane basale) forment spontanément des structures en pseudotube (Cockerill et coll., 1995). Ces structures sont comparables à des capillaires sanguins mais sont non fonctionnels. Cette propriété est utilisée pour étudier les phénomènes de formation de nouveaux vaisseaux ou angiogenèse. 250 µL par puit d'une solution de Matrigel à 10 mg/mL sont déposés stérilement dans une plaque 24 puits. La formation du gel de Matrigel est obtenue par incubation de la plaque pendant 30 minutes à 37°C. Une culture de cellules endothéliales à sub-confluence est détachée de son support par addition de trypsine. Après neutralisation de la trypsine et centrifugation pendant 4 minutes à 220 g, elles sont remises en suspension dans le milieu EGM et amenées à une concentration de 300 000 cellules/mL après numération sous microscope à l'aide d'une cellules de Thomas. 100 μL de cette suspension cellulaire (soit environ 50 000 cellules) est déposée à la surface du gel de Matrigel. Après incubation pendant 30 minutes à 37°C sous atmosphère humide et en présence de 5 % (v/v) de CO₂, pour permettre l'adhésion des cellules à la surface du Matrigel, 500 µL de milieu de culture contenant, ou pas, les différents effecteurs sont ajoutés. Après 4 et 14 heures d'incubation pour les HUVECs et 24 heures pour les HMECs, la formation de pseudotubes est suivie par observation sous microscope et photographiée à l'aide d'un appareil photo numérique SONY DKC CM-30. La formation des pseudotubes est déterminée selon une méthode semi-quantitative décrite par Steenstrup (Steenstrup et coll., 2000), et que nous avons adaptée à nos besoins. A l'aide des fonctions de retouche d'image du logiciel Adobe Photoshop, les photos numériques obtenues sont transformées en noir et blanc. Les pseudotubes apparaissent en noir sur un fond blanc. La couleur noire est sélectionnée et le nombre de pixels noirs par rapport au nombre de pixels total est déterminé. Toutes les photos ayant été prises au même grossissement, le nombre de pixels noirs est donc proportionnel à la longueur des pseudotubes formés. La quantification a été réalisée sur 10 champs.

II.2. Techniques d'analyses des protéines.

II.2.1. Extraction des protéines à l'aide du tampon RIPA.

Les cellules à confluence sont rincées deux fois à l'aide d'un tampon PBS à 4°C. L'ensemble des étapes suivantes est effectué à 4°C afin d'éviter tout phénomène de dénaturation et d'inhiber les protéases qui pourraient dégrader ces dernières. Les cellules sont alors recueillies par grattage dans le tampon PBS. La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée pendant 5 minutes à 200 g. Le culot cellulaire est alors repris par un tampon RIPA (HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet-P40 1 % (v/v), Triton X-100 1 % (v/v), déoxycholate de sodium (p/v), SDS 0,1 % (p/v), iodoacétamine 5 mM, PMSF 1 mM, pH 7,4), 250 μL de RIPA sont utilisé pour un puit d'une plaque 6 puits. Afin de solubiliser les protéines membranaires, la suspension cellulaire est soumise à 5 aspirations successives au travers d'une aiguille de 21 G (Gauge) et ensuite incubée pendant 15 minutes. Après centrifugation à 12 500 g pendant 5 minutes, le surnageant est récupéré et son contenu en protéine est déterminé selon la méthode de Lowry ou de Bradford selon les cas.

II.2.2. Dosage des protéines.

II.2.2.1. Dosage par la méthode de Lowry (Lowry et coll., 1951).

Cette technique de dosage de protéines a été adaptée pour limiter au maximum le volume de la prise d'essai. Elle n'a pu être réalisée qu'en absence de détergent dans l'échantillon (SDS, Triton X-100,...). Le réactif de dosage est préparé extemporanément à partir de 3 solutions : A (Na₂CO₃ 2 % (m/v) dans NaOH 0,1 M), B (tartrate de sodium et potassium 2 % (m/v)) et C (CuSO₄ et SH₂O 1 % (m/v)). Les échantillons sont agités au Vortex et centrifugés 2 minutes à 10 000 g afin d'éliminer toutes particules en suspension. Par la suite, 20 µL d'échantillons sont mélangés à 68 µL de réactif de dosage (4,9 mL de solution A, 0,005 mL de la solution B et 0,05 mL de la solution C) et 10 µL d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu de phénol 60 % (v/v). Les tubes sont agités au vortex puis incubés 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. L'intensité de la coloration obtenue est évaluée par mesure de l'absorbance à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Parallèlement,

une droite d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une solution d'albumine bovine (de 0 à 1 mg/mL). Les concentrations de protéines sont exprimées en mg/mL.

II.2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Cette technique est basée sur le principe de la variation de couleur du bleu de Coomassie G-250 par l'interaction avec différentes concentrations de protéines. On mélange 10 µL d'échantillon avec 790 µL d'eau distillée et 200 µL de réactif « Bio-Rad Protein Assay ». On agite vigoureusement et on incube 15 minutes à température ambiante, on mesure alors l'absorbance à 595 nm. On réalise en parallèle, et dans les mêmes conditions, une gamme d'étalonnage avec une solution d'albumine bovine permettant ainsi de déterminer la concentration en protéines de nos échantillons.

II.2.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium.

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) selon la méthode décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Les échantillons sont mis en suspension dans le tampon d'échantillon (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2 % (p/v), glycérol 5 % (v/v), bleu de bromophénol 0,001 % (p/v) pH 6,8), ils sont ensuite réduits en présence de 0,1 % mM de DTT ou de β-mercaptoéthanol. Un gel de polyacrylamide à 10 % ou 5 % (p/v) (selon la masse moléculaire des protéines à séparer) est préparé (Tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1 % (p/v), APS (persulfate d'ammonium) 0,05 % (p/v), TEMED (N,N,N',N'-Tetre-méthylènediamine) 0,05 % (p/v), pH 8,8). Les échantillons ainsi que des témoins de masse moléculaire sont déposés en parallèle. Le gel est alors soumis à un courant d'une intensité de 10 mA pendant 30 minutes puis 20 mA pendant 1 heure 30 permettant respectivement la concentration et la migration des échantillons (tampon de migration : Tris 25 mM, SDS 0,1 % (p/v), glycocolle 192 mM pH 8,3). Après migration, le gel est démoulé, les protéines présentes dans le gel peuvent être soit colorés au bleu de Coomassie R-250 (0,025 % (p/v)) soit être électrotransférées sur membranes de nitrocellulose puis immunorévélées.

II.2.4. Electrotransfert et Immuno-révélation des protéines.

Les protéines séparées par SDS-PAGE peuvent être révélées par la technique de Western Blot selon la méthode décrite par Towbin (Towbin et coll., 1979). Après migration, le gel d'électrophorèse est équilibré 20 minutes dans le tampon de transfert (Tris 48 mM, Glycocolle 39 mM, méthanol 20 % (v/v) pH 8,2). Les protéines sont alors électrotransférées sous une tension de 15 Volt pendant 1 heure à température ambiante sur une membrane de

polyvinyldifluorate (PVDF) Immobilon-P. La mise au contact du gel est réalisée à l'aide du système Trans Blot Cell de Bio-Rad et se déroule durant 45 minutes. Après électrotransfert, la membrane est rincée avec le tampon TBS-T (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 % (v/v) pH 7,6). Le gel est ensuite coloré à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie R-250 afin de vérifier que la migration et le transfert des protéines ont bien eu lieu. La membrane est incubée pendant 1 heure en présence de TBS-T + 5 % (p/v) de lait déshydraté sous agitation en vue de saturer les sites de liaisons non spécifiques. La membrane est ensuite mise en présence du premier anticorps pendant 2 heures à température ambiante (ou une nuit à 4°C) puis en présence de l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase. Entre chaque incubation, la membrane est lavée une fois 10 minutes puis 3 fois 5 minutes avec le tampon TBS-T. La présence de la phosphatase alcaline est révélée par incubation de la membrane pendant 10 minutes à l'aide d'un substrat chromogène spécifique : le 5-bromo-4chloro-3-indolyl phosphate et le nitro bleu de tétrazolium (BCIP/NBT) (Sigma Fast). Après révélation, la membrane est rincée dans de l'eau distillée, séchée puis photographiée. L'activité peroxydase est révélée à l'aide d'un kit de détection par chimioluminescence (ECLTM Westren Blotting detection reagent) sur un film de photographie (HyperfilmTM ECL). Lorsque cela est nécessaire, les anticorps sont découplés de la membrane par incubation à 55°C pendant 30 min dans une solution composée de 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7; 2 % SDS (p/v) et 100 mM β-mercaptoéthanol. 5 lavages de 1 heure avec du TBS-T contenant 0,02 % NaN₃ (v/v) permettent d'éliminer le β-mercaptoéthanol. La membrane est ensuite saturée avec la solution de blocage et incubée avec les anticorps selon le protocole décrit précédemment.

II.2.5. L'immunoprécipitation.

Après stimulation et arrêt de la réaction, les cellules sont lavées une fois avec du PBS à 4°C contenant 50 μ M Na₃VO4, récupérées par grattage dans le même tampon puis centrifugées à 375 g / 10 min / 4°C. Les cellules sont alors lysées pendant 15 min à 4°C avec 250 μ L de tampon de lyse 1 % (1 % (v/v) Brij 98 (Sigma) ; 10 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCI ; 5 mM EDTA ; 10 % glycérol (v/v)) contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases précédemment cité et 1 mM Na₃VO₄. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation (20 000 g / 20 min / 4°C). Les concentrations protéiques des surnageants sont déterminées à l'aidede la technique de Bradford, et des aliquotes de concentration en protéines identiques sont incubées avec une quantité adéquate d'anticorps spécifiques pendant 1 heure à 4°C. Les complexes antigène-anticorps ainsi formés sont récupérés précipités par incubation avec 40 μ L de protéine G couplées à des billes de sépharose pendant une heure sous agitation rotative. Les complexes protéine G-antigène-anticorps sont alors lavés une fois avec du tampon de lyse 1 %, puis trois fois avec du tampon de lyse 0,1 % (0,1 % (v/v) Brij 98 ; 10

mM Tris/HCI pH 7,4 ; 150 mM NaCL ; 5 mM EDTA ; 10 % (v/v) glycérol ; 1 mM Na₃VO4). L'utilisation de Brij 98, détergeant ionique doux, permet de maintenir 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 échantillon 5 X puis portées à ébullition 5 min. Après centrifugation (10 000 g / 1 min / 4°C), les protéines présentes dans le surnageant sont conservées à -80°C avant analyse.

II.2.6. Test d'activité PI₃Kinase.

Les cellules (8.10⁶) sont traitées comme décrit précédemment (II.2.5.) et une quantité égale de protéines est incubée avec 10 µL d'anticorps anti-p85 préparés dans notre laboratoire ou 2,5 µg d'anti-p110y. Les complexes protéine G-antigène-anticorps sont alors lavés une fois avec du tampon de lyse 1 %, deux fois avec du tampon de lyse 0,1 % ((0,1 % Brij 98 (v/v), 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 % (v/v) glycérol, 1 mM Na₃VO₄)) et enfin deux fois avec du tampon d'activité PI₃Kinase (100 mM NaCl ; 50 mM MgCl₂ ; 25 mM Hépès ; 200 µM adénosine ; pH 7,4). Un volume d'une solution de phosphatidylinositol (PI) (10 mg/ml) est mélangé avec un volume de solution de PS (10 mg/ml) puis sont évaporés sous N₂. 500 μL d'une solution d'ATP (2,5 μM) préparée extemporanément dans le tampon PI₃Kinase sont ensuite ajoutés au mélange PI et PS évaporé. Ce mélange est ensuite soumis à sonication trois fois 10 secondes dans la glace afin de former des micelles PI-PS. Sur le culot de complexes protéine G-antigène-anticorps, 70 µL de solution de micelles additionné de 10 μCi ATP (γ-³²P) (Amersham Biosciences, Saclay, France) sont ajoutés et incubés pendant 15 min à 30°C. La réaction est arrêtée par ajout de 100 μL HCl 1 N et de 350 μL CHCl₃/CH₃0H (1/1, v/v). Les échantillons sont ensuite mélangés et centrifugés (2 min, 1000 g). Après élimination de la phase supérieure, la phase inférieure chloroformique contenant les phospholipides est lavée deux fois avec 200 µL CH₃0H / HCl 1 N (1/1, v/v), prélevée (110 μL), puis évaporée sous azote. Les phospholipides sont dilués dans 30 µL de mélange CHCl₃ / CH₃0H (95/5, v/v) et déposés à l'aide d'une seringue Hamilton sur une plaque de silice pré-activée par pulvérisation avec de l'oxalate de potassium 2 % (v/v) et incubation 45 min à 120°C. La migration est réalisée dans le solvant CHC1₃ / CH₃0H / C₃H₆0 / CH₃C00H / H₂0 (40/13/15/12/7, v/v/v/v). Les phospholipides sont tout d'abord révélés par saturation des doubles liaisons avec l'iode, et le PIP radioactif est révélé par autoradiographie.

II.2.7. Zymographie en gel de gélatine.

II.2.7.1. Préparation des milieux conditionnés.

Pour l'obtention de milieux conditionnés, les cellules sont stimulées pendant 24 heures puis centrifugés à 400 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants correspondant aux milieux de culture sont stockés à -80°C jusqu'à leur analyse.

II.2.7.2. Zymographie en gel de gélatine.

Cette technique d'électrophorèse en gel-substrat permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire, et la détection des gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) présentes dans les milieux conditionnés. Un volume égal de milieu est dilué dans du tampon échantillon 5 x non réducteur (0,5 M Tris / HCl pH 6,8 ; 0,5 % Bleu de Bromophénol (p/v); 10 % SDS (p/v); 20 % saccharose (p/v)). Les échantillons sont ensuite analysés par SDS-PAGE contenant 0,1 % (p/v) de gélatine. La migration s'effectue à 4°C pendant 30 min sous une tension constante de 90 V dans un tampon de migration (25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glycocolle; 0,1% (p/v) de SDS) puis 1 h 30 à 140 V. A l'issu de la migration, le gel est lavé 2 fois pendant 30 min dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (v/v). Ce détergeant permet d'éliminer le SDS et de restaurer l'activité des gélatinases. Le gel est alors mis à incuber une nuit à 37°C dans un tampon d'incubation (52 mM Tris / HCl pH 7,2; 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ (2H₂O)) favorisant la protéolyse de la gélatine par les gélatinases initialement présentes dans le milieu de culture. Après incubation, le gel est coloré pendant 30 min dans une solution de bleu de Coomassie G-250 (1 g dans un mélange (eau/éthanol/acide acétique (215/250/35 v/v)) puis décoloré pendant 1 h dans la même solution sans bleu G-250. Les MMPs possédant une activité gélatinolytique laissent apparaître une plage de lyse blanche sur un fond bleu.

II.2.8. Immunofluorescence in situ.

L'immunofluorescence est une technique permettant de visualiser la position intracellulaire d'une protéine en utilisant un anticorps primaire spécifique et un anticorps secondaire couplé à un fluorophore tel le FITC ou la rhodamine. Le fluorophore est excité à une longueur d'onde distincte et la réémission est observée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Puisque les cellules sont fixées au support solide, il est possible de prendre un "instantané" de la position des protéines dans la cellule. Cette technique permet aussi d'étudier la colocalisation de plusieurs protéines en utilisant différents fluorophores. Pour l'immunofluorescence que nous avons effectué, des cellules HMECs ont été cultivées dans des plaques 24 puits au fond desquelles nous avions préalablement déposé une lamelle de

verre. 500 µL de milieu contenant 3 x 10⁵ cellules HMECs ont été déposés dans les puits. Les cellules ont été mises en culture à 37°C jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence (24-48 heures). Pour fixer les cellules, les lamelles ont été immergées dans une solution 4 % (v/v) paraformaldéhyde / 0.1 % (v/v) Triton X-100 pendant 10 minutes puis lavées 3 fois avec du PBS. La perméabilisation des cellules a été effectuée dans une solution 0.1 % citrate de sodium / 0.1 % Triton X-100 pendant 2 minutes sur la glace. Nous avons lavé les lamelles 2 fois avec du PBS. Une fois le PBS aspiré, 250 µL de la solution d'anticorps primaire diluée au 1/100 eme ont été déposés sur les cellules puis incubés toute la nuit à 4°C dans une boîte de Pétri contenant du coton mouillé afin d'éviter l'assèchement des cellules. Le lendemain, les cellules ont été lavées 2 fois avec une solution de PBS / Tween-20 0.1 % (v/v) pendant 10 minutes. Dans le noir, 250 μL d'anticorps secondaire couplé à la FITC dilué au 1/100 ème dans le PBS / BSA 1 % (p/v) ont été déposé sur les lamelles et laissée pendant 30 minutes à la température de la pièce. Le tout a été aspiré et les cellules lavées 2 fois 10 minutes avec du PBS / Tween-20 0.1 % (v/v). Nous avons ensuite ajouter sur les lamelles une solution empêchant l'atténuation du signal fluorescent (« DAKO fluorescent mounting medium ») et permettant de fixer les lamelles sur des lames. La fluorescence est observée sur un microscope Zeiss.

II.2.9. Dosage par Elisa de la MT1-MMP.

Le dosage de la MT1-MMP est effectué à l'aide du kit MMP-14, Biotrak Activity Assay system (Amersham biosciences). Les cellules (HMECs) sont cultivées à confluence sur plaque 24 puits dans un milieu complet (10 % SVF (v/v)). Après 24 heures d'incubation en présence des peptides d'élastine et/ou de différents effecteurs, le milieu est éliminé et 250 μL de tampon d'extraction sont ajoutés dans chaque puits et incubés durant 15 minutes à 4°C. 100 μL d'échantillons sont déposés dans chaque puits d'une plaque à 96 puits coatée avec des anticorps anti-MMP-14 puis incubés durant une nuit en chambre froide (2-8°C). Après quatre rinçages à l'aide du tampon de lavage, 50 μL du tampon d'analyse sont introduits dans chaque puits puis après avoir vortexé, on y ajoute 50 μL de réactif de détection. Après 20 secondes d'homogénéisation, une lecture de l'absorbance à 405 nm est réalisée correspondant à la valeur t₀. La plaque est alors incubée durant 2 h 30 à 37°C avant de réaliser la lecture finale au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm.

II.3. Utilisation d'un dominant négatif Akt.

Les cellules sont préalablement co-transfectés avec le vecteur codant le dominant négatif Akt (Akt-^{DN}) et un vecteur permettant la surexpression de la cible physiologique d'Akt qui est ERK 1 (pECE-HA-ERK1). Cette cible sera marquée avec HA facilitant ainsi son

immunoprécipitation. Les cellules sont traitées comme décrit précédemment (II.2.5.) et une quantité égale de protéine est soumise à une immunoprécipitation avec 3 µg d'anti-HA. A la fin de l'immunoprécipitation, les extraits sont déposés sur gel SDS-PAGE et analysés par western-blot avec des anticorps anti-phospho ERK 1/2 et anti-ERK1/2 totale.

II.4. Cytokine arrays.

Le kit « Human Cytokine Array » nous a été fourni par la société RayBiotech. Une série d'anticorps dirigés contre un certain nombre de cytokines pro angiogéniques, est fixée sur une membrane de nitrocellulose. Les milieux conditionnés de cellules endothéliales traités ou non par les PDE sont incubés durant 1 à 2 heures à température ambiante avec la membrane préalablement activée à l'aide d'un tampon adéquat. La membrane est ensuite lavée 2 à 3 fois à l'aide d'un tampon de lavage puis incubée durant 1 à 2 heures à température ambiante en présence d'un anticorps couplé à la biotine. Après 2 ou 3 lavages, la membrane est alors incubée en présence de la péroxydase HRP (HorseRadish Peroxidase) couplée à la stréptavidine durant 30 à 60 minutes. .Après un bref rincage, on procède à la révélation en ajoutant sur la membrane 1 mL du tampon de détection durant 1 minute à température ambiante. La membrane est enfin exposée à un film photosensible.

II.5. Dosage du monoxyde d'azote (NO).

Le dosage de la production de NO par les cellules HMECs, se fait à l'aide du kit ELISA total NO (R&D SYSTEMS). Ce kit utilise la réaction de Griess :

$$NO+O_{2} \longrightarrow ONO_{2}^{-} \longrightarrow NO_{3}^{2-} + H^{+}$$

$$2 NO + O_{2} \longrightarrow N_{2}O_{4} \longrightarrow NO_{2}^{-} + NO_{3}^{-} + 2H^{+}$$

$$NO + NO_{2}^{-} \longrightarrow N_{2}O_{3} \longrightarrow 2NO_{2}^{-} + 2H^{+}$$

$$H_{2}O$$

Les cellules HMECs sont cultivées en plaques 12 puits dans un milieu complet en présence de 2 % (v/v) de SVF. Au bout de 24 heures, après lavage par le PBS, le milieu est changé par un milieu sans sérum contenant des peptides d'élastine à différentes concentrations. Les cellules sont incubées à 37°C et 5 % de CO₂ pendant 45 minutes. Ensuite, les milieux sont récupérés et analysés comme suit : dans une plaque 96 puits, nous ajoutons 200 μL de tampon de réaction dans le puit correspondant au blanc et 50 μL dans le puit de la gamme d'étalonnage correspondant à 0 μmol/L de nitrite. Dans les autres puits de la gamme d'étalonnage, nous mettons 50 μL d'une solution étalon de nitrite. Ensuite, nos échantillons (50 μL) sont déposés dans les autres puits. Puis, nous rajoutons dans les puits de la gamme et

des échantillons 50 μL de NADH et 25 μL de nitrate réductase. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 30 minutes. A la fin de l'incubation, nous rajoutons alors 50 μL de réactif I de Griess et 50 μL de réactif II de Griess. Le tout est incubé à température ambiante pendant 10 minutes. La lecture de la plaque se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm. Les résultats sont exprimés en μmol/mL.

II.6. Technique de biologie moléculaire.

II.6.1. L'interférence par l'ARN.

II.6.1.1. Stratégie.

- 1^{er} étape : la sélection des cibles

La sélection est réalisée selon les critères définis par Elbashir à partir de la séquence en ADNc de la cible. A partir du codon ATG (correspondant au codon AUG de départ de notre ARNm cible (MT1-MMP) toutes les séquences commençant par les dinucléotides AA sont repérées. Les cibles choisies seront constituées de ce dinucléotide et des 19 paires de bases suivantes. Il est admis que l'activité des siARN est maximale lorsque le pourcentage de G/C est compris entre 30-50%. Les séquences cibles ne doivent pas être présentes dans les régions 5' et 3' UTRs ainsi que dans les 75 premières paires de bases suivant le codon AUG afin d'éviter toute interférence avec les protéines régulatrices de la transcription ou de la traduction pouvant s'y fixer.

D'après tous ces critères, les séquences cibles choisies et leurs positions dans la séquence (à partir du codon AUG) que nous avons sélectionnées sont les suivantes (Figure 38):

*	position 107	5'-AAGCCTGGCTACAGCAATATG-3'
*	position 228	5'-AACAGGCAAAGCTCATGCGAA-3'
*	position 949	5'-AACATCTGTGACGGGAACTTT-3'
*	position 1462	5'-AACCAGAAGCTGAAGGTAGAA-3'

TGCAGACACCATGAAGGCCATGAGGCGCCCCCGATGTGGTGTTCCAGACAAGTTTGGGGGCTGAGATCAAGGCCAATGTTC GAAGGAAGCGCTACGCCATCCAGGGTCTCAAATGGCAACATAATGAAATCACTTTCTGCATCCAGAATTACACCCCCAAG GTGGGCGAGTATGCCACATACGAGGCCATTCGCAAGGCGTTCCGCGTGTGGGAGAGTGCCACACCACTGCGCTTCCGCGAG GTGCCCTATGCCTACATCCGTGAGGGCCATGAGAAGCAGGCCGACATCATGATCTTCTTTGCCGAGGGCTTCCATGGCGAC AGCACGCCCTTCGATGGTGAGGGCGGCTTCCTGGCCCATGCCTACTTCCCAGGCCCCAACATTGGAGGAGACACCCACTTTG ACTCTGCCGAGCCTTGGACTGTCAGGAATGAGGATCTGAATGGAAATGACATCTTCCTGGTGGCTGTGCACGAGCTGGGC GTGCTGCCCGATGATGACCGCCGGGGCATCCAGCAACTTTATGGGGGGTGAGTCAGGGTTCCCCACCAAGATGCCCCCTCAA CCCAGGACTACCTCCCGGCCTTCTGTTCCTGATAAACCCAAAAACCCCACCTATGGGCCC₉₄₉AACATCTGTGACGGGAACTT TGACACCGTGGCCATGCTCCGAGGGGAGATGTTTGTCTTCAAGGAGCGCTGGTTCTGGCGGGTGAGGAATAACCAAGTGA GCAAATTCGTCTTCTCAAAGGAGACAAGCATTGGGTGTTTGATGAGGCGTCCCTGGAACCTGGCTACCCCAAGCACATT AAGGAGCTGGGCCGAGGGCTGCCTACCGACAAGATTGATGCTGCTCTCTTCTGGATGCCCAATGGAAAGACCTACTTCTTC CGTGGAAACAAGTACTACCGTTTCAACGAAGAGCTCAGGGCAGTGGATAGCGAGTACCCCAAGAACATCAAAGTCTGGGA GGAAATTCAAC₁₄₆₂AACCAGAAGCTGAAGGTAGAACCGGGCTACCCCAAGTCAGCCCTGAGGGACTGGATGGGCTGCCCAT CGGGAGGCCGGCCGGATGAGGGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGTGATCATTGAGGTGGACGAGGAGGGCGGCGGGGGCG GCCATGGGACCCCCAGGCGACTGCTCTACTGCCAGCGTTCCCTGCTGGACAAGGTC

<u>Figure 38:</u> Localisation des cibles sélectionnées choisies sur l'ADNc de la MT1-MMP humaine.

- 2^{ème} étape : spécificité des cibles choisies

Cette étape va consister à s'assurer que les siARN reconnaîtront uniquement la région cible choisie et aucune autre sur le génome ce qui pourrait interférer sur leurs spécificités d'action. Pour cela un Blast est réalisé sur le génome humain avec les 4 séquences cibles choisies afin de s'assurer que seul le gène de la MT1-MMP soit reconnu.

-3^{ème} étape : contrôle négatif

Afin de s'assurer de la spécificité de nos siARN, pour chaque cible choisie, un siARN dégénéré est synthétisé, qui nous servira de témoin négatif : pour cela 4 paires de bases situées au centre de la séquence sont permutées entre elles de façon aléatoire. Ces siARN ne devraient donc avoir aucun effet sur l'expression du gène d'intérêt.

II.6.1.2. Synthèse des siARN.

Nous avons choisi de synthétiser les siARN par une technique transcriptionnelle *in vitro* (Figure 39). Pour chaque siARN un oligonucléotide sens et antisens est synthétisés possédant à leurs extrémités 3', la séquence CCTGTCTC permettant l'hybridation avec le promoteur T7 et qui sera le point de départ pour la synthèse du brin complémentaire par l'enzyme de Klenow (ADN polymérase I dépourvue de son activité 5' exonucléase).

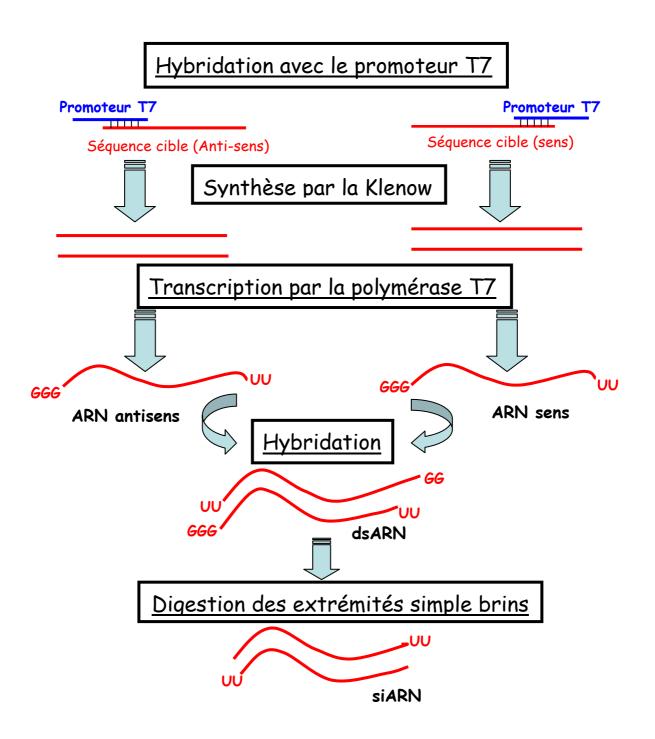


Figure 39: Schéma des différentes étapes de synthèse des siARN.

II.6.1.2.1. Préparation des oligonucléotides.

Les oligonucléotides lyophilisés sont repris par un volume adéquat d'eau dépourvue de nucléase afin d'atteindre une concentration de 200 μ M. La concentration est ensuite vérifiée par lecture de l'absorbance à 260 nm sur l'échantillon dilué 250 fois. On prépare une solution finale (20 μ L) à 100 μ M.

II.6.1.2.2. Hybridation avec le promoteur T7.

L'hybridation entre l'oligonucléotide et le promoteur T7 est réalisée de la manière suivante (dans cet ordre) :

- 2 µl T7 promoteur primer
- 6 µl Tampon d'hybridation
- 2 µl Oligonucléotide sens ou antisens

L'hybridation est effectuée 1 minute à 90°C puis 1 heure à 37°C.

II.6.1.2.3. Synthèse par l'enzyme de Klenow.

La synthèse par la Klenow est réalisée en ajoutant les composés suivants à la réaction d'hybridation réalisée précédemment (dans cet ordre) :

- 2 μl 10x Klenow tampon de réaction
- 2 µl 10x dNTP Mix
- 4 µl Eau stérile
- 2 μl Exo-Klenow

L'ensemble est ensuite incubé 45 minutes à 37°C.

II.6.1.2.4. Transcription par la polymérase T7.

La transcription par la T7 polymérase est réalisée en ajoutant au produit de synthèse de la Klenow les éléments suivants (dans cet ordre) :

- 2 µl Echantillon sens ou antisens
- 4 µl Eau stérile
- 10µl 2x dNTP Tampon de réaction
- 2 μl 10x T7 Tampon Réaction
- 2 µl T7 enzyme Mix

L'ensemble est mélangé doucement puis incubé 2 heures à 37°C.

II.6.1.2.5. Formation du dsRNA.

Les échantillons sens et antisens sont combinés puis incubés à 37°C durant la nuit.

II.6.1.2.6. Digestion par la Dnase et la Rnase.

On ajoute ensuite au produit de réaction les éléments suivants (dans cet ordre) :

- 6 μl Tampon de digestion
- 46,5 µl Eau stérile
- 4 μl RNase

• 3,5 μl DNase

L'ensemble est mélangé doucement et incubé au moins 2 heures à 37°C. Cette étape a pour but d'éliminer les fragments d'ARN non appariés ainsi que l'ADN.

II.6.1.2.7. Purification des siARN.

La purification est réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne disposant d'un filtre à son extrémité. 400 μl de tampon de fixation sont ajoutés à la réaction de digestion par les nucléases, puis l'ensemble est incubé à température ambiante durant 2 à 5 minutes. Une colonne d'affinité est disposée au dessus d'un tube de 2 ml, et on y ajoute 100 μl de tampon de lavage. Le siARN présent dans le tampon de fixation est alors ajouté puis le dispositif est centrifugé à 10 000 g durant 1 minute. L'éluât est alors éliminé puis la colonne est replacée sur le tube. On y ajoute alors 500 μl de tampon de lavage puis on centrifuge à 10 000 g pendant 1 minute. Cette étape est ensuite répétée une seconde fois. Afin de récupérer les siARN purifiés, on ajoute au filtre 100 μl d'eau DEPC préchauffée à 75°C durant 2 minutes à température ambiante. Enfin, après une centrifugation à 12 000 g pendant 2 minutes, les siARN ainsi élués et purifiés sont titrés et peuvent être conservés à –20°C ou –80°C pendant environ 3 mois.

II.6.1.3. Marquage des siARN à la Cyanine 3.

Cette étape va nous permettre de marquer les duplex d'ARN synthétisés à l'aide d'un agent fluorescent : la Cyanine, nous permettant ainsi d'apprécier qualitativement le rendement de transfection ainsi que la localisation intracellulaire des siARN. Ce marquage peut se réaliser sur un seul ou sur les deux brins d'ARN. La réaction est basée sur l'attaque nucléophile d'un groupement amine de l'ARN sur un groupement ester afin de former l'espèce fluorescente (Figure 40).

R'= groupe fluorescent

Figure 40: Principe du marquage des siARN (ou tout autre ARN) à la Cyanine3.

L'excitation est réalisée à 548 nm, l'émission est quand à elle observée à 562 nm. Le mélange suivant est réalisé :

18,3 μl Eau dépourvue de nucléase
5,0 μl 10x tampon de marquage
19,2 μl Duplex d'ARN (à 20 μM)
7,5 μl Cyanine 3

Ensuite on laisse incuber 1 heure à 37°C à l'obscurité. 15 μl de NaCl 5 M ainsi que 125 μl d'éthanol 100 % froid sont ajoutés au mélange réactionnel puis l'ensemble est incubé au moins 45 minutes à -80°C. On réalise ensuite une centrifugation pendant 15 à 20 minutes à 8000 g. Le surnageant est alors jeté et le précipité (de couleur rouge) est repris par 175 μl d'éthanol à 70 % (v/v). Enfin on réalise une dernière centrifugation à 8 000 g pendant 5 minutes à la fin de laquelle le surnageant est éliminé. Le culot est alors séché à l'air pendant 5 à 10 minutes puis repris par 20 μl d'eau stérile.

II.6.1.4. Transfection des siARN.

L'introduction de fragment d'ARN double brin au sein de la cellule nécessite la présence d'un agent transfectant. Lors de nos travaux, l'agent de transfection utilisé fut l'oligofectamine. Afin obtenir un rendement de transfection optimum, le nombre de cellules à ensemencer dans chaque puits est déterminé afin d'atteindre 60 % de confluence le jour de la transfection. L'oligofectamine ainsi que le siARN sont incubés séparément dans le milieu de culture sans sérum ni antibiotique durant 10 minutes à température ambiante, avant d'être mélangés. Après une incubation de 20 minutes à température ambiante le mélange est ajouté aux cellules.

II.6.1.5. Plasmide codant les siARN.

II.6.1.5.1. Construction des cassettes siARN.

Les duplex d'ARN ciblant l'ARNm de la MT1-MMP seront transcrits à partir de cassettes d'ADN doubles brins insérées dans un vecteur d'expression. Ces cassettes reprennent le schéma général représentéau niveau de la figure 41 :

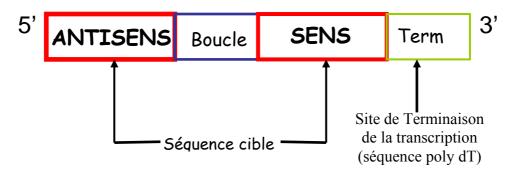
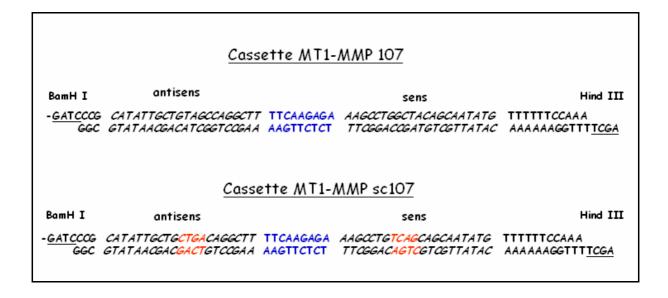


Figure 41: Schéma d'une cassette codant pour un siARN.

Chaque cassette d'ADN est composée de deux oligonucléotides possédant deux sites de restriction distincts à leur extrémités 5' et 3', ce qui permettra leur insertion dans le vecteur d'expression. L'oligonucléotide sens est flanqué du site BamHI en 5', alors que l'oligonucléotide anti-sens est flanqué du site Hind III en 3' (Figure 42). La séquence en nucléotide de la boucle libre qui permet le repliement du brin d'ARN transcrit a été choisie afin d'être reconnue par Dicer. Récemment il a été remarqué que les cassettes antisens-sens étaient plus efficace que les cassettes sens-antisens. Les oligonucléotides sont solubilisés dans de l'eau DEPC à une concentration de 1 μ g/ μ l. Leur hybridation est réalisée à 95°C durant 10 minutes via un appareil à PCR qui est ensuite éteint afin de laisser descendre progressivement la température durant toute la nuit. La quantité d'ADN bicaténaire est calculée par spectrophotométrie (absorbance à 260 nm, une unité d'absorbance correspondant à 50 μ g d'ADN/mL).



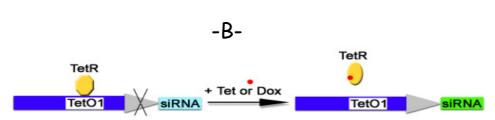
<u>Figure 42:</u> Construction de la cassette siARN 107 (a) et du siARN dégénéré sc107 correspondant (b). Les séquences en rouge correspondent aux séquences qui ont été permutées aléatoirement pour le siARN dégénéré.

II.6.1.5.2. Le vecteur d'expression pRNA Tin H1.2/Neo.

Pour cloner les cassettes siARN, nous avons utilisé le vecteur d'expression pRNA Tin H1.2/Neo (GenScript Corporation Cat. n°SD1223) représenté ici au niveau de la figure 43. Ce vecteur possède une séquence codant la GFP (Green fluorescent Protein) et des gènes de résistances pour une sélection aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Mais la particularité de ce vecteur réside dans son promoteur inductible H1.2. Sur ce promoteur peut se fixer un répresseur tétracycline (TetR), exprimé par le vecteur pcDNA6/TR (Invitrogen Cat. n°V1025-20), réprimant ainsi la transcription de la cassette d'ADN en absence de tétracycline. En présence de cet antibiotique, il y a dissociation du répresseur du promoteur, et synthèse du duplex d'ARN (siARN) (Figure 43 bis). Ce système est intéressant du fait que l'on puisse contrôler l'expression des siARN, et ainsi moduler l'invalidationde la MT1-MMP. Le vecteur pRNATin H1.2/Neo a subit une étape d'extraction et de purification. Il a été extrait des bactéries αDH5, préalablement transformées puis congelées. Le vecteur est quantifié par spectrophotométrie et une vérification de sa pureté est effectuée par électrophorèse en gel d'agarose 1 % (p/v) contenant du BET, dans un tampon TAE 1 X (Trisacétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8).



<u>Figure 43:</u> Vecteur d'expression pRNA TIN H1.2/Neo. (A) Représentation schématique du vecteur pRNA Tin H1.2/Neo. Le site multiple de clonage (MCS) se situe après le promoteur H1.2. Le vecteur possède un gène de résistance pour les transformations (Ampicilline) et un pour les transfections (Néomycine).



<u>Figure 43 bis:</u> Vecteur d'expression pRNA TIN H1.2/Neo. (B) Contrôle de la production des siARN par la fixation d'un répresseur tétracycline TetR sur l'opérateur Tet01 du promoteur H1.2, en absence ou en présence de tétracycline.

II.6.1.5.3. Insertion des cassettes de siARN.

Nous avons inséré la cassette d'ADN codant le duplex ARN dans le site multiple de clonage, entre les sites de restrictions BamH I et Hind III. Pour cela, les cassettes possèdent les sites suscités à leurs extrémités, comme décrit auparavant. Au préalable, il est nécessaire de procéder à un clivage enzymatique du vecteur circulaire pRNA Tin H1.2/Neo. Le vecteur est digéré par les enzymes Roche, BamHI (6 U/µg de pRNA Tin H1.2) et Hind III (6 U/µg de pRNA Tin H1.2) dans un même tampon (Tris-HC1 10 mM, MgCl₂ 5 mM, NaC1 100 mM, 2-mercaptoéthanol 1 mM, pH 8) pendant une heure à 37°C. La digestion terminée, une électrophorèse en gel d'agarose 1% (p/v) est réalisée pour d'une part vérifier la linéarisation du vecteur et d'autre part pour procéder à une étape de purification du vecteur clivé via la technique d'électroélution (Eluta TubeTM DNA extraction kit, Fermentas). Cette technique consiste à extraire l'ADN du gel d'agarose. Nous avons ensuite effectué la ligation des inserts (cassettes d'ADN) avec pRNA TinH1.2/Neo par la T4 DNA ligase pendant 20 minutes à température ambiante. Le produit de ligation a été vérifié en gel d'agarose 1 % (p/v).

II.6.1.5.4. Clonage du plasmide.

En vue d'isoler une souche comportant le plasmide (vecteur d'expression qui a intégré l'insert), nous avons transformé les bactéries αDH5 compétentes. Pour l'étape de transformation, nous avons utilisé des bactéries compétentes et qui sont donc capables d'intégrer le plasmide en leur sein. Dans un premier temps, nous mettons donc en contact 25 μl de bactéries en présence de 1 μg de plasmide. Après avoir mélanger doucement, l'ensemble est placé à 42°C durant 90 secondes précisément puis sur glace afin de créer un choc thermique permettant ainsi aux plasmides de pénétrer dans les cellules. Au même moments, des boites de culture (boites de pétri) sont préparées en y ajoutant 10 mL de milieu LB/agarose contenant 1 μg/mL de ampiciline. Le produit de transformation est ensuite déposé dans la boite de pétri, homogénéisé, puis incubé pendant une nuit à 37°C. Après 24 heures

d'incubation quelques clones sont sélectionnés et resuspendus dans 500 μL de milieu LB-ampicilline puis incubés à 37°C pendant 3 heures. 100 μL de suspension bactérienne sont extrait pour vérifier la présence de l'insert dans le vecteur par PCR, les 400 μL restant sont congelés si la colonie bactérienne s'avère positive.

II.6.1.5.5. Extraction de plasmide.

Cette étape permet d'isoler les plasmides répliqués par les bactéries lors de l'étape précédente. Les suspensions bactériennes sont centrifugées à 3000 g pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot bactérien est repris par 400 μl de tampon de suspension (Tris-HCl 150m M, EDTA 10 mM, pH 8), contenant 100 μg/μl d'inhibiteurs de ribonucléase, auxquels sont ajoutés 400 μl d'une solution de lyse (NaOH 200 mM, SDS 1 % (m/v)). Après une agitation douce, le mélange est incubé 4 minutes à température ambiante puis 10 minutes à 4000 g à 4°C, le surnageant contenant les plasmides est prélevé, transféré dans un tube de 2 mL, puis centrifugé à nouveau 15 minutes à 10 000 g à 4°C., le culot est séché puis lavé par 1 mL d'éthanol 75 % (v/v) froid. Après une dernière centrifugation de 15 minutes à 10 000 g à 4°C, le culot est repris par un tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 M, pH 8). Les plasmides sont ensuite quantifiés par mesure de l'absorbance sous UV (1 unité de Densité Optique correspondant à 50 μg/mL d'ADN) puis une vérification est faite par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

II.6.2 Extractions des ARN totaux.

Les conditions d'analyse doivent protéger les ARN totaux de la dégradation par les ribonucléases (Rnases) qui sont libérées des cellules par la lyse cellulaire et qui sont présentes en grande quantité dans l'environnement. Les étapes d'extraction et d'analyse des ARNs devront être effectuées en prenant soin, d'une part d'éliminer les Rnases de la préparation initiale et d'autre part de ne pas contaminer le matériel et les échantillons (ces enzymes étant très résistantes, elles ne sont pas complètement dénaturées au cours de la stérilisation). Pour ces raisons, toutes les manipulations décrites ci-dessous ont été réalisées en portant des gants et en utilisant de l'eau traitée contre les ribonucléases ambiante à l'aide du diéthylpyrocarbonate (appelé eau DEPC). Les ARN totaux sont extraits en utilisant le réactif Trizol, prêt à l'emploi. Les cellules sont rincées deux fois 5 minutes à l'aide de PBS. Puis est rajouté 250 µL de Trizol par puits d'une plaque 6 puits. Le Trizol contient de l'isothiocyanate de guanidinium ainsi que du phénol permettant de dénaturer les acides nucléiques et de dissocier les protéines. Après incubation à température ambiante durant 10 minutes, les cellules sont récupérées par grattage puis transférées dans des microtubes de 2 mL auxquels est rajoutée 400 µL de chloroforme. Les tubes sont agités vigoureusement à la main pendant

15 secondes et laissés 10 minutes à température ambiante. Le chloroforme et les autres réactifs permettent de séparer ADN, ARN et protéines par solubilisation différentielle. La formation des différentes phases est accélérée par centrifugation à 12 000 g et à 4°C pendant 15 minutes. La phase inférieure organique contient l'ADN, l'interphase contient les protéines et la phase supérieure aqueuse les ARNs. Cette dernière est soigneusement aspirée et transférée dans de nouveaux tubes. Les ARNs sont précipités par addition de 1 mL de 2propanol par tube, suivie d'une agitation douce par retournement. Les échantillons sont laissés 10 minutes à température ambiante et centrifugés 10 minutes à 12 000g à 4°C. Les ARNs précipités sont ensuite lavés avec 2 mL d'éthanol 75 % (v/v) dans de l'eau DEPC et agités au vortex. Eventuellement, les ARNs peuvent être conservés ainsi plusieurs semaines à -80°C. L'éthanol est éliminé avant utilisation par centrifugation à 7500 g pendant 5 minutes, et le culot d'ARN est séché à l'air et solubilisé dans de l'eau DEPC. Sa dissolution complète est obtenue après chauffage durant 10 minutes dans un bain marie à 65°C. La quantité d'ARN extraite est estimée par lecture de l'absorbance à 260 nm (1 unité d'absorbance correspond à 40 μg d'ARN/mL). Le rapport des absorbances 260 nm / 280 nm est également utilisé afin de déterminer la pureté de la préparation.

II.6.3. Transcription inverse (RT) des ARNm en ADNc.

Cette étape permet l'obtention d'ADNc à partir des ARN totaux extraits des cellules en culture par amorçage au hasard (random priming). Elle s'opère à l'aide de l'appareil PCR de type « Hybaid », dans un microtube stérile contenant le mélange suivant :

- 4 μl de tampon 5X RT (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, pH 8,3),
- 1 μl de MgCl 0,1 M,
- 0,5 μl de RNasine (10 U/μl), inhibiteur de ribonucléase,
- 8 μl d'un mélange des 4 désoxyribonucléotides triphosphates, chacun à 10 mM,
- 2 µl de dithiothréitol (DTT),
- 1 μg d'ARN dilué dans 2 μl d'eau stérile,
- 1 μl de transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (200 U/μl),
- \bullet 1µl d'hexanucléotides synthétiques correspondant à toutes les séquences possibles. Il s'en trouvera donc quelques unes qui s'hybrideront avec l'ARNm, pouvant ainsi servir d'amorce pour la transcriptase inverse.

Le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante pour permettre l'hybridation des amorces puis 45 minutes à 42°C pour effectuer la transcription et enfin, 5 minutes à 90°C pour inhiber les enzymes.

II.6.4. La réaction de polymérisation en chaîne : PCR (Polymerase Chain Reaction).

La RT-PCR semi-quantitative permet de comparer les variations relatives d'expression de gènes en les comparant à celle d'un gène de "ménage" dont l'expression est constante lors des phénomènes biologiques étudiés. Elle comporte deux étapes : une étape de transcription inverse (ou RT), permettant de synthétiser l'ADNc à partir des ARNs totaux, et une étape d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR) de l'ADNc. Cette méthode est basée sur le mode d'action d'une ADN polymérase : la Taq (Thermus aquaticus) polymérase qui est issue d'un microorganisme vivant dans des sources d'eaux chaudes et résistant à des températures élevées. Pour pouvoir réaliser la réaction de polymérisation en chaîne, cette enzyme aura besoin d'amorces qui vont encadrer la séquence à amplifier.

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

Pour 18 S: sens: 5'-GCGAATTCCTGCCAGTAGCATATGCTTG-3'

antisens:5'-GAAGCTTAGAGGAGCGACCAAAGG-3'

Pour GAPDH: sens: 5'-ACCAGAGTCCATGCCATCA-3'

antisens: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGT-3'

Pour MT1-MMP: sens: 5'-GCTTGCAAGTAACAGGCAAA-3'

antisens: 5'-AAATTCTCCGTGTCCATCCA-3'

Pour MT2-MMP: sens: 5'-TCGACGAAGAGACCAGGAGT-3'

antisens: 5'-CTTGAAGTTGTCAACGTCCT-3'

Pour MT3-MMP : sens : 5'-ATGTGCTACAGTCTGCGGAAC-3'

antisens: 5'-TATCCACATCACGTTTGCCA-3'

Pour MT5-MMP: sens: 5'-GGATCAGACAACGATCGAGT-3'

antisens: 5'-CAGCTTGAAGTTGTGCGTCT-3'

Les tailles des différents fragments amplifiés sont les suivants :

Température d'hybridation.

Pour GAPDH: 450 paires de bases.	55°C-65°C	
Pour 18 S: 135 paires de bases.	55°C-65°C	
Pour MT1-MMP : 650 paires de bases.	62°C	
Pour MT2-MMP : 578 paires de bases.	60°C	
Pour MT3-MMP : 461 paires de bases.	60°C	
Pour MT5-MMP : 565 paires de bases.	60°C	

Après avoir réalisé la transcription inverse, nous réalisons le mélange suivant :

- 2,5 µl de tampon 10 X PCR
- 1 µl du mélange 4 dNTP à 10 mM chacun
- 0,75 μl de MgCl₂ 50 mM
- 1,25 µl de DMSO (diméthylsulfoxide)
- 1,125 μl de W-l (détergent assurant le maintien de l'activité Taq polymérase)
- 5 μl d'un mélange de deux amorces (l μM), l'une directe (sens), l'autre inversée (antisens) et complémentaire
- 0,2 µl de Taq (Thermus aquaticus)
- Compléter à 25 µl avec de l'eau stérile.

L'ADN est amplifié en plusieurs cycles contenant chacun 3 étapes. En général, ce programme suit le schéma suivant :

Premier Cycle:

Étape 1: 2 minutes 30 à 95°C qui dénature les deux brins d'ADNc.

Étape 2: 30 secondes à 55°C (pour GAPDH) ou 62°C (pour MT1-MMP) qui permet l'hybridation des amorces respectives.

Étape 3: 30 secondes à 72°C pour permettre l'extension des amorces (par la Taq polymérase).

Deuxième au 32^{ème} Cycle:

Idem, à l'exception de l'étape 1 qui dure 30 secondes à 95°C.

Dernier Cycle:

La température est maintenue à 20°C après l'étape d'élongation par la Taq.

Le produit de PCR est ensuite soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 1 % (p/v) contenant du BET pendant 30 minutes, afin de visualiser la présence de l'ADN amplifié et les variations éventuelles de l'expression de ces gènes. La visualisation est réalisée sous rayonnement UV.

II.6.5. Transfections stable de plasmides.

La technique utilisée est celle de lipofection. Celle-ci a été optimisée et s'est révélée efficace. Le réactif utilisé est la LipofectamineTM 2000 (Invitrogen). La lipofectamine 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. Les constructions d'ADN présentes vont s'associer à la surface de ces structures par des liaisons de type électrostatique et pourront ainsi être internalisées lors de la fusion des liposomes avec la membrane plasmique. Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits (environ 500 000 cellules par puits) en présence d'un milieu contenant 10% de SVF. Le lendemain les cellules se retrouvent à environ 90-95% de confluence, elles sont alors rincées 3 fois avec 1 mL de PBS puis nous réalisons la transfection à l'aide de la lipofectamine 2000 selon le protocole suivant :

- dans un microtube de 1,5 mL nous y plaçons 250 μ L de milieu de culture sans sérum ainsi que le volume correspondant à la quantité d'ADN plasmidique désirée. De la même manière, dans un tube 1,5 mL, 250 μ L de milieu de culture sans sérum y est placé ainsi que le volume nécessaire d'agent transfectant, puis le tout est incubé 5 minutes à température ambiante.
- Le contenu des 2 tubes est ensuite rassemblé dans un seul et même tube et le tout est incubé 20 minutes à température ambiante afin de permettre la formation des liposomes contenant l'ADN plasmidique.
 - Le mélange est ajouté aux puits (plaque 6 puits) contenant du milieux sans sérum.
- 6 heures plus tard, le milieu est changé. Un milieu complet contenant 10 % de sérum est alors ajouté afin de permettre aux cellules de proliférer à nouveau.

Les cellules sont alors observées au microscope à fluorescence afin d'apprécier le taux de transfection qui était approximativement de 60%. Une fois que les cellules ont atteint la confluence, nous débutons la sélection à l'aide d'un antibiotique spécifique : la néomycine ou G-418 (Invitrogen). La concentration nécessaire afin de réaliser une sélection efficace a été déterminée à 800 µg/mL. Après 72 heures de sélection, il ne reste que les cellules ayant incorporer le plasmide. Ceci est vérifié sous microscope à fluorescence. Après prolifération, les cellules sont congelées dans l'azote liquide pour des expériences ultérieures.

II.7. Evaluation statistique.

Les études statistiques ont été réalisées suivant le test de Student. Les valeurs moyennes sont déterminées et exprimées avec l'erreur standart sur la moyenne (SEM). Sur 4 expériences les différences entre les valeurs des moyennes sont considérées statistiquement significatives lorsque P< 0,005.

RESULTATS

Partie I

Influence des peptides d'élastine sur l'angiogenèse.

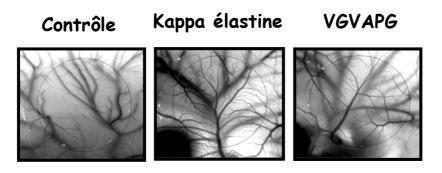
I. Influence des peptides d'élastine sur l'angiogenèse.

I.1. Stimulation du Phénotype angiogénique des cellules endothéliales in vivo et in vitro par les peptides d'élastine.

Notre travail fait suite aux travaux menés dans notre laboratoire par M. A. Robinet sur la régulation de l'expression et/ou de l'activation de la gélatinase A par des peptides issus de la thrombospondine et de l'élastine, et leurs implications dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse. Pour une meilleure compréhension de notre étude, certains résultats rapportés dans cette première partie et réalisés en commun ont déjà été mentionnés dans la thèse de M. A. Robinet soutenue le 11 Décembre 2003 dans notre laboratoire. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication commune dans J. Cell Science (Robinet et coll., 2005) ou nous apparaissons en tant que co-auteur.

I.1.1. Modèle in vivo de la membrane chorio-allantoide de poulet.

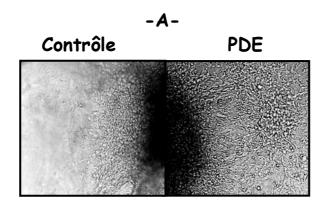
Les PDE ont été décrits comme favorisant la prolifération, le chimiotactisme, la différenciation, l'expression de protéinases et la progression tumorale. Ces résultats ainsi que l'effet vasodilatateur des PDE sur l'endothélium rapportés dans la littérature nous a donc conduit à penser que de telles matrikines ou élastokines pourrait de la même façon influer sur le phénotype angiogénique des cellules endothéliales. Afin de valider cette hypothèse, nous avons étudié *in vivo* l'influence des PDE en utilisant le modèle de la membrane chorioallantoïde d'embryon de poulet (CAM). A partir du 6^e jour du développement embryonique, les membranes sont traitées chaque jour avec soit du PBS (contrôle), soit avec 50 ng de Ke ou 200 ng de VGVAPG. Les résultats obtenus et rapportés au niveau de la figure 44, montre que le traitement par les PDE (Ke ou VGVAPG) conduit à une accélération de l'angiogenèse atteignant un maximum après 7 à 8 jours de traitement.



<u>Figure 44:</u> Effet des PDE sur l'angiogenèse *in vivo* dans le modèle de CAM. Des embryons de poulets sont préincubés pendant 3 jours. Les coquilles sont ensuite cassées et les œufs placés dans une coupelle. Un anneau de silicone délimite la zone de la membrane chorioallantoide à traitée en présence de PDE. La surface délimitée est ensuite photographiée entre le 6 et 10e jour de développement. Photos à 8 jours.

I.1.2. Modèle in vitro en matrice tridimensionnelle.

En parallèle des expérimentations *in vitro* sur la capacité des cellules HMECs à s'organiser en pseudotubes lorsqu'elles sont incorporées dans un lattis de collagène de type I ou cultivées sur un équivalent de membrane basale, le Matrigel, ont été réalisées. Les résultats rapportés sur la figure 45 montrent que les PDE sont capables de favoriser la formation de tubes capillaires lorsque les cellules endothéliales sont cultivées dans un lattis de collagène de type I, ainsi que des pseudotubes capillaires lorsqu'elles sont cultivées sur Matrigel. Ces résultats démontrent ainsi l'effet pro-angiogène des PDE dans deux modèles d'angiogenèse *in vitro*.



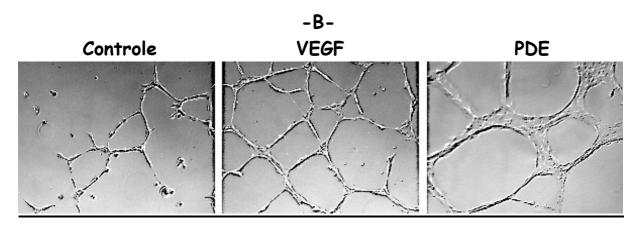


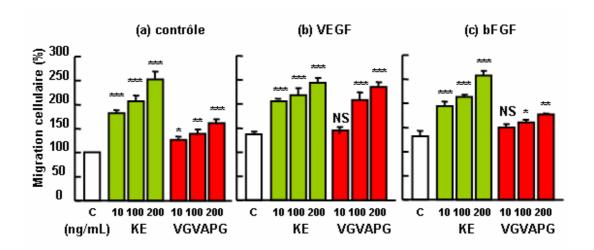
Figure 45: Effet des PDE sur la formation de capillaires dans un gel tridimensionnel de collagène de type I et de pseudotubes sur Matrigel. –A- Les cellules HMECs sont cultivées sur un gel d'agarose à 2 % (v/v). Au bout de 18 heures d'incubation, l'agrégat cellulaire est prélevé et incorporé dans un gel de collagène de type I à 2 % (v/v) dans un milieu contenant 50 μg/ mL de PDE. Au bout de 3 jours d'incubation à 37°C, les cellules sont observées en microscopie optique (X 10). –B- Les cellules HMECs sont cultivées sur du Matrigel en absence ou en présence de 1 μg/mL de PDE ou en absence ou présence de 20 ng/mL VEGF. Au bout de 24 heures, les cellules sont observées en microscopie optique (x10) et photographiées.

I.1.3. Influence des PDE sur la migration et la survie cellulaire des cellules endothéliales.

I.1.3.1. Effet des PDE sur la migration cellulaire.

Après avoir observé l'effet des PDE sur la formation de capillaires *in vivo* et *in vitro*, nous avons voulu étudier le rôle des PDE sur la migration des cellules endothéliales

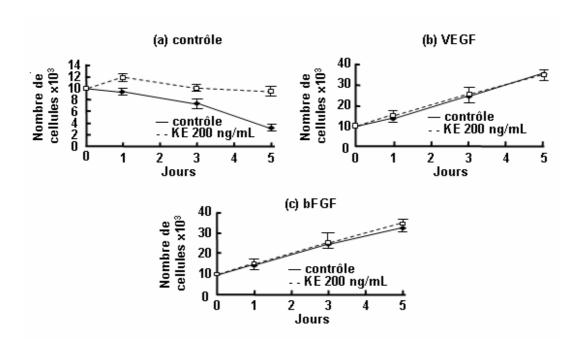
HMECs. Pour cela nous avons utilisé le modèle de blessure qui consiste à faire une blessure mécanique au sein d'une monocouche de cellules endothéliales. Les cellules HMECs sont cultivées à confluence; une blessure mécanique est pratiquée et nous incubons les cellules à 37°C dans un milieu sans sérum en présence ou non de PDE (1, 100 et 200 ng/mL) et en présence ou non de facteurs de croissance (20 ng/mL VEGF, FGFb). Au bout de 24 heures, les cellules sont observées en microscopie et photographiées à l'aide d'un appareil numérique. Nous pouvons alors observer qu'en présence de PDE, la migration des cellules endothéliales est augmentée de 1,6 à 2,5 fois en présence de 200 ng/mL VGVAPG et Ke, respectivement (Figure 46). Le nombre de cellules ayant migré est déterminé et exprimé par rapport au contrôle.



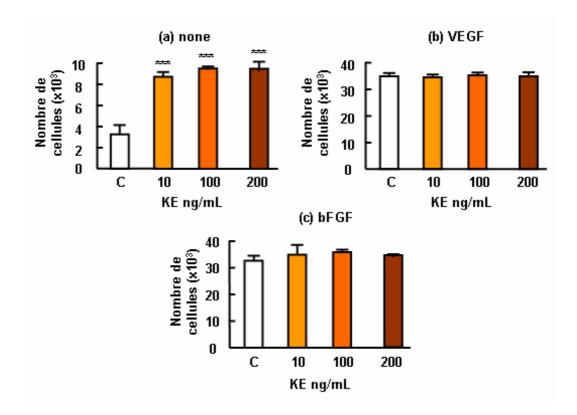
<u>Figure 46:</u> Effet des PDE sur la migration des cellules HMECs. Les cellules HMECs (10⁵ cellules / puits) sont cultivées dans un milieu complet. Au bout de 24 heures, lorsque les cellules sont à confluence une blessure de 1 mm de largeur est pratiquée à l'aide d'une pointe. Les cellules sont ensuite lavées et incubées dans un milieu contenant 2 % de SVF en présence ou en absence de PDE et en présence ou en absence de VEGF ou FGFb. Après 24 heures d'incubation le résorbage de la blessure est mesuré par numération des cellules ayant envahies 0,5 mm² de la surface de la blessure. Les résultats sont rapportés en % par rapport aux contrôles respectifs. ***P<0,001, **P<0,01, *P<0,05, NS: non significatif.

I.1.3.2. Effet des PDE sur la survie cellulaire.

Ayant démontré le potentiel des PDE à induire l'angiogenèse in vivo et in vitro ainsi que la migration cellulaire, nous nous sommes ensuite interrogé sur l'effet des PDE sur la survie des cellules endothéliales. Les résultats rapportés au niveau de la figure 47 montrent que les PDE favorisent la survie des cellules endothéliales dès la premier jour et que cette effet perdure jusqu'à 5 jours. La figure 47 bis montre les résultats obtenus après 5 jours de culture en absence de sérum dans le milieu et en présence de concentrations variables de PDE. Dans les deux types d'expérience, aucune différence n'est observée en présence des facteurs de croissance. Nous n'avons pas obtenu d'effets des PDE sur la prolifération des cellules HMECs (résultats non montrés).



<u>Figure 47:</u> Effet des PDE sur la survie des cellules endothéliales. Les cellules HMECs sont cultivées durant la durée de l'expérience dans une plaque à 24 puits en présence ou en absence de PDE (200 ng/mL) et en présence ou en absence de 20 ng/mL de VEGF ou FGFb. A la fin de chaque période d'incubation, les cellules sont comptées sur cellules de Malassez.



<u>Figure 47 bis:</u> Effet des PDE sur la survie des cellules endothéliales. Les cellules HMECs sont cultivées durant 5 jours dans une plaque à 24 puits en présence ou en absence de PDE et en présence ou en absence de 20 ng/mL de VEGF ou FGFb. A la fin de chaque période d'incubation, les cellules sont comptées sur cellule de Malassez.

I.2. Implication du récepteur S-Gal.

Afin de s'assurer que les effets observés des PDE sur l'angiogenèse sont bien médiés par la fixation des PDE sur le récepteur S-Gal, nous avons utilisé des antagonistes tels que le lactose ou le V-14. Le lactose agit en diminuant l'affinité de l'élastine sur le récepteur et entraîne sa dissociation. A l'opposé, le peptide V-14 est un inhibiteur compétitif car il reproduit la séquence de fixation de l'élastine du récepteur. Ces molécules suppriment les effets des PDE sur la formation de pseudotubes de cellules HMECs cultivées sur Matrigel, ce qui démontre l'implication du récepteur S-Gal (Figure 48).

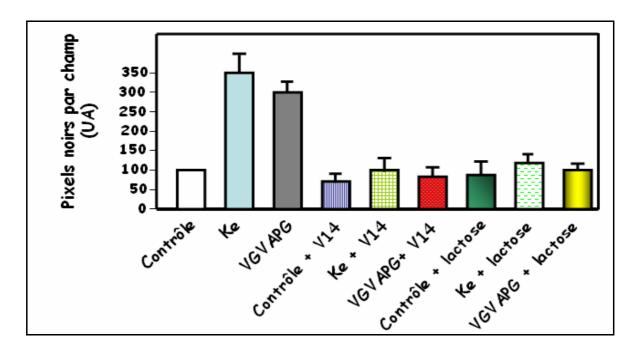


Figure 48: Effet de différents inhibiteurs du récepteur S-Gal sur la formation de pseudotubes induite par les PDE. Les cellules HMECs sont cultivées sur un gel épais de Matrigel en présence de PDE (1 μg/mL) en présence ou non de différents inhibiteurs. Après 24 heures d'incubation à 37°C les cellules sont observées en microscopie optique (X 10) et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique. La quantification des réseaux observés se fait à l'aide du logiciel Adobe Photoshop après transformation des Photos en noir et blanc. Les pseudotubes apparaissent en pixels noirs sur fond blanc. La quantification correspond alors à la quantité de pixels noirs sur la quantité de pixels totale.

I.3. Implication de la MT1-MMP.

Etant donné le rôle clé joué par la MT1-MMP lors de la tubulogenèse et la migration des cellules endothéliales (Lafleur et coll., 2001), l'expression et la synthèse de cette dernière ont été appréciés par RT-PCR et western blot. Les résultats rapportés au niveau de la figure 49 montrent que les PDE sont capables d'induire l'expression et la synthèse de MT1-MMP de façon significative. L'expression au niveau des ARNm est optimale après 8 heures d'incubation. La quantité de protéine a été appréciée après 24 heures d'incubation. La présence d'une bande à 44 Kda correspondant à la forme de maturation inactive de l'enzyme est en faveur d'une activation conséquente de la MT1-MMP.

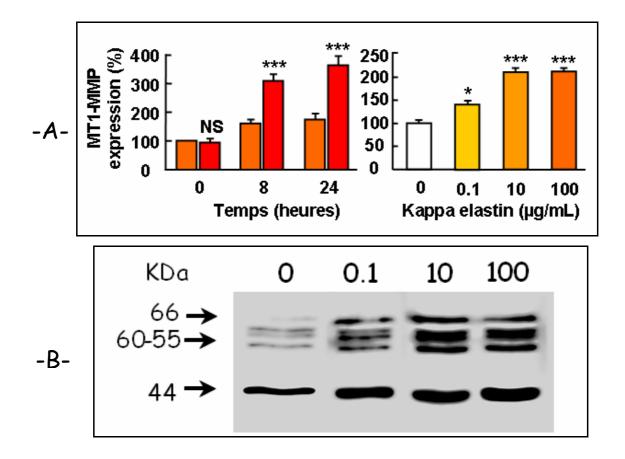


Figure 49: Effet des PDE sur l'expression de MT1-MMP. Les cellules HMECs sont cultivées sur surface plastique en absence ou en présence de PDE. (A) Après 0, 8 et 24 heures, les ARNs sont extraits, puis l'expression de la MT1-MMP est appréciée par RT-PCR semi-quantitative. Les résultats sont exprimés en pourcentage et rapportés à l'expression de GAPDH. Les colonnes oranges correspondent aux cellules incubées en absence de PDE et les rouges en présence de 1 μg/mL de PDE. La même expérience a été rélaisée avec des concentrations variables de PDE pendant une période d'incubation de 8 heures. (B) Après 24 heures de stimulation par 0, 0,1, 10 et 100 μg/mL de PDE, les protéines membranaires sont extraites puis soumises à un western blot. Les résultats en triplicata sont exprimés sous la forme : moyenne \pm SEM. ***P<0,001, *P<0,05, NS : non significatif.

Les PDE ayant la capacité d'induire l'augmentation de la MT1-MMP ainsi que la tubulogenèse via la fixation de ces derniers sur le récepteur S-Gal, nous avons conforté l'implication de la MT1-MMP dans l'angiogenèse induite par les PDE via l'utilisation de différents inhibiteurs spécifiques. Les résultats rapportés dans le tableau VIII montrent que seul les inhibiteurs ciblant la MT1-MMP entraînent une désorganisation de la tubulogenèse induite *in vitro* par les PDE. En effet, le batimastat est un inhibiteur de MMPs à large spectre, le TIMP-1 est connu pour inhiber la MMP-2 mais pas la MT1-MMP et le TIMP-2 pour inhiber les deux enzymes. Nous avons utilisé également le dérivé peptidique Dec-RVLR-cmk, un inhibiteur synthétique de la furine convertase activateur intracellulaire de la MT1-MMP. L'expression et l'activation de la pro-MMP-2 est également augmenté de façon concentration dépendante par les PDE (Robinet et coll., 2005). Aucun effet n'a été observé sur l'expression de la MMP-1, de la MMP-3 ou de l'urokinase (résultats non rapportés).

A- formation de pseudotubes	Pixel noir p	ar champs x 50 (u	nité arbitraire)
Ke	100 ± 8.7		
+ batimastat (10 ⁻⁷ M)	$11.0 \pm 5.7 (89)$		
+ TIMP-2 (1 μg/mL)	$20.2 \pm 8.7 \ (79.8)$		
+ TIMP-1 (1 μg/mL)	77.1 ± 5.7 (22.9)		
+ Dec-RVLR-cmk (0.75 mg/mL)	16.8 ± 5.7 (83.2)		
B- migration cellulaire (%)	contrôle	TIMP-2	batimastat
contrôle	100	$82 \pm 7 \ (18)$	$62 \pm 6 \ (38)$
Ke (200 ng/mL)	253 ± 11	$103 \pm 6 \ (59.3)$	$61 \pm 12 \ (75.9)$
VGVAPG (200 ng/mL)	161 ± 4	91 ± 11 (43.5)	62 ± 4 (61.5)

Tableau VIII: Effet de différents inhibiteurs sur la tubulogenèse et la migration cellulaire. A- Les cellules HMECs (50 000 cellules) sont cultivées sur un gel épais de Matrigel en présence ou non de PDE et de différents inhibiteurs. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont observées en microscopie optique (X 10) et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique. La quantification des réseaux observés se fait à l'aide du logiciel Adobe Photoshop après transformation des Photos en noir et blanc. Les pseudotubes apparaissent en pixels noirs sur fond blanc. La quantification correspond alors à la quantité de pixels noirs sur la quantité de pixels totale. B- Les cellules HMECs (10⁵ cellules / puits) sont cultivées dans un milieu complet. Au bout de 24 heures, lorsque les cellules sont à confluence une blessure de 1 mm de largeur est pratiquée à l'aide d'une pointe. Les cellules sont ensuite lavées et incubées dans un milieu contenant 2 % de SVF en présence ou en absence de PDE et de TIMP-2 (1 μg/mL) ou batimastat (10⁻⁷ M). Après 24 heures d'incubation le résorbage de la blessure est mesuré par numération des cellules ayant envahies 0,5 mm² de la surface de la blessure. Les résultats sont rapportés en % par rapport aux contrôles respectifs. Les chiffres entre parenthèse représentent les pourcentages d'inhibition par rapport aux contrôles respectifs.

I.4. Influence des peptides d'élastine sur la production de cytokines.

Afin d'apprécier le profil d'expression de différentes cytokines et/ou facteurs de croissance dans les milieux conditionnés de cellules HMECs, nous avons utilisé un kit de dosage des différentes cytokines ou facteurs de croissance appelé « cytokine array » : ce dosage consiste en une technique d' immunofixation entre une série d'anticorps dirigés contre un certains nombre de cytokines ou facteurs de croissance ayant un rôle reconnu dans le processus angiogénique lesquelles sont fixés sur une membrane de nitrocellulose et les protéines sécrétées par les cellules HMECs. Les résultats de l'analyse densitométrique des milieux conditionnés stimulés ou non par les peptides d'élastine (1 μg/ml) sont rassemblés au niveau de la figure 50.

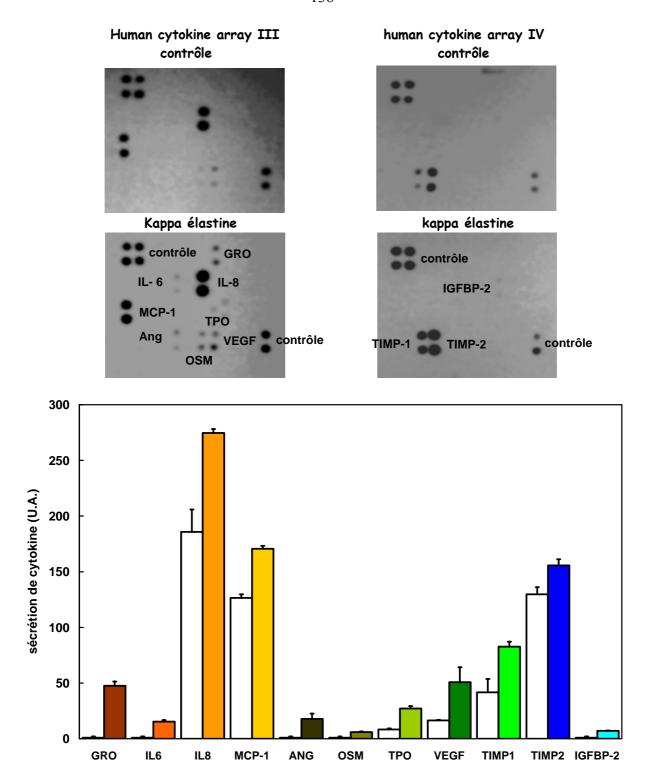


Figure 50: Effet des PDE sur la libération de cytokines/facteurs de croissance/TIMPs. Les cellules HMECs sont cultivées sur plastique dans un milieu minimum durant 24 heures avant d'être mise en présence ou non de PDE durant 24 heures. Les milieux conditionnés sont alors récupérés puis mise en contact avec la membrane de nitrocellulose ou sont fixés les différents anticorps. La révélation s'effectue grâce à l'activité peroxydase de l'anticorps secondaire révélée par chimioluminescence sur un film photosensible. Les membranes sont photographiées et analysées par densitométrie. Certains spots correspondent à des contrôles internes à chaque membrane. Les résultats obtenus sur chaque membrane sont rapportés aux contrôles inernes et exprimés sous la forme : moyenne ± SEM.

Le profil de sécrétion des cytokines obtenu montre que les principales cytokines induites de façon significative par les PDE sont GRO, IL-6 (Interleukine-6), l'IL-8 (Interleukine-8), MCP-1, angiogénine, TPO et VEGF. Toutes sont connues pour leurs effets

pro-angiogéniques. Au niveau des TIMPs, seul le TIMP-1 est augmenté. Ces résultats bien que préliminaires montrent que les PDE sont capables d'activer l'angiogenèse par différents mécanismes y compris par un processus autocrine et/ou paracrine via la sécrétion de ces facteurs angiogéniques.

Partie II

Invalidation de l'expression de la MT1-MMP par la technique des petits ARN interférents.

II. Invalidation de l'expression de la MT1-MMP par la technique des petits ARN interférents.

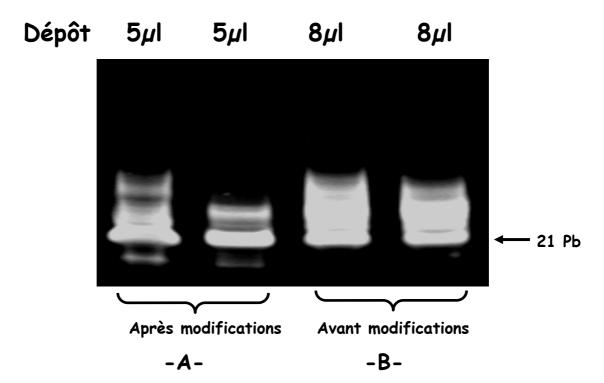
Les résultats rapportés dans la littérature d'une part et ceux présentés dans la première partie de nos travaux d'autre part montrent que la MT1-MMP joue un rôle crucial dans l'angiogenèse et plus particulièrement dans l'angiogenèse induite par les peptides issus de la dégradation de l'élastine (PDE). Cependant, pour établir clairement l'implication de cette enzyme dans ce processus nous nous sommes appuyés sur une nouvelle technique apparue durant l'année 2001 qui consiste en l'inhibition spécifique de l'expression d' une protéine donnée au sein d'une cellule via la dégradation de son ARNm: l'interférence par l'ARN (ARNi). Cette nouvelle approche nécessite l'utilisation de petits ARN interférents nommés siRNA en anglais.

II.1. Optimisation de la synthèse des siARN.

Lors de notre étude, les siARN ont été synthétisés par transcription *in vitro* à l'aide du kit fourni par la société AMBION. Une première synthèse a été réalisée en suivant scrupuleusement les données du fabricant puis les produits obtenus ont été analysés sur gel de polyacrylamide non dénaturant à 12% (p/v). Cette approche nous a permis de visualiser de nombreuses bandes dont certaines ne correspondent pas à la taille attendue des siARN (Figure 51). Ce résultat nous alors poussé à réaliser différentes modifications dans le protocole de synthèse :

- □ Le temps d'hybridation du promoteur T7 est porté à 1 minute à 90°C puis 1 heure à 37°C au lieu de 2 minutes à 70°C puis 5 minutes à température ambiante.
- □ La synthèse par l'enzyme de Klenow est portée à 45 minutes au lieu de 30 minutes
- □ La transcription par l'ADN polymérase T7 est portée à 2 heures au lieu de 1 heures 30 minutes.
- □ Les quantités et les temps d'actions de la Dnase et de la Rnase sont augmentés.

Afin d'apprécier la pureté de ces derniers, ils sont analysés sur gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturante en présence de BET.



<u>Figure 51:</u> Electrophorèse en gel de polyacrylamide à 12% (p/v) des siARN 228 synthétisés en condition non dénaturante avec BET. Révélation des bandes sous UV. Les siARN ont été synthétisés soit selon notre protocole (A), soit selon le protocole fourni par la société Ambion (B).

Les concentrations des différents siARN ainsi synthétisés sont rassemblées dans le tableau IX, seul le siARN 107 a été synthétisé également avec le protocole « stricte » du fabricant. Il apparaît clairement que les siARN synthétisés après les différentes modifications que nous avons apportées ont un degré de pureté et une concentration supérieure à ceux synthétisés précédemment. Nous avons alors réalisé selon le même protocole la synthèse des siARN dirigés contre les autres cibles de l'ARNm de la MT1-MMP. Les concentrations finales obtenues sont rassemblées dans le tableau IX.

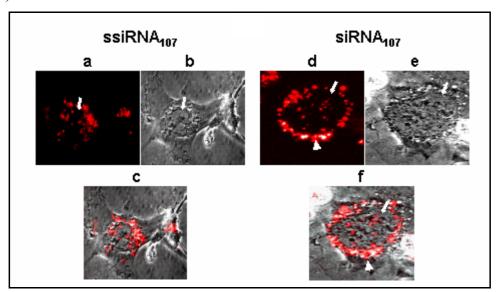
siARN (position sur l'ARNm)	Concentration avant modifications	Concentration après modifications
<u>107</u>	8,8 μΜ	21,4 μΜ
<u>228</u>	<u>ND</u>	12,46 μΜ
<u>949</u>	<u>ND</u>	24,2 μΜ
<u>1462</u>	<u>ND</u>	23,5 μΜ

Tableau IX: Concentrations finales de siARN obtenus après synthèse. ND, non déterminé.

II.2. Marquage des siARN à la Cyanine 3.

Afin d'apprécier la localisation intracellulaire des siARN, nous réalisons le marquage de ces derniers à la Cyanine 3 permettant ainsi leurs visualisations par microscopie confocale à fluorescence. Les cellules HMECs sont cultivées puis transfectées par le siARN 107 dans des plaques de culture Labtec adaptés pour les techniques de microscopie confocale. La visualisation s'effectue 72 heures après la transfection par 25 nM de siARN 107 ou ssiARN 107 (Figure 52).

Nous observons une localisation intracellulaire diffuse au niveau du cytosol dans le cas du ssiARN alors que la localisation du siARN 107 est périnucléaire ce qui est conforme à une localisation ciblée du siARN sur l'ARN messager après sa sortie du noyau et sa maturation. De plus, les cellules transfectées par le siARN 107 montrent un aspect morphologique différent des autres. En effet, ces dernières sont pour la plus part ronde avec très peu de lamellipode alors que les cellules transfectées avec le siARN dégénéré on un aspect semblable à celui des cellules contrôles : elles sont étalées avec de nombreux lamellipodes. Ceci est en accord avec ce qui a été précédemment rapporté dans la littérature lors d'utilisation de siARN marqué afin d'inhiber l'expression d'autres gènes (Nykanen et coll., 2001).



<u>Figure 52:</u> Localisation intracellulaire du siARN 107 marqué à la Cyanine 3. Les cellules HMECs sont cultivées dans un milieu complet jusqu'à atteindre 60 % de confluence puis ces dernières sont transfectées avec le siARN 107 (d,e,f) ou le ssiARN 107 (a,b,c) marqué à la Cyanine 3 durant 72 heures. (a,d) Analyse par microscopie confocale du siARN dégénéré (ssiARN107) et siARN107 respectivement. (b,e) Analyse par microscopie en contraste de phase du ssiARN107 et du siARN107, respectivement. (c,f) Recouvrement des images obtenues par fluorescence et par contraste de phases pour le ssiARN 107 et le siARN 107, respectivement. Les flêches indiquent la position des siARN et du noyau.

II.3. Effets du siARN 107.

II.3.1. Influence du siARN sur l'expression de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales.

Afin d'augmenter nos chances d'arriver à une inhibition maximum de l'expression de la MT1-MMP, 4 séquences cibles situées au sein de l'ARN messager de cette dernière ont été sélectionnées. Elles sont situées au niveau des positions 107, 228, 949, 1462 à partir du codon de départ AUG. Après avoir réalisé la synthèse de ces derniers, nous effectuons les premiers essais de transfection avec le siARN dirigé contre la séquence situé en position 107 (Figure 53 et 53 bis) après optimisation de différents paramètres dont :

- -le nombre de cellule à ensemencer afin d'atteindre environ 60% de confluence le jour de transfection avec les siARN.
- -la quantité d'agent transfectant (oligofectamine).

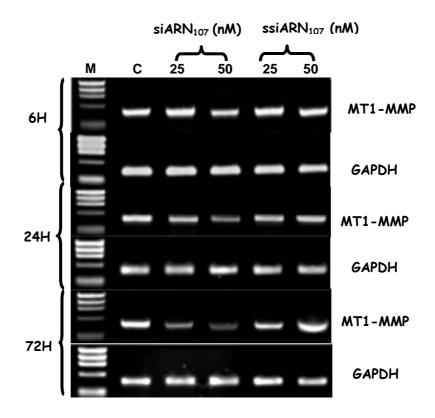
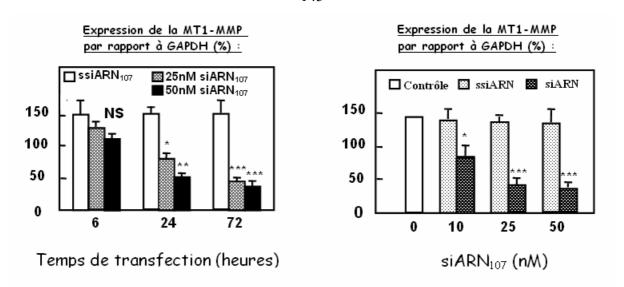


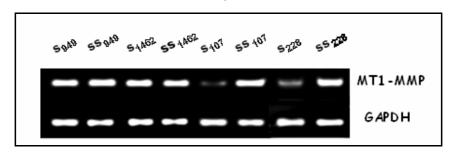
Figure 53: Cinétique d'extinction de l'expression de la MT1-MMP par le siARN 107. Les cellules HMECs sont cultivées dans un milieu complet jusqu'à 60% de confluence, puis transfectées avec des concentrations variable de siARN107 ou du siARN107 dégénéré (ssiARN107) durant différents temps. L'expression de la MT1- MMP a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative et comparée à celle d' un gène de ménage (GAPDH). Le produit de PCR a ensuite été analysé dans un gel d'agarose à 1 % (p/v). Les cellules contrôle (C) ont été incubé avec de l'oligofectamine seul. Le marqueur de taille φX174/HaeIII (M) a été utilisé pour évaluer la longueur des fragments de PCR. L'évaluation semi-quantitative de l'expression de la MT1-MMP a été réalisée sous UV à l'aide du logiciel Bioprofil (Vilbert-Lourmat, Marne la Vallée, France). Les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. NS, non significatif; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.



<u>Figure 53 bis:</u> Cinétique d'extinction de l'expression de la MT1-MMP par le siARN 107. Les cellules HMECs sont cultivées dans un milieu complet jusqu'à 60% de confluence, puis transfectées avec des concentrations variable de siARN107 ou du siARN107 dégénéré (ssiARN107) durant différents temps. L'expression de la MT1- MMP a été déterminée par RT-PCR semi-quantitative et comparée à celle d' un gène de ménage (GAPDH). Le produit de PCR a ensuite été analysé dans un gel d'agarose à 1 % (p/v). Les cellules contrôle (C) ont été incubé avec de l'oligofectamine seul. Le marqueur de taille φX174/HaeIII (M) a été utilisé pour évaluer la longueur des fragments de PCR. L'évaluation semi-quantitative de l'expression de la MT1-MMP a été réalisée sous UV à l'aide du logiciel Bioprofil (Vilbert-Lourmat, Marne la Vallée, France). Les résultats représentent la moyenne ± SEM de 3 expériences.. NS, non significatif; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; NS, non significatif.

Le siARN 107 permet d'inhiber de façon significative l'expression de la MT1-MMP dans les cellules HMECs. Cette inhibition est quasi maximum à une concentration de 25 mM après 72 heures de transfection. Il est préférable d'utiliser les concentrations en siARN les plus faibles possibles afin d'éviter toute réponse de type interféron de la part des cellules pouvant entraîner une dégradation d'ARN non spécifique et la mort cellulaire (Stark et coll., 1998).

Les autres siARN synthétisés ont été testés sur l'expression de la MT1-MMP dans les conditions similaires à celle du siARN 107 (Figure 54).



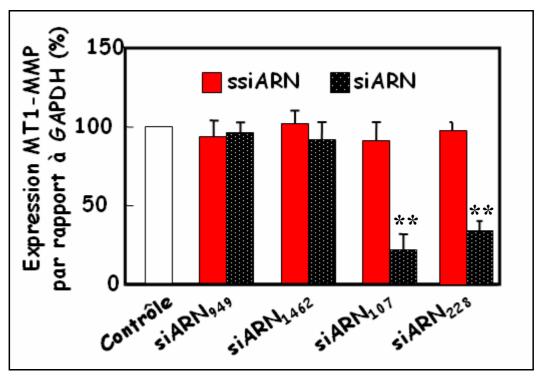


Figure 54: Effet des différents siARN synthétisés sur l'expression du gène de la MT1-MMP par RT-PCR. Les cellules HMECs sont cultivées dans des plaques 6 puits dans un milieu complet jusqu'à atteindre 60% de confluence. Les différents siARN sont alors transfectés durant 72 heures à la concentration de 25 nM. Les ARN totaux sont alors extraits, puis l'expression de la MT1-MMP est appréciée par RT-PCR semi-quantitative. L'analyse densitométrique est présentée sous la figure sous forme de la moyenne ± SEM. **, p<0,01 : significativement différent par rapport au ssiARN respectifs.

Ces résultats montrent que parmi toutes les séquences cibles sélectionnées sur l'ARNm de la MT1-MMP seul les siARN reconnaissant les séquences situées en position 107 et 228 entraînent une inhibition significative de l'expression alors que les siARN reconnaissant les cibles 949 et 1462 n'ont quasiment aucun effet. En effet il a été rapporté que les siARN reconnaissant des séquences cibles éloignées du codon AUG de départ sont beaucoup moins efficaces (Elbashir et coll., 2002). On peut aussi remarquer que le siARN reconnaissant la séquence 107 est le plus efficace c'est pourquoi il sera utilisé lors des expériences suivantes.

II.3.2. Dosage Elisa de la MT1-MMP.

Les résultats que nous avons obtenus nous montrent que le siARN 107 inhibe de façon significative l'expression de la MT1-MMP. Grâce un kit Elisa spécifique de la MT1-MMP totale, nous avons pu apprécier la quantité totale de MT1-MMP présente dans les

cellules HMECs après leur transfection durant 72 heures avec le siARN reconnaissant la séquence 107 de l'ARN messager de la MT1-MMP (Figure 55).

Les résultats montrent que la quantité totale de MT1-MMP est augmentée en présence de PDE. Le PMA, un ester de phorbol utilisé comme témoin positif, augmente également l'expression de la MT1-MMP ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans notre laboratoire (Brassart et coll., 1998) et ceux rapportés dans la littérature (Foda et coll., 1996). Cette augmentation est supprimée lorsque les cellules sont préalablement transfectées avec le siARN 107 dans les conditions citées précédemment, démontrant ainsi l'efficacité et la spécificité du siARN 107 vis-à-vis de l'ARNm de la MT1-MMP.

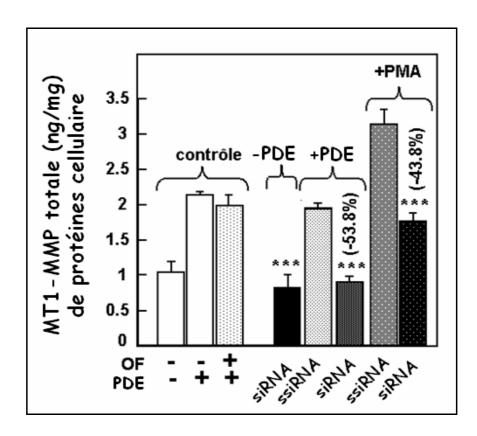


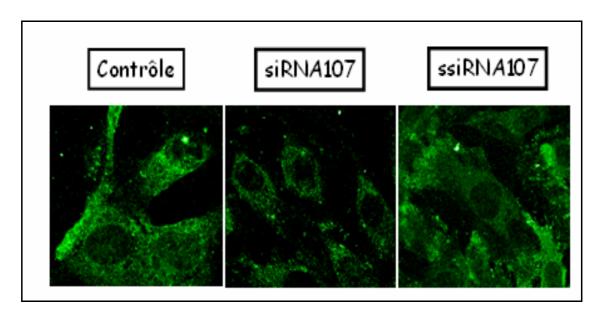
Figure 55: Quantité totale de MT1-MMP présente après transfection des cellules HMECs avec le siARN 107 ou le ssiARN 107. Les cellules HMECs sont cultivées en plaque 6 puits et transfectées à 60 % de confluence par 25 nM de siARN 107 (siARN) ou par le siARN 107 dégénéré (ssiARN) ou par l'oligofectamine seul (OF), durant 72 heures. Ensuite, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant 2% (v/v) sérum puis les cellules sont incubées en absence (– PDE) ou en présence (+ PDE) de PDE (1 μ g/mL) ou en présence de 10⁻⁷ M de PMA (Phorbol Myristate Acetate), durant 24 heures. La MT1-MMP totale est ensuite analysée par dosage Elisa. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences. NS, non significatif; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001. Les chiffres entre parenthèse représentent les pourcentages d'inhibition.

II.3.3. Immunolocalisation de la MT1-MMP.

L'extinction de l'expression de la MT1-MMP, mesurée au niveau de l'ARNm par RT-PCR et au niveau protéique, mesurée par dosage Elisa, a ensuite été confirmé par immunofluorescence à l'aide du marquage de la MT1-MMP par un anticorps couplé à la

FITC permettant ainsi d'apprécier sa localisation cellulaire ainsi que son abondance (Figure 56).

Les cellules transfectées avec le siARN 107 montrent un marquage beaucoup moins intense par rapport à celles transfectées avec le ssiARN 107 ou aux cellules contrôles démontrant l'effet de ce siARN sur la diminution de la synthèse de la MT1-MMP. On note également une différence de morphologie des cellules, celles transfectées avec le siARN107 ne présentent plus de pseudopodes.



<u>Figure 56</u>: Effet du siARN 107 sur le marquage intracellulaire de la MT1-MMP par un anticorps couplé à la FITC. Les cellules HMECs sont cultivés sur plaque 24 puits jusqu'à atteindre 60 % de confluence. Ces dernières sont ensuite transfectées soit avec le siARN 107 soit le ssiARN 107,, durant 72 heures à la concentration de 25 nM. Les cellules sont ensuite trypsinisées puis remis en culture sur des lamelles situées au fond d'une plaque 24 puits durant 24 heures. On réalise alors une immunofluorescence sur la MT1-MMP. Les résultats obtenus sont représentatifs de 3 expériences.

II.3.4. Influence du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2.

Etant donné le rôle central joué par la MT1-MMP dans l'activation de la proMMP-2 (Kinoh et coll., 1996), il nous est donc apparu pertinent d'analyser les conséquences de cette diminution de la quantité de MT1-MMP sur l'activation de la proMMP-2 médiée par les peptides d'élastine. Pour cela nous avons apprécié par zymographie en gel de gélatine l'activation de la proMMP-2 au niveau membranaire dans les cellules transfectées durant 72 heures par 25 nM de siARN 107 (Figure 57).

Les PDE sont capables d'entraîner l'activation de la proMMP-2 sous sa forme active comme il a déjà pu être démontré dans nos travaux. Les cellules transfectées avec le siARN 107 n'expriment plus la forme activée (MMP-2) de la proMMP-2 mais accumulent la forme zymogène (proMMP-2). Ce résultat est donc corrélé à la forte diminution de la MT1-MMP, l'activateur physiologique de la proMMP-2.

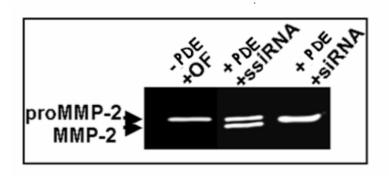


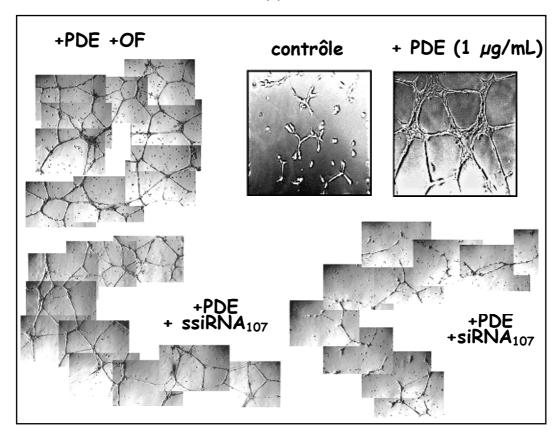
Figure 57: Effet du siARN 107 sur l'activation de la proMMP-2 au niveau de la membrane cellulaire. Les cellules HMECs sont cultivées en plaque 6 puits et transfectées à 60 % de confluence avec 25 nM de siARN 107 (siARN) ou de siARN 107 dégénéré (ssiARN) ou d'oligofectamine seul (OF), durant 72 heures. Ensuite, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant 2 % (v/v) SVF, puis les cellules sont incubées en absence (–PDE) ou en présence (+PDE) de PDE (1 μg/mL) durant 24 heures. Les protéines membranaires sont alors extraites puis analysées par zymographie en gel de gélatine (9 % (p/v)). Les résultats obtenus sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires.

II.3.5. Influence du siARN 107 sur la tubulogenèse induite par les PDE.

Nos travaux ont démontré la capacité des PDE à induire l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* à travers l'augmentation de l'expression et de l'activation de la MT1-MMP. De nombreuses autres études ont démontré le rôle central de la MT1-MMP dans l'angiogenèse induite par certains facteurs comme le collagène de type I (Haas TL. et coll., 1998), le facteur de croissance hepathocytaire (Wang et coll., 2000), la thrombine (Lafleur et coll., 2001), l'hypoxie et la reoxygénation (Ben-Yosef et coll., 2002), CCL2 et CXCL8 (Galvez et coll., 2005), le VEGF-C (Bauer et coll., 2005). Il nous ait donc apparu judicieux d'observer le comportement de cellules HMECs préalablement transfectées avec le siARN 107, puis cultivées sur Matrigel (une surface mimant le milieux extracellulaire et où elles se réorganisent en pseudotube) et stimulées par les PDE.

Les résultats rapportés au niveau de la figure 58 montrent que les PDE favorisent l'angiogenèse *in vitro* et que cette induction de l'angiogenèse disparaît lorsque l'on utilise des cellules HMECs préalablement transfectées avec le siARN 107, alors que les cellules transfectées avec le ssiARN 107 ont gardé leur capacité de formation de pseudotubes intacte. Nos résultats confirment l'importance de la MT1-MMP dans l'angiogenèse induite par les PDE.

-A-



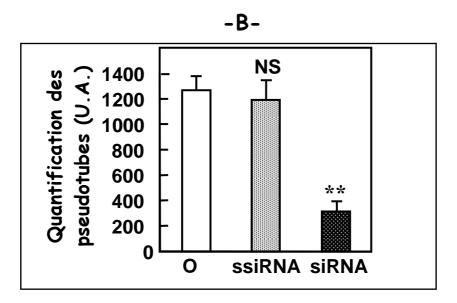
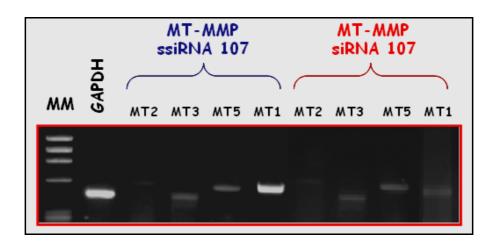


Figure 58: Conséquence de l'inhibition de l'expression de la MT1-MMP sur la formation de pseudotubes induite par les PDE. (A) Les cellules HMECs sont cultivées en plaque 6 puits et transfectées à 60 % de confluence avec 25 nM de siARN 107 (siARN) ou de siARN 107 dégénéré (ssiARN) ou d' oligofectamine seul (OF), durant 72 heures, puis les cellules sont cultivées sur Matrigel durant 24 heures dans un milieu contenant 2 % (v/v) de SVF et en présence de 1 μg/mL de PDE. La formation des pseudotubes a été observée en contraste de phase à l'aide d'un microscope possédant un appareil photo numérique. Les photos ont été prises à l'aide d'un objectif x 10. (B) L'évaluation semi quantitative des pseudotubes a été réalisée après l'estimation des pixels noirs par rapport aux pixels totaux à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images. Les données représentent la moyenne ± SEM de quatre expériences. ***P<0.001; NS, non significatif.

II.4. Spécificité des siARN.

L'un des avantages de l'utilisation de cette technique est sa spécificité envers la cible sélectionné. En effet lors du design des cibles situées sur l'ARNm de la MT1-MMP, nous nous sommes tout d'abord assuré que ces séquences cibles de 21 nucléotides n'étaient présentes que dans le gène de la MT1-MMP ceci afin d'éviter toute inhibition d'un ARNm autre que celui d'intérêt. Ceci a été réalisé à l'aide du moteur de recherche en ligne « Blast ». Cependant, il fallait aussi nous assurer que les autres MT-MMPs n'étaient pas impliquées dans les phénomènes observés lors du traitement des cellules avec le siARN 107. Pour cela nous avons analysé, après transfection des cellules avec le siARN 107 (25 nM) durant 72 heures, l'expression par RT-PCR des MT-MMPs appartenant au même sous groupe de la MT1-MMP, c'est-à-dire transmembranaire (Ueda et coll., 2003),



<u>Figure 59:</u> Analyse par RT-PCR de l'effet du siARN 107 sur l'expression des MT-MMPs transmembranaires. Les cellules HMECs sont cultivées dans un milieu complet jusqu'à atteindre 60 % de confluence puis ces dernières sont transfectées avec les siARN 107 ou ssiARN 107. Apres 72 heures de transfections, les ARN totaux sont extraits puis une RT-PCR est réalisée. Le résultat montré est représentatif de 3 expériences.

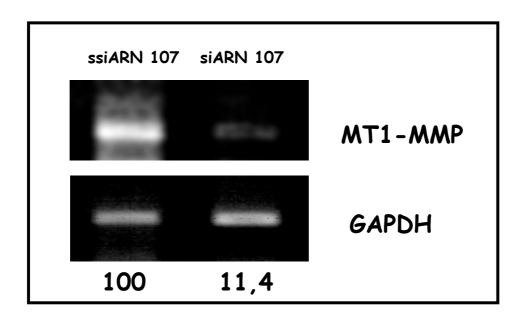
Les résultats obtenus et rapportés au niveau de la figure 59 démontrent que le siARN 107 inhibe de façon spécifique la MT1-MMP et que les autres MT-MMPs du même sous groupe ne sont pas ciblées. Les effets observés sont donc uniquement du à l'inhibition de la MT1-MMP. On peut observer par ailleurs que l'expression de la MT1-MMP est quantitativement plus élevée que celle des autres MT-MMPs appartenant au même sous groupe.

II.6. Transfection stable du siARN 107 dans les cellules HT-1080.

Nous avons pu démontrer que le siARN dirigé contre la position 107 de l'ARNm de la MT1-MMP entraînait une diminution de la synthèse de cette protéine que nous avons pu apprécier par divers moyens dans les cellules endothéliales. Cependant cette inhibition n'est

que transitoire et ne perdure pas plus de 3-7 jours dans les cellules en prolifération (Yang et coll., 2001; Holen. et coll., 2002) et 3 semaines dans des cellules non proliférantes comme les neurones (Omi et coll., 2004). Etant donné le rôle clé de la MT1-MMP dans divers processus physiopathologiques et en particulier dans l'angiogenèse tumorale, il nous ait apparu judicieux d'avoir en notre possession une lignée invalidée en MT1-MMP par la technique des siARN et ce de façon stable dans le temps. Ceci afin de nous doter d'un outil très intéressant dans la perspective d'étudier in vivo le rôle de la MT1-MMP dans la progression tumorale. Le plasmide utilisé a été décrit dans la partie Matériel et Méthodes (Méthodes II.6.1.5.2). Après avoir réalisé le clonage des cassettes codant le siARN 107 et le ssiARN 107, différents essais de transfection sont réalisés afin d'obtenir le meilleur rendement. Au vue de nos résultats, le rapport plasmide/agent transfectant utilisé sera lors de nos expériences de 4 μ g de plasmide / 5 μ L de lipofectamine 2000.

Les cellules transfectées sont ensuite cultivés dans des flacons de culture de 25 cm² jusqu'à atteindre la confluence. L'expression du gène de la MT1-MMP est ensuite analysée par RT-PCR semi quantitative (Figure 60).



<u>Figure 60</u>: Effet de la transfection du vecteur pRNATin Neo codant le siARN 107 ou le ssiARN 107 sur l'expression et la synthèse de la MT1-MMP dans les cellules HT-1080. Les cellules transfectées par le plasmide sont cultivées dans des flacons de 25 cm² jusqu'à confluence. Les ARN totaux sont ensuite extraits et une RT-PCR est réalisé afin d'apprécier l'expression de la MT1-MMP. Le produit de PCR est ensuite analysé sur gel d'agarose (1 % p/v) en présence de BET. Le résultat présenté est représentatif de 3 expériences. Les résultats quantitatifs sont obtenus par analyse densitométrique des bandes et exprimés par rapport au contrôle ssiARN107 ramené à 100.

Le résultat obtenu montre une diminution significative de l'expression de la MT1-MMP dans les cellules transfectées avec le plasmide codant le siARN 107 comparée au ssiARN 107. Cette diminution est d'un facteur 9 environ.

Partie III

Signalisation intracellulaire induite par la fixation des peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les cellules endothéliales.

III. Signalisation intracellulaire induite par la fixation des peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les cellules endothéliales.

Les travaux réalisés précédemment au sein du laboratoire ont montré que les PDE, comme la kappa-élastine et le peptide (VGVAPG)₃, induisent l'expression de la MMPs en particulier celle de la MMP-2 et de son activateur physiologique la MT1-MMP dans les cellules de mélanomes M₃DA (Ntayi et coll., 2001) de fibrosarcome HT-1080 (Brassart et coll., 1998) et endothéliales (Robinet et coll., 2005), ainsi que l'expression de MMP-1 dans les fibroblastes humains (Duca et coll., 2002). Dans toutes ces cellules, les effets des PDE sont médiés par le récepteur à l'élastine S-Gal. Les voies de signalisation induites par ce récepteur ont été étudiées dans certains types cellulaires comme les cellules musculaires lisses (Mochizuki et coll., 2002) et les fibroblastes (Duca et coll., 2005) mais très peu dans les cellules endothéliales. Dans cette 3^{ème} partie, nous traiterons des mécanismes de transduction du signal suite à la fixation des PDE sur S-Gal dans les cellules endothéliales conduisant à l'activation de l'angiogenèse.

III.1. Influence des peptides d'élastine sur la production de NO par les cellules endothéliales-Implication de S-Gal.

Les premiers travaux concernant l'influence des PDE sur l'endothélium mentionnent un effet vasodilatateur dépendant de la production de NO et une augmentation du calcium intracellulaires et nucléaire dans les cellules endothéliales (Faury et Coll., 1998). Il nous a donc semblé intéressant dans un premier temps d'étudier l'influence des PDE sur la production de NO par les cellules endothéliales.

La quantité de NO synthétisée ainsi que sa cinétique de production ont été mesurées par dosage colorimétrique (Méthodes II.5.). L'influence des PDE sur la production de NO a été comparée à celle du VEGF, un agent pro-angiogénique reconnu (Leung et coll., 1989). Les PDE induisent une libération du NO qui est au moins comparable à celle induite par le VEGF qui est un des agents pro-angiogénique les plus efficaces connus à ce jour. Cette production est maximum à des doses de PDE relativement faibles (1 µg/mL) et relativement rapides avec un maximum à 45 minutes (Figure 61).

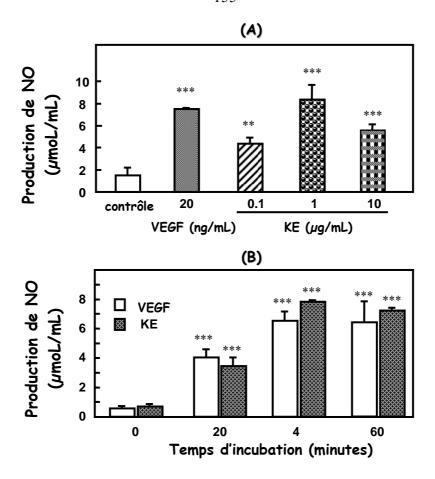


Figure 61: Effet des PDE sur la synthèse de NO comparé au VEGF. Les cellules endothéliales $(1x10^6)$ sont cultivées sur plastique dans un milieu dépourvu de sérum durant 24 heures. Après ajout des PDE $(0,1-1~\mu g/mL)$ durant (A) 45 minutes ou (B) durant la période indiquée, les milieux conditionnés sont récupérés puis la quantité de NO est dosée par une technique colorimétrique. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences. ***p<0,001; **p<0,01.

L'utilisation d'un antagoniste du récepteur S-Gal, le lactose, et d'un inhibiteur compétitif, le peptide V-14, montre que l'effet des PDE sur la production de NO est médié par le récepteur à l'élastine (Tableau X). En effet, le lactose et V-14 suppriment les effets des PDE.

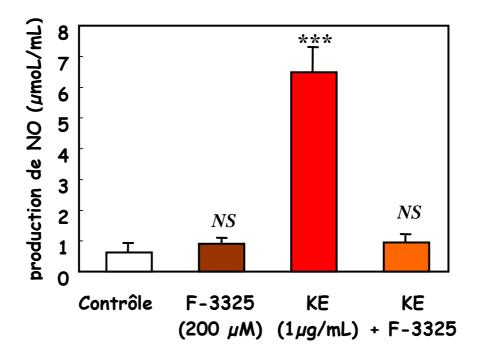
Facteurs	Quantité de NO produit (µmoL /mL)		
Contrôle	0.63 ± 0.32		
Ke (1 μg/mL)	6.48± 0.82 P<0.001		
(VGVAPG) ₃ (200 ng/mL)	7.5± 0.91 P<0.001		
Lactose (10 ⁻⁴ M)	1.01 ± 0.28		
V-14 (50 μM)	0.69 ± 0.31		
Ke + Lactose	1.02 ± 0.28		
Ke + V-14	0.91 ± 0.18		
(VGVAPG) ₃ + Lactose	0.82 ± 0.22		
(VGVAPG) ₃ + V-14	1.1± 0.39		

<u>Tableau X:</u> Implication du récepteur S-Gal dans les effets des PDE sur la libération de NO. Les cellules HMECs $(1x10^6)$ sont cultivées sur plastique dans un milieu dépourvu de sérum durant 24 heures. Après ajout des PDE durant 45 minutes en absence ou en présence des inhibiteurs, les milieux conditionnés sont récupérés puis la quantité de NO est dosée par une technique colorimétrique. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences.

III.2. Implication de la NO synthase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE.

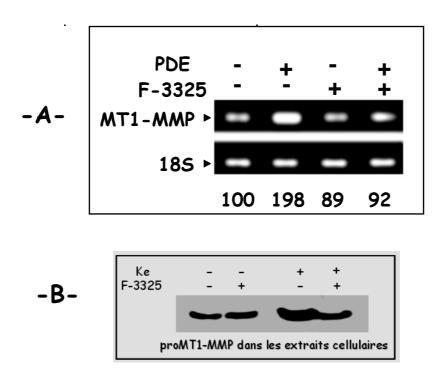
III.2.1. Influence d'inhibiteurs de NO synthase sur la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE.

Nos résultats précédents et ceux rapportés dans des études antérieures montrant une augmentation de l'activité de la NO synthase dans les cellules endothéliales stimulées par les PDE (Ostuni et coll., 2002), nous ont incité à utiliser des inhibiteurs de NO synthase : le F-3325 et le L-NIO. La mesure du NO produit en présence de l'un de ces 2 inhibiteurs, en l'occurrence le F-3325, a été tout d'abord appréciée afin de s'assurer de son efficacité. Le résultat obtenu et présenté sur la figure 62 confirme l'implication de la NO synthase dans l'effet des PDE sur la libération de NO.



<u>Figure 62</u>: Effet du F-3325 sur la production de NO induite par les PDE. Les cellules endothéliales HMECs sont cultivées sur plastique dans un milieu dépourvu de sérum durant 24 heures, puis incubées pendant 1 heure en présence du F-3325 suivi d'une incubation de 45 minutes en présence de PDE (1 μ g/mL), les milieux conditionnés sont récupérés puis la quantité de NO est dosée par dosage colorimétrique. Les résultats sont exprimés représentent la moyenne \pm SEM de quatre expériences. ***P<0,001 : NS, non significatif.

Les résultats obtenus (Figure 63) montrent que les effets des PDE sur l'expression de la MT1-MMP sont abrogés par l'utilisation de l'inhibiteur de NO synthase, démontrant ainsi l'implication d'une NO synthase dans ces effets et confirmant les résultats obtenus par d'autres équipes auparavant.



<u>Figure 63:</u> Effet d'un inhibiteur de NO synthase sur la MT1-MMP induite par les PDE. Les cellules HMECs (1x10⁶) sont cultivées sur surface plastique en absence ou en présence de F-3325 (200 μM) pendant 1 heure puis pendant 24 heures en absence ou en présence de PDE (1 μg/mL), les ARN totaux sont récupérés et soumis à (A) une RT-PCR semi-quantitative et à (B) un Western Blot de la pro-MT1-MMP au niveau membranaire afin d'apprécier le taux d'expression de la MT1-MMP. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. Les chiffres sous la figure A représentent les pourcentages par rapport au contrôle 100.

Afin de confirmer ce résultats, nous avons utilisé un autre inhibiteur de NO synthase plus spécifique de eNOS: le L-NIO. Ce dernier a été testé sur la capacité des PDE à induire la MT1-MMP. Le résultat obtenu et rapporté au niveau de la figure 64 montre la disparition de l'augmentation de la synthèse de la MT1-MMP induite par les PDE.

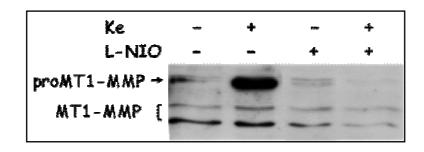


Figure 64: Effet du L-NIO, un inhibiteur de NO synthase, sur l'expression de la MT1-MMP induite par les PDE. Les cellules HMECs sont incubées pendant 1 heure sur surface plastique en absence ou en présence de de L-NIO (10 μM) et pendant 24 heures en absence ou en présence de PDE (1 μg/mL). Après 24 heures, les protéines membranaires sont récupérés et analysées par Western Blot à l'aide d'un anticorps anti MT1-MMP reconnaissant le domaine catalytique.

Nous avons bien confirmation des résultats précédemment obtenus, démontrant l'implication de eNOS dans les effets des PDE sur l'augmentation de la MT1-MMP.

III.2.2. Influence du F-3325 sur la régulation de l'activation de la proMMP-2 médiée par les PDE.

Il faut rappeler qu'un des effets des PDE est d'augmenter de façon conséquente l'activation de la proMMP-2. Cette activation étant MT1-MMP dépendante, nous avons donc étudié l'état d'activation de la proMMP-2 dans des cellules endothéliales incubées en absence ou en présence de F-3325 (Figure 65).

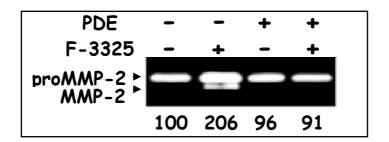


Figure 65: Effet de F-3325, un inhibiteur de NO synthase, sur l'activation de la proMMP-2 induite par les PDE. Les cellules HMECs sont cultivées sur surface plastique pendant 1 heure en absence ou en présence de F-3325 (200 μM) puis pendant 24 heures en absence ou en présence de PDE (1 μg/mL) Après 24 heures d'incubation, les protéines membranaires sont analysées par zymographie en gel de gélatine afin d'apprécier l'état d'activation de la proMMP-2. Les chiffres sous la figure représentent les pourcentages par rapport au contrôle 100.

L'induction de l'activation de la proMMP-2 induite par les PDE est abolie par l'utilisation de l'inhibiteur de NO synthase, F-3325. Ceci démontre que la diminution de MT1-MMP a pour conséquence la disparition de la bande d'activation de la proMMP-2. Par ailleurs, on observe également une diminution de la quantité de proMMP-2 associée à la membrane dans les cellules incubées avec le F-3325, ce qui corrobore des résultats rapportés dans la littérature. (Robinson et coll., 2006) Ces résultas nous on donc amener à approfondir le rôle du NO dans les effets des PDE.

III.2.3. Influence de F-3325 sur la régulation de la tubulogenèse médiée par les PDE.

Les résultats précédents ont montré l'implication de eNOS dans l'augmentation d'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE, ce qui suggère que l'inhibition de l'activité de la NO synthase pourrait avoir des conséquences sur la tubulogenèse. Les résultats rapportés au niveau de la figure 66 montrent en effet que l'inhibiteur F-3325 supprime les effets des PDE sur la formation de pseudotubes par les cellules endothéliales cultivées sur Matrigel.

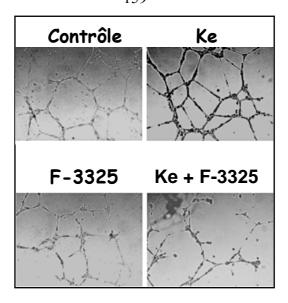


Figure 66: Effet d'un inhibiteur de NO synthase, le F-3325, sur la tubulogenèse. Les cellules HMECs sont cultivées sur un gel épais de Matrigel en absence ou en présence de F-3325 (200 μM) puis pendant 24h en absence ou en présence de PDE (1 μg/mL). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont observées en microscopie optique (X 10) et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique. La quantification des réseaux observés se fait à l'aide du logiciel Adobe Photoshop après transformation des Photos en noir et blanc et comptage des pixels. Les pseudotubes apparaissent en pixels noirs sur fond blanc. La quantification correspond alors à la quantité de pixels noirs sur la quantité de pixels totale. Les résultats représentent la moyenne ± SEM. ***P<0.001, NS, non significatif.

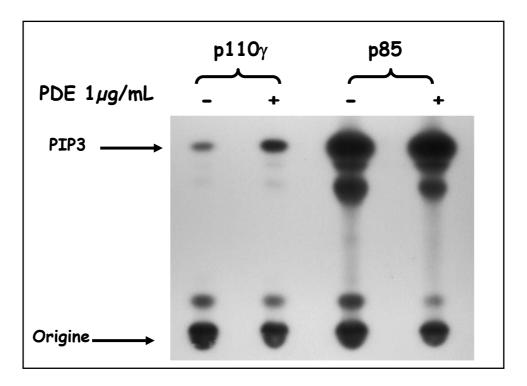
III.3. Activation de la voie PI₃Kinase/Akt/Erk1/2 par les PDE dans les cellules endothéliales.

III.3.1. Implication de la sous unité p110γ de la PI₃Kinase.

Compte tenu de nos résultats précédents sur la production de NO médiée par les PDE et le rôle bien connu de la voie $PI_3Kinase/Akt/eNOS$ dans le phénotype angiogène des cellules endothéliales, nous avons étudié l'influence des PDE sur cette voie de signalisation et son implication dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP et de la tubulogenèse. Un test d'activité de la $PI_3Kinase$ a donc été réalisé sur les cellules HMECs stimulées ou non par les peptides d'élastine (1 $\mu g/mL$). Nous nous sommes focalisés sur les sous unités $p110\gamma$ et p85 car des travaux antérieurs menés dans notre laboratoire ont montré que les PDE activent la sous unité $p110\gamma$ dans les fibroblastes (Duca et coll. 2005). Cette sous-unité appartient aux $PI_3Kinase$ de la classe I_B alors que p85 appartient aux $PI_3Kinase$ de la classe I_A (Yart et coll., 2002).

Les résultats rapportés au niveau de la figure 67 montrent clairement que c'est la sous-unité p110γ qui est impliqué dans les effets des PDE. En effet, l'analyse des activités kinases de deux sous classes démontre que les PDE induisent une forte activation de p110γ, tandis que les isoformes de classe I_A associées aux sous-unités régulatrices p85 ne sont pas activées. Nos résultats montrent que la PI₃Kinase de classe I_B p110γ est exprimée par les

cellules endothéliales HMECs. Ceci représente à notre connaissance la première démonstration de sa présence dans de telles cellules.

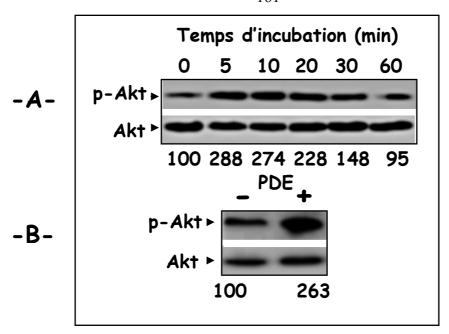


<u>Figure 67:</u> Test d'activité de la PI₃K après stimulation par les PDE. Les cellules (5.10⁶) sont mises au repos puis stimulées pendant 30 min en absence ou en présence de PDE (1 μg/ml). Les extraits cellulaires sont ensuite préparés et des quantités égales en protéines entre les différents essais sont soumises à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-p85 ou anti-p110γ. La réaction kinase est effectuée pendant 15 min en présence d ATP(γ-³²P), en utilisant le phosphatidyl inositol (PI) comme substrat. Les lipides sont ensuite extraits, séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) et la plaque est autoradiographiée. Le phosphatidylinositol 3-phosphate (PI₃-P) produit est identifié comme tel en comparant son Rf à celui d'un contrôle commercial. L'autoradiogramme montré est représentatif de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires.

III.3.2. Implication de la protéine kinase Akt.

La protéine Akt/PKB est une protéine kinase intracellulaire impliquée dans de nombreux signaux et connue pour être la cible principale activée par la PI_3 Kinase (Alessi et coll., 1996). Ceci nous a donc logiquement conduit à étudier son état d'activation suite à l'action des PDE (1 μ g/mL).

Les résultats sur la cinétique de phosphorylation d'Akt en présence de PDE montrent une augmentation de P-Akt avec un maximum compris entre 5 et 10 minutes d'incubation (Figure 68 A). Un deuxième type d'expérience a été réalisé sur des cellules endothéliales incubées pendant 10 minutes en absence et en présence de PDE afin de confirmer les effets des PDE sur l'activation d'Akt (Figure 68 B).



<u>Figure 68:</u> Implication de la protéine AKT lors de la stimulation par les PDE. Après la mise au repos, les cellules HMECs (1x10⁶) sont traitées avec les PDE (1 μg/ml) pendant (A) des temps variables (0 à 60 minutes) ou (B) en absence et en présence de PDE pendant 10 minutes. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps antiphospho-Akt (ser 473). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti Akt total.

L'ensemble de ces résultats montre que la voie PI₃Kinase/Akt/NOS est activée par les PDE dans les cellules endothéliales.

III.3.3. Implication de la PI₃Kinase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP, la tubulogenèse et la production de NO.

Afin de démontrer l'implication de la PI₃Kinase dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP et de la tubulogenèse médiées par les PDE, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de PI₃Kinase, le LY294002. L'augmentation de l'expression de la MT1-MMP induite par les PDE analysée au niveau des ARNm par RT-PCR et au niveau de la protéine par western Blot est totalement supprimée dans les cellules incubées en présence de LY294002 (Figure 69).

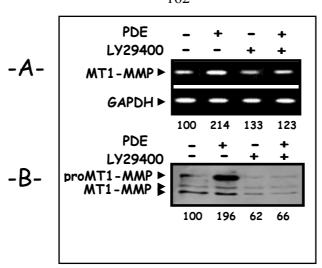
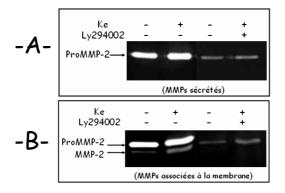


Figure 69: Effet du LY294002 sur l'expression et la synthèse de la MT1-MMP induite par les PDE. (A) les cellules HMECs (1x10⁶) sont incubées en absence ou en présence de LY294002 pendant 45 minutes puis pendant 24 heures en absence ou en présence de PDE (1 μg/mL). Les ARN sont extraits et l'ARNm de la MT1-MMP est analysé par RT-PCR. L'ARNm de la GAPDH est utilisé comme témoin du rendement d'extraction des ARN. (B) Analyse par western blot de la MT1-MMP à l'aide d'un anticorps anti MT1-MMP reconnaissant le domaine catalytique. Après 24 heures d'incubation les protéines membranaires sont extraites et la protéine est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique. Les chiffres représentent les pourcentages par rapport au contrôle100.

Comme il a été précédemment démontré dans notre laboratoire, les PDE sont capables d'entraîner l'augmentation de la proMMP-2 ainsi que son activation au niveau de la membrane via la MT1-MMP. C'est pourquoi nous avons étudié en parallèle l'influence du LY294002 sur ces effets.

Les résultats rapportés sur la figure 70 montrent que le LY294002 suppriment totalement les effets induits par les PDE sur l'accumulation de proMMP-2 et de MMP-2 à la fois dans les milieux conditionnés et associés à la membrane. On note également une forte diminution de la quantité de proMMP-2 dans les cellules incubées en présence de LY294002 par rapport aux cellules contrôles.



<u>Figure 70:</u> Confirmation de l'implication de la PI₃K sur la production et l'activation de la proMMP-2 induites par les PDE. Les cellules HMECs ($5x10^5$ cellules par puit) son incubées pendant 45 minutes en absence ou en présence de LY294002 ($25 \mu M$) puis incubées pendant 24 heures en absence ou en présence de 1 $\mu g/mL$ de PDE. Les milieux conditionnés (A) ainsi que les extraits cellulaires (B) sont analysés par zymographie en gel gélatine (9 % p/v). Le LY294002 est préincubé dans le milieu d'incubation des HMECs, 1 heure avant l'ajout de l'effecteur (PDE).

L'effet du LY294002 sur l'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2 se répercute au niveau du phénotype angiogène des cellules endothéliales car comme le montre la figure 71, la formation de pseudotubes sur Matrigel médiée par les PDE est inhibée en présence de cet inhibiteur.

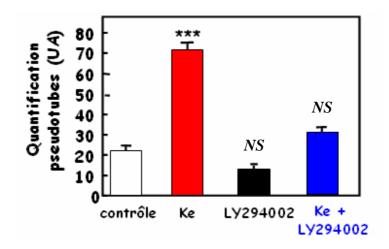


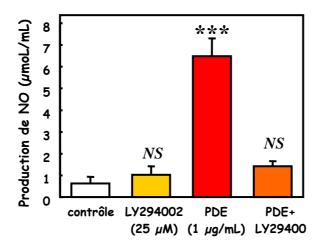
Figure 71: Effet d'un inhibiteur de PI₃Kinase, le LY294002, sur la tubulogenèse. Les cellules HMECs sont cultivées sur un gel épais de Matrigel pendant 45 minutes en absence ou en présence de LY294002 (25 μM) puis en absence ou présence de PDE (1 μg/mL). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont observées en microscopie optique (X 10) et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique. La quantification des réseaux observés se fait à l'aide du logiciel Adobe Photoshop après transformation des Photos en noir et blanc et quantification des pixels. Les pseudotubes apparaissent en pixels noirs sur fond blanc. La quantification correspond alors à la quantité de pixels noirs sur la quantité de pixels totaux. Les résultats sont expromés en unité arbitraire. ***P<0,001.NS, non significatif.

L'ensemble de ces résultats démontre l'implication de la PI₃Kinase dans la tubulogénèse médiée par les PDE à travers l'augmentation de l'expression de la MT1-MMP que ce soit au niveau de son gène ou de la protéine associée à la membrane. Le rôle de cette kinase dans la régulation de la MT1-MMP au cours du processus d'angiogenèse a déjà été décrit dans les cellules endothéliales stimulées par divers facteurs comme les chemokines CCL2 (Galvez et coll., 2005), ainsi que lors de la réorganisation du cytosquelette induite par la cytochalasin D ou le VEGF (Ispanovic et coll. 2006).

Il a été rapporté dans la littérature que la variation de production de NO par différents effecteurs mettait en jeu la voie PI₃Kinase / Akt / eNOS (Moralez-Ruiz et coll., 2001) Afin de faire le lien entre les effets des PDE sur l'activation de cette voie et la production de NO, nous avons utilisé différents inhibiteurs comme le LY294002. Les résultats rapportés au niveau de la figure 72 montrent que l'inhibiteur de PI₃Kinase, le LY294002, supprime les effets des PDE sur la production de NO par les cellules endothéliales.

L'axe PI₃Kinase / Akt est donc impliqué dans la production de NO induite par les PDE, ce qui est a déjà été rapporté dans la littérature pour d'autres effecteurs comme les contraintes de cisaillement (Dimmeler et coll., 1999), les oestrogènes (Hisamoto et coll.,

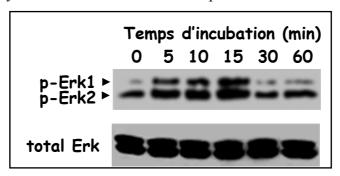
2001), l'angiogenèse induite par la sphingosine 1 phosphate (Rikitake et coll., 2002) ou par la prostaglandine E2 (Namkoong et coll., 2005)



<u>Figure 72:</u> Effet du LY294002 sur la production de NO induit par les PDE. Les cellules HMECs sont incubées pendant 45 minutes en absence ou présence de PDE (1 μg/mL) et en absence ou présence de LY294002 (25 μM. Les milieux conditionnés sont récupérés puis la quantité de NO est dosée par dosage colorimétrique. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de quatre expériences. <0,001, NS, non significatif.

III.3.4. Implication de Erk 1/2 dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE.

Des résultats précédents obtenus dans notre laboratoire ont montré que dans les fibroblastes humains les PDE activent Erk1/2 via un mécanisme indépendant de RAS mais nécessitant la coopération des voies de signalisation PI₃Kinase/Raf-1/Mek1/2 et PKA/b-Raf/Mek1/2 (Duca et coll., 2005). Compte tenu des résultats présentés précédemment, nous avons examiné si un tel mécanisme pouvait exister dans les cellules endothéliales. Dans un premier temps nous avons réalisé une cinétique afin d'étudier l'activation de Erk1/2 en présence de PDE. Comme le montre la figure 73, nous observons une augmentation de la forme phosphorylée de Erk 1/2 avec un maximum à 15 minutes soit légèrement après le maximum de phosphorylation observé au niveau de la protéine Akt.



<u>Figure 73:</u> Cinétique d'action des PDE sur la phosphorylation de Erk 1/2. Après la mise au repos, les cellules HMECs (1x10⁶) sont incubées en présence de PDE (1 μg/ml) pendant les temps indiqués. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western blot avec des anticorps antiphospho-Erk l/2 (T202/Y204). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps Erk total.

Afin de déterminer le rôle de Erk1/2 dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales nous avons utilisé le U0126, inhibiteur spécifique de MEK 1/2, l'activateur de Erk 1/2. L'analyse par RT-PCR des ARNm de la MT1-MMP et par western blot de la protéine montre que U0126 supprime l'augmentation d'expression de la MT1-MMP induite par les PDE (Figure 74).

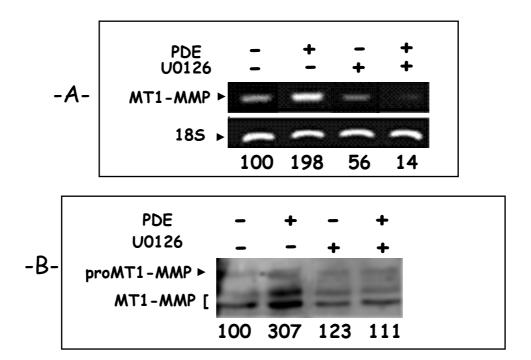


Figure 74: Implication de Erk 1/2 dans l'augmentation de la MT1-MMP induite par les PDE. Les cellules HMECs (1x10⁶) sont cultivées dans un milieu dépourvu de sérum pendant 24 heures. Puis, elles sont préincubées en absence ou présence de UO126 (10 μM) pendant 1 heure suivie d'une autre incubation de 24 heures en absence ou présence de PDE (1 μg/mL). (A) les ARN totaux sont extraits puis une RT-PCR est réalisée afin d'analyser les ARNm de la MT1-MMP, (B) les protéines membranaires sont extraites puis un Western Blot est réalisée à l'aide d'un anticorps anti MT1-MMP reconnaissant le domaine catalytique. Les chiffressous les figures représentent les poucentages calculés par rapport au contrôle 100.

Ces résultats confirment l'implication de la voie Erk 1,2 dans les effets médiés par les PDE.

III.3.5. Rôle des PKA sur l'activation d'Erk 1/2 médiée par les PDE.

Des résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire avaient démontré que les PDE étaient capable d'activer la voie AMPc via la kinase PKA conduisant ainsi à la phosphorylation de Erk1/2 et à la production de MMP-1 dans le milieu extracellulaire de fibroblastes dermiques (Duca et coll., 2002 ; Duca et coll., 2005). C'est pourquoi, nous avons voulu savoir si la voie impliquant la PKA était mise en jeu dans l'activation de la voie Erk1/2 induite par les PDE, et conduisant à la synthèse de MT1-MMP. Pour cela nous avons utilisé deux inhibiteurs spécifiques de PKA : H-89 et KT-5720 et un inhibiteur de PI₃Kinase, le LY294002, comme contrôle positif. Puis nous avons apprécié la capacité des PDE à activer phosphoryler Erk1/2. Comme le montre la figure 75, les PDE sont capables d'induire la phosphorylation de Erk 1/2 avec un maximum situé à 15 minutes comme nous l'avons vu

précédemment. La cinétique de phosphorylation de Erk 1/2 n'est pas modifiée en présence du KT-5720 et du H-89 à la différence du LY294002 qui supprime les effets des PDE sur la phosphorylation de Erk 1/2. Ces résultats démontrent que contrairement aux fibroblastes, les PKA ne sont pas impliquées dans les effets induits par les PDE sur les cellules endothéliales.

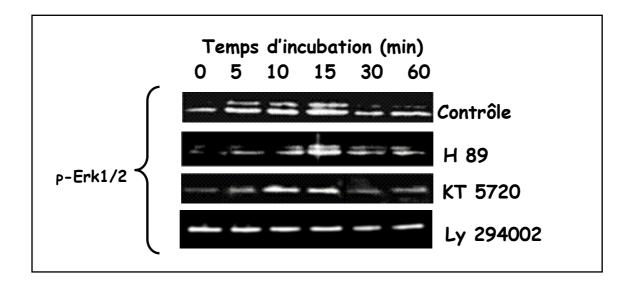
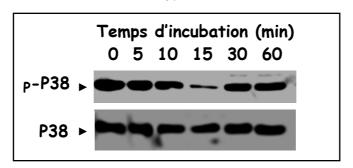


Figure 75: Effet des inhibiteurs de PKA (H-89 et KT-5720) et d'un inhibiteur de PI₃Kinase sur la phosphorylation de Erk 1/2 induite par les PDE. Les cellules HMECs (1x10⁶) sont cultivées sur plastique dans des plaques 6 puits jusqu'à atteindre 90 % de confluence. Les cellules sont préincubées pendant 1 heure en présence des différents inhibiteurs avant la mise en présence des PDE. Après stimulation durant le temps indiqué, les protéines totale sont récupérées en présence d'inhibiteurs de protéinases, puis analysées par western blot à l'aide d'anticorps anti phospho-Erk 1/2. Pour plus de clarté, les blots correspondant à la révélation de Erk 1/2 total n'a pas été présenté sur cette figure mais nous avons vérifié que la quantité totale de Erk 1/2 est similaire sur chaque piste.

III.3.6. Cinétique d'activation de p38 par les PDE.

L'implication de p38 dans les effets biologiques des PDE n'a jamais été démontrée dans aucun type cellulaire. Cependant, étant donné son implication dans l'activation de la MMP-2 et de la MMP-9 médiée par le PMA dans les cellules de Glioblastome (Park et Coll., 2002), il nous a semblé intéressant d'étudier cette voie dans les cellules endothéliales HMECs. Les résultats rapportés sur la figure 76, montrent que les PDE induisent une déphosphorylation de P-p38 avec un maximum à 15 minutes ce qui correspond au maximum d'activation de la voie Erk 1/2. Ce résultat est en accord avec ce qui a été rapporté dans littérature notamment lors de l'activation de la MT1-MMP en culture 3D de cellules endothéliales sur collagène de type I (Boyd et coll, 2005; Singh et coll., 1999) ou lors de l'activation de l'invasion des cellules carcinomateuses induite par le TGF-β1 (Munshi et coll., 2004) où la voie p38 peut agir comme inhibiteur de la voie Erk1/2 et vice versa. L'inhibition de phospho-p38 par les PDE pourrait donc favoriser la phosphorylation de la voie Erk 1/2.

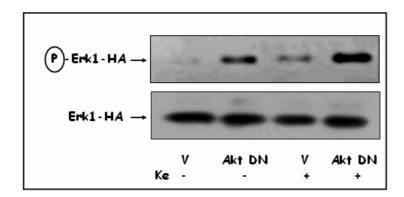


<u>Figure 76:</u> Cinétique de phosphorylation de p38 après traitement par les PDE. Après la mise au repos, les cellules HMECs (1x10⁶) sont incubées en présence de PDE (1 μg/ml) pendant les temps indiqués. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps antiphospho-p38 (Y180). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti p38 total.

III.3.7. Rôle d'Akt dans l'activation de Erk 1/2 médiée par les PDE.

Nos précédents résultats ont montré une augmentation de la forme phosphorylée de Akt en présence de PDE avec un maximum de phosphorylation situé entre 10 et 15 minutes. Connaissant la capacité de la kinase Akt à activer la voie MEK 1/2 /Erk 1/2 et disposant dans notre laboratoire d'un plasmide codant un dominant négatif Akt, nous avons donc étudié les conséquences de l'inactivation de cette kinase sur es effets des PDE et notamment sur la phosphorylation de Erk 1/2.

En accord avec nos précédents résultats, les PDE induisent la phosphorylation et donc l'activation de Erk 1 (Figure 77). Les cellules endothéliales transfectées avec un vecteur vide répondent parfaitement à une stimulation par les PDE. Par contre, l'utilisation du dominant négatif Akt ne bloque pas l'activation de Erk 1 induite par les PDE. Au contraire, une augmentation importante de la phosphorylation de Erk 1 est observée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la kinase Akt peut aussi jouer le rôle de répresseur de la voie Erk 1/2 en inhibant Raf-1 (Zimmermann et coll., 1999).



<u>Figure 77:</u> Effet du dominant négatif Akt sur l'activation de Erk 1 induit par les PDE. Les cellules HMECs (1x10⁶) sont cotransfectées avec Akt-DN (ou un vecteur vide) et pECE-HA-ERKI et pEGFP-CI, ce dernier servant à vérifier l'efficacité de la transfection. Les cellules sont ensuite mises au repos puis stimulées pendant 15 min avec des PDE (1 μg/mL). Les extraits cellulaires sont soumis à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA. La présence des formes phosphorylées de Erk 1-HA est analysée par western-blot avec des anticorps anti-phospho-Erk 1/2 (T202/Y204). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti-Erk 1/2 afin de montrer l'égalité des dépôts.

III.4. Stimulation de la voie GMPc/PKG/MEK1/2/Erk1/2 par le NO conduisant à la régulation de l'expression de la MT1-MMP.

Plusieurs équipes ont démontré que le NO pouvait moduler la synthèse de MMPs dans les cellules endothéliales, comme la MMP-13 (Zaragoza et coll., 2002), la MMP-2 (Milkiewicz et coll., 2006) ou la MMP-9 (Phillips et Birnby, 2004). Nous nous sommes donc logiquement interrogé sur le rôle du NO dans l'activation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE.

III.4.1. Influence des PDE sur la production de GMPc.

Etant donné le rôle du NO via le GMPc dans l'activation de la voie PKG/MEK/Erk et la régulation du promoteur de la MMP-13 (Zaragoza et coll., 2002), nous avons examiné dans un premier temps, l'influence des PDE sur la production de GMPc. Le peptide (VGVAPG)₃ induit une augmentation du GMPc de manière concentration et temps dépendant (Tableau XI). Le lactose inhibe l'effet induit par les PDE ce qui démontre aussi l'implication du récepteur S-Gal.

Effecteurs -	Concentration en GMPc (pmoL/10 ⁶ cellules)				
	Temps d'incubation (minute)				
(VGVAPG) ₃ (μg/mL)	0	5	10	15	
0				ND	
0,1				ND	
0,2				7.5 ± 0.4	
1				36.9 ± 0.8	
10	ND	24.5 ± 0.8	33.8 ± 0.6	63.5 ± 1.2	
25				66.0 ± 0.6	
Lactose (10 ⁻⁴ M)				ND	
(VGVAPG) ₃			_		
(10µg/mL)				4.2 ± 0.4	
+ lactose					

<u>Tableau XI:</u> Influence des PDE sur la production de GMPc. Les cellules HMECs (1x10⁶) sont cultivées sur plastique dans un milieu dépourvu de sérum durant 24 heures. Après ajout du peptide (VGVAPG)₃ durant un laps de temps variable, les milieux conditionnés sont récupérés puis la quantité de GMPc est dosée par une technique immunologique : le GMPc présent dans les échantillons entre en compétition avec le GMPc marqué et coaté sur une plaque à 96 puits. Les résultats représentent la moyenne ± SEM de quatre expériences. ND, non détecté.

III.4.2. Influence du GMPc sur l'expression de la MT1-MMP.

Les résultats précédents suggèrent que les PDE pourraient réguler l'expression de la MT1-MMP via le GMPc. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un analogue de GMPc, le 8-Bromo-GMPc, et analysé son influence sur l'expression de la MT1-MMP.

Les résultats rapportés sur la figure 78 montrent clairement une augmentation concentration dépendante de l'expression de la MT1-MMP que ce soit au niveau des ARNm que de la protéine.

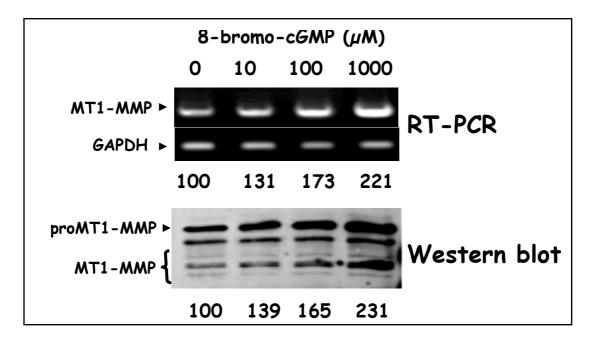


Figure 78: Effet d'un analogue du GMPc sur la synthèse de la MT1-MMP. Après la mise au repos, les cellules HMECs (1x10⁶) sont incubées en présence de 8 Br-cGMP (de 0 à 1000 μM) durant 18 heures. Les ARNs totaux sont ensuite extraits puis soumis à une RT-PCR afin de déterminer le taux d'expression de la MT1-MMP par rapport à celui de la GAPDH. Les extraits cellulaires sont analysés par western-blot à l'aide d'un anticorps anti MT1-MMP reconnaissant le domaine catalytique. Les blots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes présentant des résultats similaires. Les chiffres en dessous des figures représentent les pourcentages par rapport au contrôle 100 déterminés après analyse densitométrique.

Ces résultats confirment l'implication du GMPc dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales.

III.4.3. Influence d'un donneur de NO sur l'expression de la MT1-MMP.

Les effets précédents sont également reproduits par un donneur de NO, le DEA-NOate (Figure 79), ce qui confirme le lien entre les PDE, la production de NO et l'augmentation de l'expression de la MT1-MMP. Ce lien est d'autant plus vrai qu'un inhibiteur de la guanylyl cyclase soluble ODQ, laquelle est responsable de la production de GMPc, supprime totalement les effets des PDE sur l'expression de la MT1-MMP (Figure 80).

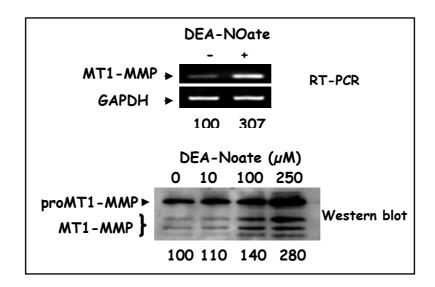


Figure 79: Effet d'un donneur de NO (DEA-NOate) sur l'expression et la synthèse de MT1-MMP. Après la mise au repos, les cellules HMECs $(1x10^6)$ sont incubées en absence ou en présence de DEA-NO (de 0 à 250 μ M) durant 18 heures. Les ARNs totaux sont ensuite extraits puis soumis à une RT-PCR afin d'analyser l'expression de la MT1-MMP par rapport à celle de la GAPDH. Les extraits cellulaires sont analysés par western-blot à l'aide d'un anticorps anti MT1-MMP reconnaissant le domaine catalytique. Les chiffres sous les figures représententy les pourcentages déterminés par rapport au contrôle 100 déterminés après analyse densitométrique.

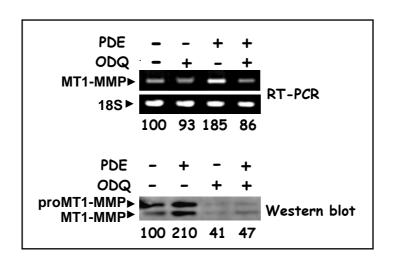
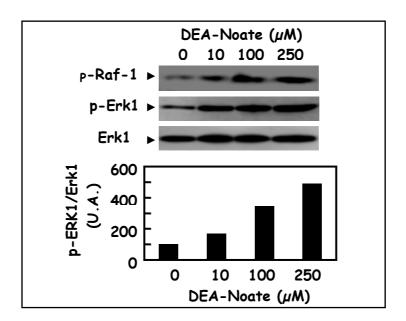


Figure 80: Effet de ODQ sur l'expression de la MT1-MMP induite par les PDE. Après la mise au repos, les cellules HMECs (1x10⁶) sont incubées en absence ou en présence de ODQ (10 μM) pendant une heure suivi d'une seconde incubation de 8 heures (RT-PCR) ou 24 heures (Western blot) en absence ou en présence de PDE (1 μg/mL). Après 8 heures d'incubation, les ARN sont extraits et l'ARNm de la MT1-MMP est analysé par RT-PCR. L'ARNr 18S est utilisé comme témoin du rendement d'extraction des ARN. Au niveau protéique, la MT1-MMP est analysée par western blot à l'aide d'un anticorps anti MT1-MMP reconnaissant le domaine catalytique. Après 24 heures d'incubation les protéines membranaires sont extraites et la protéine est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique. Les chiffres sous les figures représentent les pouventages par rapport au contrôle 100 déterminés après analyse densitométrique.

III.4.4. Implication de la voie raf-1/Erk1/2.

L'implication de Erk 1/2 dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP médiée par les PDE, nous a donc logiquement incité à étudier l'influence du DEA-NOate sur la voie Raf-1/ Erk1/2. Comme le montre la figure 81, le DEA-NOate est capable d'activer la

voie Raf-1/ Erk1/2 de façon concentration dépendante. Ceci est en accord avec ce qui a déjà été décrit dans les fibroblastes murins par Monteiro et coll. en 2005.



<u>Figure 81:</u> Influence du DEA-NOate sur la phosphorylation de Raf-1 (ser 338) et de Erk1 (Tyr 202). Après la mise au repos, les cellules HMECs (1x10⁶) sont incubées en présence de DEA-NOate (de 0 à 250 μM) durant 18 heures. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps anti phospho-Erk 1/2 (T202/Y204). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti Erk1, puis anti Raf-1. L'histogramme représente les rapports p-Erk1/Erk1 calculés après analyse densitométrique des membranes. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire.

Par ailleurs le DEA-NOate à la concentration de 250 μ M induit une activation progressive de Erk 1/2 jusqu'à 90 minutes d'incubation (Figure 82).

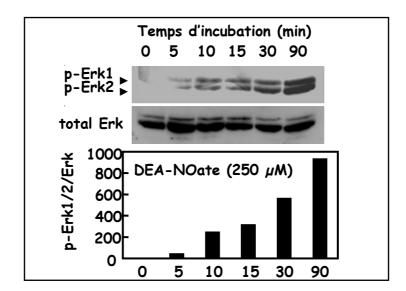
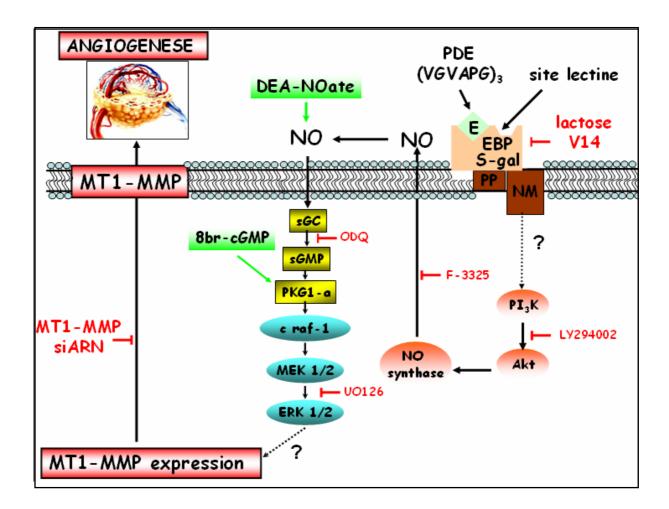


Figure 82: Cinétique d'activation de Erk 1/2 par le DEA-NOate. Après la mise au repos, les cellules HMECs (1x10⁶) sont incubées en présence de DEA-NOate (250 μM) durant différents temps. Les extraits cellulaires sont ensuite analysés par western-blot avec des anticorps antiphospho-Erk 1,2 (T202/Y204). La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti Erk total. L'histogramme représente les rapports Erk1,2/Erk total déterminés par analyse densitométrique des membranes. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire.

L'ensemble de ces résultats montre que l'augmentation de l'expression de la MT1-MMP induite par le NO est médiée par l'axe GCs/PKG/Raf-1/MEK1/2/Erk1/2.

En conclusion, les PDE agissent sur la régulation de l'expression de la MT1-MMP à travers 2 voies de signalisation : la voie $PI_3Kinase/Akt/eNOS$ et la voie NO/GMPc/MEK1/2/Erk1/2. L'ensemble de nos résultats est résumé sur la figure 83.



<u>Figure 83:</u> Schéma récapitulatif de la signalisation intracellulaire médiée par la fixation des peptides d'élastine sur le récepteur S-Gal dans les cellules HMECs. Les effecteurs en rouge induisent une inhibition des effets des PDE. Le DEA-Noate et le 8-bromo-cGMP reproduisent les effets des PDE.

DISCUSSION

I. Discussion

La matrice extracellulaire a été longtemps considérée uniquement comme un échafaudage inerte servant à maintenir la cohésion physique des tissus. Des recherches effectuées ces vingt dernières années ont permis de mettre en évidence que la matrice extracellulaire est une structure extrêmement dynamique, capable d'activer des voies de signalisation intracellulaires influençant un large spectre de fonctions biologiques telles que l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la survie des cellules. Parmi les composantes de la MEC, l'élastine est la protéine la plus résistante et sa demi vie est la plus longue de toutes les molécules. Les principales fonctions biologiques de l'élastine est de conférer l'élasticité nécessaire aux organes et aux tissus. Cependant, des études ont montrés que l'élastine ainsi que les peptides résultant de sa dégradation possèdent diverses propriétés biologiques (Faury et coll., 1998) comme la prolifération des fibroblastes dermiques (Groult et coll., 1991), la chémotaxie pour les monocytes et les fibroblastes (Indik et coll., 1990), la vasodilatation dans les anneaux aortiques (Faury et coll., 1995), la vasodilatation dépend de l'endothélium (Faury et coll., 1998), l'inhibition de la réponse migratoire des cellules musculaires lisses aux chemoattractants (Ooyama et coll., 1987), la régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses (Ito et coll., 1998) et l'augmentation du taux intracellulaire de calcium dans les leucocytes et les cellules endothéliales (Faury et coll., 1998; Varga et coll., 1989). De plus, la réalisation de biomatériaux contenant des protéines dérivées de l'élastine permet la croissance, la prolifération et l'entretien du phénotype des cellules endothéliales (Dutoya et coll., 2000). Il a été montré que les PDE contenant la séquence VGVAPG sont générés à partir de l'élastine pulmonaire par l'élastase leucocytaire humaine dans les lavages broncho alvéolaires chez les patients souffrant d'emphysème (Maccioni et Moon, 1993). De plus, les séquences SGVAPG, AGGLPG et MGGIPG retrouvées dans la chaîne α₁ du collagène de type XV, la chaîne α₂ du collagène de type V et dans les structures covalentes de fibrilline respectivement, miment les effets des PDE dans des modèles d'angiogénèse in vitro. Au sein de notre laboratoire, les propriétés de ces peptides ont très largement été étudiées. A des concentrations retrouvées dans la circulation (10⁻⁶ à 10⁻² mg/mL) (Kucich et coll., 1983; Fulop et coll., 1990), ces peptides sont capables d'induire la réorganisation du cytosquelette dans les cellules endothéliales lorsque ces dernières sont cultivées sur Matrigel comme il a pu être aussi démontré dans les cellules musculaires lisses (Mochizuki et coll., 2002). D'autre part, cette réorganisation du cytosquelette est en accord avec d'autres résultats démontrant l'influence des PDE sur le flux calcique et la réorganisation microtubulaire. Ces propriétés sont associées

à une activation du système MT1-MMP/MMP-2 dans plusieurs modèles cellulaires (Seiki et Yana, 2003) dont les cellules endothéliales où ces peptides augmentent de façon significative l'expression et l'activation de la proMT1-MMP ainsi que de la proMMP-2. Ces effets proangiogéniques sont médiés via le récepteur associé à la membrane EBP étant donné que l'utilisation du lactose ou du peptide V14 (peptide compétiteur) abolie les effets des PDE sur la migration des cellules endothéliales, la formation des pseudotubes et l'activation de la proMT1-MMP et de la proMMP-2. Les résultats obtenus en utilisant des inhibiteurs de la MT1-MMP et qui reproduisent des effets similaires à ceux du lactose et du V-14 sur la migration cellulaire et la tubulogenèse, nous ont encouragé à utiliser la technique d'interférence par l'ARN afin de développer une approche d'invalidation de l'expression de cette enzyme. Les siARN, qui sont les médiateurs de l'interférence par l'ARN, ont été synthétisés par transcription in vitro à l'aide de la polymérase T7 et qui, selon plusieurs études, ont une efficacité 20 fois supérieur aux siARN synthétisés chimiquement. L'amélioration des conditions de synthèse que nous avons apporté a augmenté de façon spectaculaire à la fois le rendement de synthèse mais aussi et surtout le degré de pureté des siARN. En effet, la présence de nombreux produits intermédiaires de réaction peuvent interférer sur le potentiel d'action des siARN en interagissant avec d'autres séquences de l'ARNm entraînant ainsi des conséquences incontrôlable et faussant nos résultats. Les différents essais réalisés dans un premier temps avec le siARN reconnaissant la séquence cible située en position 107 sur l'ARNm de la MT1-MMP (siARN 107), nous ont permis de déterminer la concentration minimum en siARN afin d'obtenir une inhibition maximum de l'expression de la MT1-MMP. Ainsi, la transfection des cellules HMECs avec 25 nM de siARN 107 durant 72 heures est suffisante pour obtenir une inhibition de 75% du taux d'ARNm de la MT1-MMP. Il faut noter que l'utilisation du siARN 228 à la concentration de 50 nM avait aussi une efficacité significative sur l'expression de la MT1-MMP, cependant la concentration d'utilisation des siARN doit être la plus faible possible afin d'éviter la mise en place de la réponse interféron qui déclenche une forte réaction antivirale non spécifique (Stark et coll., 1998). Après avoir testé les quatre siARN synthétisés dans ces conditions, il apparaît que seuls les siARN reconnaissant les cibles situées en position 107 et 228 à partir du codon d'initiation de l'ARNm de la MT1-MMP ont un effet significatif. Il a été rapporté que plus les siARN reconnaissent des séquences cibles proches du codon de départ, plus ces derniers sont efficaces. Cependant, les séquences cibles ne doivent pas être situées dans les 50 premières paires de bases afin d'éviter toutes interférences, via des contraintes stériques, avec le complexe d'initiation de la transcription. De la même façon, des séquences cibles trop éloignées du codon de départ risquent de ne pas être des cibles efficaces étant donné la possibilité accrue de formation de structure secondaire de l'ARNm de type tige boucle (Elbashir et coll., 2001).

La localisation périnucléaire du siARN 107 marqué à la Cyanine 3 est en accord avec ce qui a été rapporté lors de l'utilisation d'autres siARN marqués (Byron et coll., 2002; Nykanen et coll., 2001). Cette localisation pourrait représenter les sites où le complexe RISC reconnaît les siARN, formant ainsi le complexe RISC-siARN activé et qui peut ainsi reconnaître sa séquence cible (Montgomery et coll., 1998). D'autre part cette reconnaissance des séquences cibles sur l'ARNm s'effectue à partir du moment où les ARNm quittent le noyau afin de rejoindre le cytoplasme pour y être traduit, c'est à ce moment que la reconnaissance entre le complexe RISC-siARN et l'ARNm s'effectue, ceci expliquant la localisation perinucléaire du siARN 107. A l'inverse, le ssiARN 107 se localise au niveau du cytoplasme de façon diffuse. Ne reconnaissant aucune séquence cible située sur l'ARNm, il ne possède donc aucune localisation particulière et pourra subir une dégradation. On peut aussi noter que les cellules HMECs transfectées avec le siARN 107 possèdent une morphologie particulière : elles sont ovoïdes avec très peu de lamellipode, ce qui est en accord avec le rôle connu de la MT1-MMP dans le contrôle de la morphologie cellulaire (Kajita et coll., 2001), alors que les cellules transfectées par le ssiARN 107 ont un aspect morphologique tout à fait classique de cellules endothéliales en migration. Ceci a pour conséquence directe la désorganisation de la formation des pseudotudes sur matrigel induite par les PDE. Ce résultat confirme le rôle central joué par la MT1-MMP dans l'angiogénèse induite par les PDE. Récemment, l'équipe de Ueda a aussi eu recours à cette technique d'interférence par l'ARN afin de démontrer que l'inhibition de cette enzyme conduisait à la réduction significative des propriétés invasive des cellules de fibrosarcomes HT-1080 ainsi que des cellules de carcinomes gastriques (Ueda et coll., 2003). Le marquage de la MT1-MMP par un anticorps spécifique couplé à la FITC nous a permis d'apprécier par immunofluorescence à la fois l'abondance et la localisation de la MT1-MMP. L'utilisation du siARN 107 décroît de façon spectaculaire la quantité de MT1-MMP comparé au ssiARN 107. De plus il faut noter que, dans les cellules contrôles ou transfectées par le ssiARN 107, on observe un marquage de la MT1-MMP plus intense au niveau des protusions membranaires sous forme de clusters alors que, pour les cellules transfectées avec le siARN 107, seul le cytosol est très faiblement marqué. Ceci est en accord avec la littérature, en effet il a été démontré que la MT1-MMP se localise au niveau des lamellipodes qui correspond au front de migration des cellules (Sato et coll., 1997; Itoh et coll., 2001; Mori et coll., 2002). Cette localisation est réalisée grâce à l'interaction du domaine hémopexine de la MT1-MMP avec la région « stem » du récepteur au hyaluronane CD44 (Mori et coll., 2002) qui est lui-même associé à l'actine via son domaine cytoplasmique lequel va interagir avec le complexe

protéique Ezrin/Radixin/Moesin (Sato et coll., 1997). Ceci associe donc indirectement la MT1-MMP à l'actine expliquant ainsi en partie comment les PDE, via la MT1-MMP, peuvent entraîner des modifications du cytosquelette et donc la morphologie cellulaire. De plus, la MT1-MMP, et plus particulièrement son domaine hémopexine, est indispensable au relargage de CD44 qui est en partie responsable de la migration cellulaire (Suenega et coll., 2005) tout comme son association avec les intégrines de type \(\beta \) au niveau des protusions membranaires (Ellerbroek et coll., 2001). Nous n'avons pas étudié dans ce travail ce processus. La synthèse de MT1-MMP totale analysée par Elisa confirme l'implication de cette enzyme lors des effets des PDE. Les PDE, tout comme le PMA, qui est un activateur connu de la MT1-MMP, entraînent une forte augmentation de la synthèse de la MT1-MMP totale de l'ordre de 50 % comparée au taux basale. La transfection réalisée à l'aide du siARN 107 abroge cette augmentation faisant revenir le taux de MT1-MMP totale au niveau du contrôle. Etant donné l'importance de la MT1-MMP dans le phénotype pro angiogénique et dans la progression tumorale (Brassart et coll., 1998; Huet et coll., 2002; Ntayi et coll., 2004), cette stratégie d'inhibition de la MT1-MMP représente à nos yeux une alternative à l'utilisation d'inhibiteurs chimiques.

L'importance de la MT1-MMP ainsi que de la MMP-2 dans l'angiogénèse et l'invasion tumorale a été clairement établie par diverses études. Un ralentissement de l'angiogénèse a été observé chez les souris déficientes en MMP-2 (Itoh et coll., 1998) et en MT1-MMP montrant une activation altérée de la proMMP-2 ainsi qu'un défaut de réponse à des facteurs pro angiogénique comme les chimiokines (Galvez et coll., 2005) ou le FGF-2 dans le modèle de corné murin, une déficience dans la vascularisation pulmonaire, une altération de l'invasion vasculaire du cartilage (Zhou et coll., 2000). De plus il a été montré que la MT1-MMP possède un rôle central dans le processus de migration des cellules endothéliales, ainsi que dans l'invasion et la formation de tubes capillaires dans différents modèles d'angiogénèse in vitro, comme la tubulogénèse au sein d'une matrice tridimensionnelle de collagène ou l'invasion dans un gel de fibrine (Lafleur et coll., 2002; Galvez et coll., 2001). Bien que ce soit l'une de ses fonctions, le rôle de la MT1-MMP ne se cantonne pas à la dégradation de divers éléments de la matrice extracellulaire comme les collagènes I, II, et III, la gélatine, les laminines 1 et 5, la fibronectine, la vitronectine, l' aggrécanne, la fibrine, et le lumicanne (d'Ortho et coll., 1997; Ohuchi et coll. 1997; Hiraoka et coll., 1998; Koshikawa et coll., 2000; Li et coll., 2004), mais elle est capable de cliver un certains nombre de protéines membranaires comme CD44, l'intégrine $\alpha_v \beta_3$ et la transglutaminase tissulaire (tTG). Toutes ces cibles étant connues comme éléments régulateurs de la migration cellulaire (Seiki, 2003).

Un lien entre la dégradation de l'élastine, l'augmentation de la MT1-MMP et l'angiogénèse est également observé dans plusieurs pathologies cardiovasculaires (Einstein 1991; Thompson et coll., 1996). En effet, la dégradation des fibres élastiques (Robert et coll., 1980) et la surexpression de la MT1-MMP (Hong et coll., 2000) ont été observées dans ces pathologies. C'est pourquoi, après avoir validé la stratégie d'inhibition de la MT1-MMP par ARN interférence, il nous ait apparut tout à fait cohérent d'analyser le comportement des cellules endothéliales transfectées avec le siARN 107 sur un substrat mimant la matrice extracellulaire comme le collagène de type I et le Matrigel, un équivalent de membrane basale. Ces dernières forment naturellement des structures de type pseudotubes sur de telle matrice et ce phénomène est amplifié en présence de PDE via essentiellement une augmentation de la MT1-MMP (Robinet et coll., 2005). C'est pourquoi les cellules HMECs ont été transfectées avec le siARN 107 avant d'être cultivées sur Matrigel en présence de peptides d'élastine. Les cellules transfectées avec le siARN 107 ne répondent plus aux PDE et perdent quasiment toutes leur aptitude à former des pseudo capillaires démontrant ainsi que la MT1-MMP est l'enzyme clé responsable des effets des PDE sur les cellules endothéliales.

Des études précédentes réalisées dans notre laboratoire ont démontré que les PDE sont capable d'augmenter de façon significative l'expression ainsi que la synthèse de la MMP-2 et la MT1-MMP. Ceci a été démontré dans les cellules issues de fibrosarcomes HT-1080 (Brassart et coll., 1998), et dans les cellules de mélanomes (Ntayi et coll. 2004). L'induction de la MT1-MMP dans les cellules endothéliales a été démontrée comme incontournable dans l'angiogénèse *in vivo* et *in vitro* induit par de nombreux facteurs (Galvez et coll., 2005). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la MT1-MMP tels que le TIMP-2 ou une chlorométhylcétone (inhibiteur de la furine convertase) abroge les effets des PDE sur l'angiogénèse induite par ces derniers. L'ensemble de nos résultats ont donc conforté l'implication de la MT1-MMP dans l'angiogenèse. Cependant les voies de signalisation impliquées dans les phénomènes induits par les PDE dans les cellules endothéliales sont totalement inconnues à l'heure actuelle.

Le rôle de la PI₃Kinase a été décrit dans l'effet pro angiogénique de différents facteurs tels que les chimiokines MCP-1 et IL-8 (Galvez et coll., 2005), le VEGF-A et la cytochalasine D induisant une réorganisation du cytosquelette (Ispanovic et coll., 2006). Elle est aussi impliquée lors du phénomène d'imitation de la vasculogénèse par les cellules de mélanome mettant en jeu essentiellement la MT1-MMP. C'est pourquoi, ces résultats issus de la littérature nous on conduit à examiner le rôle de la PI₃Kinase dans les effets des PDE sur les cellules endothéliales. Un test d'activité de la PI₃Kinase nous a tout d'abord permis de démontrer que la sous-unité p110γ était impliquée dans ces effets puisqu'en présence de PDE la quantité de PiP3 synthétisé est augmentée de façon significative. La PI₃Kinase a déjà été

identifié comme médiatrice de l'angiogénèse via l'expression de VEGF et HIF-1α. Cependant, seul la sous unité p110α et/ou β ont pu clairement être impliqué tout comme dans l'angiogénèse induite par les fibroblastes via α_νβ₃ et le VEGF-A (Liu et coll., 2003) ou la sphingosine-1-phosphate (Singleton et coll., 2005). Aucune autre étude n'avait donc auparavant clairement établi la participation de la sous unité p110y, d'autant plus que l'inhibiteur spécifique de la PI₃Kinase, le LY294002, diminue l'expression et la synthèse de la MT1-MMP lorsque cette dernière est stimulée par les PDE. Il est largement admis que la voie de signalisation PI₃Kinase/Akt est responsable de la survie cellulaire via l'activation de IKK-α ou la phosphorylation de la protéine Bad (Brunet et coll., 1999). D'autre part, il a pu être démontrer dans notre laboratoire que les PDE étaient capables de favoriser la survie des fibroblastes, dans notre étude nous démontrons également que les PDE augmentent la survie des cellules endothéliales. Compte tenu du rôle de Akt dans la survie cellulaire, l'étude de l'état d'activation de la protéine kinase Akt nous est donc apparut pertinente. L'analyse de la phosphorylation d'Akt, qui est l'une des cibles physiologique principale du PiP3 synthétisée par la PI₃Kinase, a démontré un pic de phosphorylation après 10 minutes de stimulation par les PDE au niveau de la sérine situé en position 473 laquelle est essentielle à l'activité d'Akt (Lynch et coll., 1999). Quand à la voie Erk1/2, son implication dans l'angiogénèse induite par la MT1-MMP en lattis de collagène a été démontrée (Hass et coll., 2005), ainsi que lors de la réorganisation du cytosquelette, phénomène impliqué lors de phase précoce de l'angiogénèse (Ispanovic et coll., 2006). Dans notre travail, nous démontrons clairement que la voie Erk1/2 est activée par les PDE avec un maximum de phosphorylation à 15 minutes alors que la voie p38 est inhibée avec là aussi un maximum de déphosphorylation à 15 minutes. Plusieurs équipes ont déjà souligné l'interconnexion des voies Erk1/2 et p38 notamment dans les cellules de carcinomes où l'induction de la MT1-MMP par le TGF-\beta se traduit par une phosphorylation de la voie Erk1/2 et une déphosphorylation de la voie p38. L'utilisation de différents inhibiteurs leurs a permis de démontrer que l'inhibition de la voie p38 potentialise la voie Erk1/2 et donc la synthèse de la MT1-MMP (Munshi et coll., 2003). Plus récemment, Boyd et collaborateurs ont montré que l'angiogenèse induite par le collagène de type I via la MT1-MMP est médiée par la voie Erk1/2 et que la voie p38 agissait comme rétrocontrôle négatif de la voie Erk1/2 (Boyd et coll., 2005). Nous pouvons donc suggérer que ce même phénomène de rétroaction de la voie p38 sur la voie Erk1/2 se déroule lors de la stimulation des cellules endothéliales par les PDE. Concernant l'induction de la sécrétion et de l'activation de la MMP-2 par les PDE, cette dernière est aussi inhibée par l'utilisation du LY294002 démontrant l'implication de la PI₃Kinase dans ces effets. Cette voie à déjà été mise en évidence lors de la fixation du ligand au récepteur EphB4 conduisant à l'induction de

l'angiogénèse via la sécrétion de MMP-2 (Steinle et coll., 2002) tout comme lors de la réorganisation du cytosquelette induite par le VEGF (Ispanovic et coll., 2002).

Les voies PI₃Kinase/Akt et Erk1/2 sont donc impliqué dans les processus induits par les PDE sur les cellules endothéliales conduisant à l'angiogénèse. Il est largement admis que la voie PI₃Kinase/Akt peut interagir sur la voie Erk1/2 via Raf-1 (Moelling et coll., 2002). C'est pourquoi l'utilisation d'un plasmide codant un dominant négatif d'Akt (Akt-DN) s'avèrait intéressant afin de pouvoir étudier l'importance de Akt sur l'activation de Erk1/2. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation du Akt-DN n'a aucun effet sur la phosphorylation de Erk1 induit par les PDE. Au contraire, la phosphorylation sur Erk1 induite par les PDE est exacerbée lorsque les cellules sont transfectées avec le plasmide codant le Akt-DN. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que Akt est connu pour inhiber Raf-1 et B-Raf et que la PI₃Kinase est capable d'activer la voie Erk1/2 via Raf-1 notamment lors de la stimulation par l'IGF-1 dans les cellules myoblastique L6 (Cross et coll., 1994), l'IL-8 dans les neutrophiles (Knall et coll., 1996) ou bien lors de l'adhésion des cellules COS-7 sur un substrat de fibronectine (King et coll., 1997). Ainsi, l'inactivation de Akt par le dominant négatif pourrait permettre à la PI₃Kinase d'activer de façon plus conséquente la voie Erk1/2. Le mécanisme par lequel la PI₃Kinase peut phosphoryler Raf-1 sur la sérine 338 et l'activer pourrait faire intervenir les sérine/thréonine kinase de la famille PAK (p21-activated protein kinase). Cette famille de kinases est composée de deux groupes : le premier est constitué de PAK1, 2 et 3 et le second de PAK4, 5 et 6, beaucoup moins connues. Les PAK s'associent aux petites protéines G Rac et Cdc42, mais seulement le groupe 1 est activé par ce mécanisme (Jaffer et Chernoff, 2002). Le rôle de PAK3 dans la phosphorylation de la sérine 338 de Raf-1 a été démontré (King et coll., 1998 ; Sun et coll., 2000) et PAK1 peut également participer à la phosphorylation de ce site et à l'activation de Raf-1 (Chaudhary et coll., 2000). Dans cette étude, les auteurs proposent un modèle d'activation de Raf-1 : l'induction de Ras conduit à l'activation des PI₃Kinase de classe I_A. Les produits lipidiques de l'action de la PI₃Kinase stimulent des Rac ou Cdc42-GEFs conduisant à l'activation de ces protéines G qui peuvent ainsi activer PAK1. PAK1 peut alors phosphoryler Raf-1 sur la sérine 338 et conduire à son activation. D'autre part, la kinase Akt, qui est activé lors de la stimulation par les PDE, peut elle aussi interagir sur la voie Erk1/2, plus précisément sur la sérine 259 de Raf-1, mais cette fois ci en inhibant cette dernière comme il a pu être démontré lors de la stimulation des cellules MCF-7 par l'IGF-1 (Moelling et coll., 2002). On assiste donc à deux effets antagonistes de la voie PI₃Kinase/Akt sur Raf-1 : PI₃Kinase est capable de l'activer alors qu'Akt de l'inhiber. Ceci peut explique pourquoi l'utilisation du Akt-DN entraîne une phosphorylation accrue de Erk1 que ce soit au niveau du taux basale ou en présence de PDE, puisque Akt ne pourra plus jouer son rôle répresseur.

Comme nous l'avons cité précédemment, la signalisation induite par les PDE dans les fibroblastes a été très largement étudiée dans notre laboratoire et les résultats obtenus démontrent que deux voies de signalisation agissent en synergie afin d'activer la voie centrale Erk1/2 : la voie PI₃Kinase qui est activé par une protéine G et la voie mettant en jeu l'AMPc via la PKA. D'autre part, ce type d'activation de la voie Erk1/2 par la voie impliquant l'AMPc a déjà été décrit dans les cellules endothéliales aortiques de porc (Klingenberg et coll. 2004). Cette voie de signalisation a pu être mise hors de cause via l'utilisation de deux inhibiteurs chimiques de la PKA : le KT-5720 et le H-89. En effet, ces deux inhibiteurs ont été testé sur la capacité des PDE à phosphoryler Erk1/2 et les résultats obtenus démontrent que la voie impliquant la PKA n'est pas mise en jeu lors de la phosphorylation de Erk1/2 par les PDE puisque l'on observe toujours un pic de phosphorylation de Erk1/2 après 15 minutes de stimulation par les PDE. Ceci est à opposer à l'action du LY294002 qui lui abroge la phosphorylation de Erk1/2 induite par les PDE.

Les études menées ces dernières années ont démontrées que le NO issus de l'endothélium est un élément majeur du « switch » angiogénique. Le NO a aussi été montré comme possédant des propriétés pro et anti angiogéniques. En effet, selon sa concentration le NO peut avoir des effets antagonistes (Jones et coll., 2004). D'autre part, il a aussi été montré que les PDE issus de l'exon 26 de la tropoélastine étaient capable d'induire la production de NO via l'induction de la eNOS (Ostuni et coll., 2002). Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'augmentation de calcium intracellulaire induit par les PDE (Faury et coll., 1998) pouvait avoir comme conséquence l'activation de la calmoduline (calcium dépendante) qui est ellemême un activateur de l'eNOS. On sait, par ailleurs, que Akt est un activateur de eNOS. Nos résultats sur l'activation de Akt en présence de PDE nous ont poussé à approfondir l'étude des effets de ces peptides sur la production de NO dans les cellules endothéliales. Dans un premier temps, afin d'apprécier l'importance de la production de NO dans les effets des PDE, nous avons utilisé deux inhibiteurs chimiques de NO synthase : le F-3325 et le L-NIO. L'effet de ces derniers a été apprécié sur les différents effets des PDE, notamment sur l'expression de la MT1-MMP et de la MMP-2. Les résultats obtenus montrent que l'utilisation d'inhibiteurs de NO synthase entraîne la disparition des effets des PDE impliquant ainsi la eNOS dans les effets de ces derniers. Ceci est en accord avec les résultats que nous avons obtenus précédemment : en effet, nous avions démontré que la kinase Akt était phosphorylée sur la sérine 473 après stimulation des cellules par les PDE, or il a été démontré qu'Akt était capable d'activer la eNOS via sa phosphorylation sur la sérine 1177, notamment lors de l'angiogénèse induite par le VEGF (Michel et coll., 2001). D'autre part, une étude récente a pu montrer que la voie Erk1/2 était capable d'induire la phosphorylation et donc l'activation de la eNOS (Cale et coll., 2006). Ces différentes voies d'activation vont conduire à la synthèse de NO par

la eNOS, d'autant plus qu'il faut noter que la voie d'activation de la eNOS mettant en jeu l'AMPc et la PKA n'est pas impliqué dans notre système alors que c'est une des voies principales connues pour l'activation de la eNOS (Michell et coll., 2001).

La cinétique ainsi que la production de NO induite par les PDE a été alors comparées à celles induites par le VEGF dans les cellules endothéliales. Les résultats obtenus montrent que cette production est quasiment similaire. L'utilisation de différents inhibiteurs ainsi que d'un agoniste du récepteur EBP ont permis de mettre en avant les entités protéiques mises en jeu lors de la production de NO induite par les PDE. En effet le LY294002, inhibiteur spécifique de la PI3Kinase, est capable d'abroger les effets des PDE sur la production de NO confirmant ainsi l'implication de l'axe PI₃Kinase/Akt. De la même façon, l'inhibiteur de la NO synthase, le F-3325, entraîne les mêmes conséquences que le LY294002. D'autre part, l'inactivation du récepteur des PDE, via l'utilisation d'un peptide compétiteur ou du lactose, a pour conséquence d'annuler les effets des PDE sur la production de NO démontrant ainsi que ces effets sont bien médiés par le récepteur S-Gal associé à la membrane. Ces différents résultats démontrent que la production de NO induite par les PDE est essentiellement du à l'activation de eNOS médiée par la voie de signalisation PI₃Kinase/Akt via le récepteur EBP. En effet l'inhibition de cette voie va entraîner l'impossibilité d'activation de la eNOS par Akt, l'impossibilité d'activation de la voie Erk1/2 par la PI₃Kinase, qui est la voie d'activation de la MT1-MMP, et le rétrocontrôle positif de la voie Erk1/2 sur la eNOS ne pourra avoir lieu. Tous ces évènements vont conduire à la désorganisation de la formation des pseudotubes par les cellules endothéliales en présence de cet inhibiteur.

Etant donné le potentiel des PDE à induire la libération de NO dans le milieu extracellulaire, nous nous sommes interrogé sur le rôle joué par ce dernier une fois sécrété dans le milieu extracellulaire par les cellules endothéliales. C'est pourquoi nous avons utilisé un donneur chimique de NO: le DEA-NOate. Ce composé chimique lorsqu'il est mis en solution aqueuse va être hydrolysé et ainsi libérer du NO dans le milieu qui va pouvoir diffuser librement. Plusieurs études ont montré que le NO était capable de réguler de façon positive ou négative l'expression de différents composés de la matrice extracellulaire comme le collagène, la fibronectine, la laminine (Trachtman et coll., 1995), le biglycane (Shihab et coll., 2000), ainsi que des enzymes responsable du remaniement de cette matrice comme les MMP-2 (Hirai et coll., 2001; Jurasz et coll., 2001), MMP-9 (Eberhardt et coll., 1999), MMP-13 (Sasaki et coll., 1998; Zaragoza et coll., 2002), TIMP-1, tPA et PA-1 (Eberhardt et coll., 1999 et 2002). C'est la raison pour laquelle nous avons apprécié par RT-PCR semi quantitative et par Western Blot, l'expression de la MT1-MMP après stimulation par différentes concentrations de DEA-NOate. Il s'avère que pour une concentration de 250 μM,

le DEA-NOate est capable d'activer de façon significative l'expression de MT1-MMP. Il faut noter qu'à la concentration de 250 μ M, l'effet du donneur chimique de NO est maximum sur la MT1-MMP, cependant des concentrations supérieures ont un effet inverse et inhibent la synthèse de la MT1-MMP (résultats non rapportés). En effet, il a déjà été montré dans la littérature qu'à de forte concentration le NO est capable d'entraîner la formation d'ions superoxyde qui sont toxiques pour la cellule entraînant un disfonctionnement cellulaire (Squadrito et Pryor, 1998). D'autre part une étude plus récente à démontrer l'action anti angiogénique, via l'inhibition de la voie Erk1/2, d'un donneur de NO lorsque ce dernier est utilisé à de fortes concentrations (Jones et coll., 2004). Au vue de ces résultats, la concentration utilisée lors des expériences suivantes a été fixé à 250 μ M de DEA-NOate, concentration à laquelle les effets de ce dernier sont maximum sur l'expression et la synthèse de la MT1-MMP.

Après avoir démontré que le NO synthétisé par les PDE pouvait entraîner la synthèse de MT1-MMP, nous nous sommes intéressés aux mécanismes. En effet, différentes équipes ont montré que le NO pouvait diffuser au sein de la cellule et activer certaines voies de transductions dans les cellules endothéliales comme la voie p21Ras/Raf-1/Erk1/2 via la nitrosylation sur la cystéine 118 et conduisant à la synthèse de VEGF (Deora et coll., 2000) ou la voie GCs/PKG 1-α/Raf-1/Erk1/2 via l'interaction directe du NO avec l'atome de fer hémique de la guanylase cyclase ce qui va conduire à la synthèse de la MMP-13 (Zaragoza et coll., 2002). Les expériences que nous avons réalisées ont pu démontrer qu'un donneur de NO était capable d'activer les kinases Raf-1 et Erk1/2 de façon concentration dépendante et continue dans le temps. Comme nous l'avons cité précédemment, le NO est capable d'activer la GCs et donc d'induire la production de GMPc au sein de la cellule conduisant à l'activation de la PKG 1-α et de la voie Erk1/2. C'est pourquoi nous avons utilisé un analogue chimique du GMPc, le 8-Br-cGMP, afin de mimer les effets du NO induit par les PDE. Le résultat obtenu démontre que l'analogue de GMPc est capable d'augmenter l'expression de la MT1-MMP et de reproduir ainsi les effets des PDE. Ce résultat démontre ainsi que la voie induite par le NO, en l'occurrence GCs/PKG 1-α, est capable « d'alimenter » la voie Erk1/2 et de maintenir son activation dans le temps alors que les PDE ne sont capable d'activer cette voie aque pendant une période de 15 minutes après leurs contact avec les cellules endothéliales. . L'utilisation d'un inhibiteur de la voie GCs/PKG 1-α, en l'occurence ODQ, a entraîné la disparition des effets des PDE sur l'induction de la MT1-MMP démontrant ainsi l'importance de cette voie qui est induite par le NO issu des effets des PDE. C'est la première fois que cette voie de signalisation est mise en évidence lors de la régulation de la MT1-MMP.

Les tissus riches en élastine sont le foyer de tumeur le plus souvent très agressives (poumon, peau, sein...). En effet, il a été montré notamment au sein de notre laboratoire que

l'élastolyse induite par les cellules tumorales peut conduire à la collagenolyse via la fixation des PDE sur leur récepteur et la sécretion de MMP-1 notamment dans les fibroblastes (Duca et coll., 2002). Nous avons démontré que ces fragments sont aussi capables d'une part d'induire la libération d'un certains nombres de cytokines et de facteurs de croissance ayant des propriétés pro angiogéniques mais aussi d'induire un phénotype angiogène des cellules endothéliales via l'induction de la MT1-MMP permettant ainsi la vascularisation de la tumeur. Tous ces élements démontrent que l'on à faire à une boucle de rétroaction : les cellules tumorales dégradent les composants de la matrice extracellulaire (comme l'élastine) et les produits de cette dégradation vont permettre l'amplification du phénoype tumorale des cellules.

II. Perspectives.

L'ensemble des résultats obtenus lors de nos travaux nous ont permis d'envisager plusieurs perspectives à court et moyen termes :

- Tout d'abord valider le système d'inhibition de la MT1-MMP sur un modèle *in vivo*. En effet, disposant à présent de cellules transfectées de facon stable avec le plasmide pRNATIN, ces dernières pourraient être injectées dans des souris. Nous pourrions ainsi apprécier *in vivo* l'effet de l'inhibition de la MT1-MMP sur la croissance d'une tumeur. Ceci pouvant déboucher sur une approche thérapeutique via notamment l'utilisation de rétrovirus codant pour le siARN 107.
- Notre étude à confirmer le rôle amplificateur des PDE notamment dans la progression tumorale. Dans la même optique que la perspective précédente, il serait intéressant de pouvoir développer une stratégie visant à inhiber le récepteur de l'élastine de façon stable. Cette approche est en cours de réalisation dans notre laboratoire.
- La signalisation des PDE conduisant à l'induction de la MT1-MMP et donc de l'angiogenèse pourra être complétée. En effet, nous ne connaissons pas les facteurs de transcription impliqués dans l'augmentation de l'expression de la MT1-MMP par les PDE ou le NO. Les facteurs de transcription de la famille ETs-1 ont été mis en évidence dans la régulation de la MT1-MMP, leurs implications pourraient donc être logiquement envisagées.

Bibliographie

Agata J, Miao RQ and al (2000). Bradykinin B (1) Receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. Hypertension. 36:364-70.

Ahokas K, Lohi J, Illman SA, Llano E, Elomaa O, Impola U and al (2003). Matrix metalloproteinase-21 is expressed epithelially during development and in cancer and is upregulated by transforming growth factor-beta1 in keratinocytes. Lab Invest. 83:1887-1899.

Ahonen M, Baker AH and Kahari VM (1998). Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. Cancer Res. 58:2310-2315.

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

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

Ala-aho R, Kahari VM (2005). Collagenases in cancer. Biochimie. 87(3-4):273-86.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. EMBO J. 15(23):6541-51.

Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP and al (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. Development. 122:1723-1736.

Alfonso-Jaume MA, Mahimkar R, Lovett DH (2004). Co-operative interactions between NFAT (nuclear factor of activated T cells) c1 and the zinc finger transcription factors Sp1/Sp3 and Egr-1 regulate MT1-MMP (membrane type 1 matrix metalloproteinase) transcription by glomerular mesangial cells. Biochem J. 380:735–747.

Alonso D and Radomski MW (2003). The nitric oxide-endothelin-1 connection. Heart Fail Rev. 8:107-15.

Andrews KL, Triggle CR and al (2002). NO and the vasculature: where does it come from and what does it do? Heart Fail Rev. 7:423-45.

Anilkumar N, Uekita T, Couchman JR, Nagase H, Seiki M and Itoh Y (2005). Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. FASEB J. 19:1326-1328.

Ara T, Deyama Y, Yoshimura Y, Higashino F, Shindoh M, Matsumoto A and al (2000). Membrane type 1-matrix metalloproteinase expression is regulated by E-cadherin through the suppression of mitogen-activated protein kinase cascade. Cancer Lett. 157:115-121.

Armstrong PB and Quigley JP (1999). Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. Dev Comp Immunol. 23:375-390.

Backstrom JR and Tokes ZA (1995). The 84-kDa form of human matrix metalloproteinase-9 degrades substance P and gelatin. J Neurochem. 64:1312-1318.

Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ and Tokes ZA (1996). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). J Neurosci. 16:7910-7919.

Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G and Newby AC (1999). Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. Br J Cancer. 79:1347-1355.

Banerjee D, Slack F (2002). Control of developmental timing by small temporal RNAs: a paradigm for RNA-mediated regulation of gene expression. Bioaasays. 24:119-129.

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

Barmina OY, Walling HW, Fiacco GJ, Freije JM, Lopez-Otin C, Jeffrey JJ and al (1999). Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. J Biol Chem. 274:30087-30093.

Barroso B, Abello N, Bischoff R. Study of human lung elastin degradation by different elastases using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry (2006). Anal Biochem. 358(2):216-24.

Bashir MM, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Rosenbloom JC, Abrams W, Fazio M, Uitto J and Rosenbloom J (1989). Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. J Biol Chem. 264:8887-91.

Bauer SM, Bauer RJ, Liu ZJ, Chen H, Goldstein L, Velazquez OC (2005). Vascular endothelial growth factor-C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen constriction in three-dimensional collagen gels. J Vasc Surg. 41(4):699-707.

Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY (2001). Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membranetype metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. J Biol Chem. 276:18415–18422.

Benbow U and Brinckerhoff CE (1997). The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? Matrix Biol. 15:519-526.

Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A (2002). Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. Circ Res. 90(7):784-91.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Biol. 2:737–744.

Bernstein E, Caudy A.A, Hammond SM, Hannon GJ (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. Nature. 409:363-366.

Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ and Dubertret L (1991). Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases. J Invest Dermatol. 97:679-685.

Betsholtz C (2003). Biology of platelet-derived growth factors in development. Birth Defects Res C Embryo Today. 69:272–285.

Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bogoyevitch MA, Wang Z, Soloway PD and al (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. Cancer Res. 61:3610-3618.

Bisaccia F, Castiglione-Morelli MA, Spisani S, Ostuni A, Serafini-Fracassini A, Bavoso A and Tamburro AM (1998). The amino acid sequence coded by the rarely expressed exon 26A of human elastin contains a stable beta-turn with chemotactic activity for monocytes. Biochemistry. 37:11128-35.

Blaszczyk J, Tropea J.E, Bubunenko M, Routzahn K.M, Waugh D.S, Court D.L (2001). Crystallographic and modeling studies of RNAse III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. Structure. 9:1225–1236.

Blood CH and Zetter BR (1989). Membrane-bound protein kinase C modulates receptor affinity and chemotactic responsiveness of Lewis lung carcinoma sublines to an elastin-derived peptide. J Biol Chem. 264:10614-20.

Blood CH, Sasse J, Brodt P and Zetter BR (1988). Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. J Cell Biol. 107:1987-93.

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S and Kuliopulos A (2005). PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. Cell. 120:303-313.

Bond M, Murphy G, Bennett MR, Amour A, Knauper V, Newby AC and al (2000). Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic activity. J Biol Chem. 275:41358-41363.

Bornstein P, Sage EH (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol. 14(5):608-16.

Boulanger CM (1999). Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. J Mol Cell Cardiol. 31:9-49.

Boulay A, Masson R, Chenard MP, El Fahime M, Cassard L, Bellocq JP and al (2001). High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. Cancer Res. 61:2189-2193.

Boyd PJ, Doyle J, Gee E, Pallan S, Haas TL (2005). MAPK signaling regulates endothelial cell assembly into networks and expression of MT1-MMP and MMP-2. Am J Physiol Cell Physiol. 288(3):C659-68

Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F and Kirchner T (1999). Beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. Am J Pathol. 155:1033-1038.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54.

Brand K, Baker AH, Perez-Canto A, Possling A, SacharjaT M, Geheeb M and al (2000). Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 into the liver tissue. Cancer Res. 60:5723-5730.

Brassart B, Randoux A, Hornebeck W, Emonard H (1998). Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) expression by elastinderived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. Clin Exp Metastasis. 16(6):489-500.

Brennecke J, Cohen SM (2003a). Towards a complete description of the microRNA complement of animal genomes. Genome Biol. 4(9):228.

Brennecke J, Hipfner Dr, Stark A, and al (2003b). Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila. Cell. 113:25-36.

Bressan GM, Argos P, Stanley KK (1987). Repeating structure of chick tropoelastin revealed by complementary DNA cloning. Biochemistry. 26(6):1497-503.

Bressan GM, Prockop DJ (1977). Is newly-secreted elastin cleaved to a smaller molecule before being incorporated into crosslinked elastin fibers? Adv Exp Med Biol. 79:443-51.

Brettell LM and McGowan SE (1994). Basic fibroblast growth factor decreases elastin production by neonatal rat lung fibroblasts. Am JRespir Cell Mol Biol. 10:306-15.

Brooks PC, Silletti S, Vonschalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA (1998). Disruption of angiogenesis by PEX, a non catalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. Cell. 92:391-400.

Brown PL, Mecham L, Tisdale C and Mecham RP (1992). The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket. Biochem Biophys Res Commun. 186:549-55.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell. 96(6):857-68.

Brunner F and Wolkart G (2001). Endothelial NO/cGMP system contributes to natriuretic peptide-mediated coronary and peripheral vasodilation. Microvasc Res. 61:102-10

Buisson AC, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E and al (1996). Gelatinase B is involved in the *in vitro* wound repair of human respiratory epithelium. J Cell Physiol. 166:413-426.

Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer. 3(6):401-10.

Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade VW (1998). The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. J Biol Chem. 273:871-880.

Cale JM, Bird IM (2006). Inhibition of MEK/ERK1/2 signalling alters endothelial nitric oxide synthase activity in an agonist-dependent manner. Biochem J. 398(2):279-88.

Callahan JW (1999). Molecular basis of GMl gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure-function studies of lysosomal beta-galactosidase and the nonlysosomal beta-galactosidase-like protein. Biochim Biophys Acta. 1455:85-103.

Cha HJ, Okada A, Kim KW, Sato H and Seiki M (2000). Identification of cis-acting promoter elements that support expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in v-src transformed Madin-Darby canine kidney cells. Clin Exp Metastasis. 18:675-681.

Chambers AF, Groom AC and MacDonald IC (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer. 2:563-72.

Chang C and Werb Z (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Trends Cell Biol. 11:S37-S43.

Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, Cobb MH, Marshall MS, Brugge JS (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. Curr Biol. 10(9):551-4.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP (2004a). MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. Science. 303:83-86.

Chen HH, Wang DL. Nitric oxide inhibits matrix metalloproteinase-2 expression via the induction of activating transcription factor 3 in endothelial cells (2004b). Mol Pharmacol. 65(5):1130-40.

Chen XP, Enioutina EY and Daynes RA (1997). The control of IL-4 gene expression in activated murine T lymphocytes: a novel role for neu-1 sialidase. J Immunol. 158:3070-80.

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T and Hidaka H (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H- 89), of PC 12D pheochromocytoma cells. JBiol Chem. 265:5267-72.

Chun TH, Sabeh F, Ota I, Murphy H, McDonagh KT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Allen ED, Weiss SJ (2004). MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix. J Cell Biol. 167:757-767.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. Endocrinology. 133:1292-9.

Cockerill GW, Gamble JR, Vadas MA (1995). Angiogenesis: models and modulators. Int Rev Cytol. 159:113-60.

Cogoni C, Macino G (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. Genes Development. 10:638-643.

Corcoran ML and Stetler-Stevenson WG (1995). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. J Biol Chem. 270:13453-13459.

Cornelius LA, Nehring LC, Roby JD, Parks WC, Welgus HG (1995). Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. J Invest Dermatol. 105:170-6.

D'Ortho MP, Will H, Atkinson S, Butler G, Messent A, Gavrilovic J, Smith B, Timpl R, Zardi L, Murphy G (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. Eur J Biochem. 250:751-757.

Dalmay T (2000). An RNA-dependent RNApolymerase gene in arabidopsis is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. Cell. 101:543-553.

D'Amours M, Lebel M and al (1999). Renal and vascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition: involvement of endothelin 1 and angiotensin II. Can J Physiol Pharmacol. 77:8-16.

Debelle L, Alix AJ, Jacob MP, Huvenne JP, Berjot M, Sombret B, Legrand P (1995). Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies. J Biol Chem. 270(44):26099-103.

Declerck YA and Laug WE (1996). Cooperation between matrix metalloproteinases and the plasminogen activator-plasmin system in tumor progression. Enzyme Protein. 49:72-84.

Deng SJ, Bickett DM, Mitchell JL, Lambert MH, Blackburn RK, Carter HL and al (2000). Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. J Biol Chem. 275:31422-31427.

Deora AA, Hajjar DP, Lander HM (2000). Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. Biochemistry. 39(32):9901-8.

Deryugina EI, Bourdon MA, Jungwirth K, Smith JW and Strongin AY (2000). Functional activation of integrin alpha V beta 3 in tumor cells expressing membrane-type 1 matrix metalloproteinase. Int J Cancer. 86:15-23.

Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, Discipio R, Smith JW and al (2001). MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. Exp Cell Res. 263:209-223.

Deschamps AM and Spinale FG (2006). Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. Cardiovasc Res. 69:666-676.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature. 399(6736):601-5.

Doench JG, Petersen CP, Sharp PA (2003). siARNs can function as miRNAs. Genes Dev. 17(4):438-42.

Doherty MJ, Canfield AE (1999). Gene expression during vascular pericyte differentiation. Crit Rev Eukaryot Gene Exp. 9:1-17.

Doolittle RF (1995). The multiplicity of domains in proteins. Annu Rev Biochem. 64:287-314.

Dubois B, Masure S, Hurtenbach U, Paemen L, Heremans H, Van Den O and al (1999). Resistance of young gelatinase B-deficient mice to experimental autoimmune encephalomyelitis and necrotizing tail lesions. J Clin Invest. 104:1507-1515.

Duca L (2004) Etude des voies de signalisation induites par les peptides d'élastine dans les fibroblastes dermiques humans. Application à la régulation de la production de la pro-MMP-1 dans le cadre de la réaction stromale. Thèse d'Université nouveau régime, Université de Reims Champagne-Ardenne.

Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebeck W, and Haye B (2002). The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. FEBS Lett. 524:193-8.

Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B and Debelle L (2004). Elastin as a matrikine. Crit Rev Oncol Hematol. 49:235-44.

Duca L, Lambert E, Debret R, Rothhut B, Blanchevoye C, Delacoux F, Hornebeck W, Martiny L, Debelle L (2005). Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. Mol Pharmacol. 67(4):1315-24.

Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A, Cooke JP (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(3):659-66.

Dumont Y, D'Amours M and al. (2001). Supplementation with a low dose of L-arginine reduces blood pressure and endothelin-1 production in hypertensive uraemic rats. Nephrol Dial Transplant.16:746-54.

Dussaule JC and Chatziantoniou C (1996). Role of nitric oxide in the regulation of arterial pressure and renal function. Presse Med. 25:1789-93.

Dutoya S, Verna A, Lefebvre F, Rabaud M (2000). Elastin-derived protein coating onto poly(ethylene terephthalate). Technical, microstructural and biological studies.Biomaterials. 21(15):1521-9.

Eberhardt W, Beck KF, Pfeilschifter J (2002). Cytokine-induced expression of tPA is differentially modulated by NO and ROS in rat mesangial cells. Kidney Int. 61(1):20-30.

Eberhardt W, Beeg T, Beck KF, Walpen S, Gauer S, Bohles H, Pfeilschifter J (2000). Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. Kidney Int. 57(1):59-69.

Egeblad M and Werb Z (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer. 2:161-174.

Elbashir S.M, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 411:494-498.

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. Methods. 26(2):199-213.

Ellerbroek SM, Wu YI, Overall CM, Stack MS (2001). Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. J Biol Chem. 276(27):24833-42.

Endemann DH and Schiffrin EL (2004). Nitric oxide, oxidative excess and vascular complications of diabetes mellitus. Curr Hypertens Rep. 6:85-9.

Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M, Sato H (2003). Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. J Biol Chem. 278:40764-40770.

English JM and Cobb MH (2002). Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. Trends Pharmacol Sci. 23:40-5.

English WR, Puente XS, Freije JM, Knauper V, Amour A, Merryweather A and al (2000). Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MMP17) has tumor necrosis factor-alpha convertase activity but does not activate pro-MMP2. J Biol Chem. 275:14046-14055.

Faury G, Garnier S, Weiss AS, Wallach J, Fulop T Jr, Jacob MP, Mecham RP, Robert L and Verdetti J (1998). Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. Circ Res. 82:328-36.

Fazio MJ, Kahari VM, Bashir MM, Saitta B, Rosenbloom J and Uitto J (1990). Regulation of elastin gene expression: evidence for functional promoter activity in the 5'-flanking region of the human gene. JInvest Dermatol. 94:191-6.

Filippov S, Koenig GC, Chun TH, Hotary KB, Ota I, Bugge TH, Roberts JD, Fay WP, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Sabeh F, Allen ED, Weiss SJ (2005). MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. J Exp Med. 202: 663–671.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans". Nature. 391:744-746.

Foda HD, George S, Conner C, Drews M, Tompkins DC, Zucker S (1996). Activation of human umbilical vein endothelial cell progelatinase A by phorbol myristate acetate: a protein kinase C-dependent mechanism involving a membrane-type matrix metalloproteinase. Lab Invest. 74(2):538-45.

Freije JM, Diez-itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J (1994). Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. J Biol Chem. 269(24):16766-73.

Fridman R, Toth M, Pena D and MobasherY S (1995). Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). Cancer Res. 55:2548-2555.

Fukai N, Apte SS, Olsen BR (1994). Nonfibrillar collagens. Methods Enzymol. 245:3-28.

Fulop T and Larbi A (2002). Putative role of 67 kDa elastin-laminin receptor in tumor invasion. Semin Cancer Biol. 12:219-29.

Fulop T Jr, Jacob MP, Varga Z, Foris G, Leovey A and Robert L (1986). Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca2+ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. Biochem Biophys Res Commun. 141:92-8.

Furchgott RF and Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 288:373-6.

Gaballa MA and Goldman S (2000). Gene transfer of endothelial nitric oxide isoform decreases rat hindlimb vascular resistance *in vivo*. Hum Gene Ther. 11:1637-46.

Gabbai FB, Garcia GE et al. (1995). Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology. Adv Nephrol Necker Hosp. 24:3-18.

Galjart NJ, Morreau H, Willemsen R, Gillemans N, Bonten EJ, d'Azzo A (1991). Human lysosomal protective protein has cathepsin A-like activity distinct from its protective function. J Biol Chem. 266(22):14754-62.

Galvez BG, Genis L, Matias-Roman S, Oblander SA, Tryggvason K, Apte SS, Arroyo AG (2005). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. J Biol Chem. 280:1292–1298.

Galvez BG, Matias-Roman S, Albar JP, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG (2001). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. J Biol Chem. 276:37491–37500.

Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG (2002). ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. J Cell Biol. 159:509–521.

Galvez BG, Matias-Roman S, Yanez-Mo M, Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F, Arroyo AG (2004). Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells. Mol Biol Cell. 15:678–687.

Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ and al (1985). Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. Nature. 315:768-771.

Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements JM, Crimmin M and al (1995). Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha. J Leukoc Biol. 57:774-777.

Gilles C, Polette M, Piette J, Munaut C, Thompson EW, Birembaut P and al (1996). High level of MT-MMP expression is associated with invasiveness of cervical cancer cells. Int J Cancer. 65:209-213.

Goldberg GI, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S and He CS (1989). Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2. Proc Natl Acad Sci USA. 86:8207-8211.

Golubkov VS, Boyd S, Savinov AY, Chekanov AV, Osterman AL, Remacle A, Rozanov DV, Doxsey SJ, Strongin AY (2005): Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability. J Biol Chem. 280:25079-25086.

Golubkov VS, ChekanovAV, Doxsey SJ, Strongin AY (2005). Centrosomal pericentrin is a direct cleavage target of membrane type-1 matrix metalloproteinase in humans but not in mice: Potential implications for tumorigenesis. J Biol Chem. 280:42237-42241.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H and Thorgeirsson UP (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol. 74:111-122.

Gordon JA (1991). Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. Methods Enzymol. 201:477-82.

Govers R and Rabelink TJ (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. Am J Physiol Renal Physiol. 280:F193-206.

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. 271:30375-30380.

Gross J, Lapiere CM (1962). Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci USA. 48:1014-22.

Groult V, Hornebeck W, Ferrari P, Tixier JM, Robert L, Jacob MP (1991). Mechanisms of interaction between human skin fibroblasts and elastin: differences between elastin fibres and derived peptides. Cell Biochem Funct. 9(3):171-82.

Gruetter DY, Gruetter CA, Barry BK, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Ignarro LJ (1980). Activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside, and nitrosoguanidine--inhibition by calcium, lanthanum, and other cations, enhancement by thiols.Biochem Pharmacol. 29(21):2943-50

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

Guedez L, Stetler-Stevenson WG, Wolff L, Wang J, Fukushima P, Mansoor A and al (1998b). *In vitro* suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1. J Clin Invest. 102:2002-2010.

Guru T (2000). A silence that speaks volumes. Nature. 404:804-808.

Haas TL, Davis SJ, Madri JA (1998). Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. J Biol Chem. 273:3604–3610.

Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA (1999). Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. J Biol Chem. 274(32):22679-85.

Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P and Strickland D (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. J Biol Chem. 276:15498-15503.

Hanahan D, Folkman J (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. 86:353–64.

Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK and Thompson RW (2002). Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. J Vase Surg. 35:254-61.

Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, SPinella DG, Stevens RM (1990). Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 265:11421-11424.

Hayakawa T, Yamashita K, Ohuchi E and Shinagawa A (1994). Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). J Cell Sci. 107:2373-2379.

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E and Iwata K (1992). Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. FEBS Lett. 298:29-32.

Herman MP, Sukhova GK, Kisiel W, Foster D, KehrY MR, Libby P and al (2001). Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. J Clin Invest. 107:1117-1126.

Hess AR, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ (2003). Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. Cancer Res. 63(16):4757-62.

Hew Y, Grzelczak Z, Lau C and Keeley FW (1999). Identification of a large region of secondary structure in the 3'-untranslated region of chicken elastin mRNA with implications for the regulation ofmRNA stability. J Biol Chem. 274:14415-21.

Hinek A (1996). Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. Biol Chem. 377:471-80.

Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP and Barondes SH (1988). The elastin receptor : a galactoside-binding protein. Science. 239:1539-41.

Hirai Y, Migita K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kamachi M, Kawakami A, Ida H, Kita M, Fukuda T, Shibatomi K, Kawabe Y, Aoyagi T, and Eguchi K (2001). Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. Life Sci. 68:913-920

Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR and Weiss SJ (1998). Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. Cell. 95:365–377.

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y (2001). Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. J Biol Chem. 276(5):3459-67.

Hocking DC, Kowalski K (2002). A cryptic fragment from fibronectin's III1 module localizes to lipid rafts and stimulates cell growth and contractility. J Cell Biol. 158(1):175-84.

Hohenester E, Engel J (2002). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. Matrix Biol. 21(2):115-28.

Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, Babaie E, Prydz H (2002). Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. Nucleic Acids Res. 30(8):1757-66.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Robey PG, Poole AR, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H (1999). MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. Cell. 99:81–92.

Hong BK, Kwon HM, Lee BK, Kim D, Kim IJ, Kang SM, Jang Y, Cho SH, Kim HK, Jang BC, Cho SY, Kim HS, Kim MS, Kwon HC, Lee N (2000). Coexpression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human aortic atherosclerotic lesions. Yonsei Med J. 41(1):82-8.

Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ (1998). VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. Am J Physiol. 274:H1054-8.

Hooshmand-Rad R, Hajkova L, Klint P, Karlsson R, Vanhaesebroeck B, Claesson-Welsh L, Heldin CH (2000). The PI 3-kinase isoforms p110(alpha) and p110(beta) have differential roles in PDGF- and insulin-mediated signaling. J Cell Sci. 2:207-14.

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.

Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW and Weiss SJ (2003). Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. Cell. 114:33-45.

Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I and al (2004). Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. Bone. 34:37-47.

Hsu-Wong S, Katchman SD, Ledo L, Wu M, Khillan J, Bashir MM, Rosenbloom J and Uitto J. (1994) Tissue-specific and developmentally regulated expression of human elastin promoter activity in transgenic mice. J Biol Chem. 269:18072-5.

Huet E, Brassart B, Cauchard JH, Debelle L, Birembaut P, Wallach J, Emonard H, Polette M, Hornebeck W (2002). Cumulative influence of elastin peptides and plasminogen on matrix metalloproteinase activation and type I collagen invasion by HT-1080 fibrosarcoma cells. Clin Exp Metastasis. 19(2):107-17.

Hutvagner G, Simard, MJ, Mello CC and Zamore PD (2004). Sequence-specific inhibition of small RNA function. PLoS Biol. 2:E98.

Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Sheppard P, Anderson N, Rosenbloom JC, Peltonen L and Rosenbloom J (1987). Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 84:5680-4.

Ispanovic E, Haas TL (2006). JNK and PI3K differentially regulate MMP-2 and MT1-MMP mRNA and protein in response to actin cytoskeleton reorganization in endothelial cells. Am J Physiol Cell Physiol. 291(4):C579-88.

Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ and al (1996). Degradation of interleukin 1 beta by matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 271:14657-14660.

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H and Itohara S (1998). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. Cancer Res. 58:1048-1051.

Itoh Y and Seiki M (2006). MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. J Cell Physiol. 206:1-8.

Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M (2001). Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. EMBO J. 20:4782–4793.

Jacob MP and Hornebeck W (1985). Isolation and characterization of insoluble and kappaelastins. Front Matrix Biol. 10:92-129.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest. 52(11):2745-56.

Jaronczyk K, Carmichael JB, Hobman TC (2005). Exploring the functions of RNA interference pathway proteins. Biochemistry journal. 387:567-571.

Jiang A, Lehti K, Wang X, Weiss SJ, Keski-Oja J, Pei D (2001). Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. Proc Natl Acad Sci USA. 98:13693–13698.

Jiang F, Ye D.L, Liu X, Fincher L, McKearin D, Liu Q (2005). Dicer-1 and r3d1-l catalyze microRNA maturation in drosophila. Genes and devlopment. 19:1674-1679.

Jiang Y, Wang M, Celiker MY, Liu YE, Sang QX, Goldberg ID and al (2001). Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. Cancer Res. 61:2365-2370.

Johansson N, Ahonen M and Kahari VM (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion. Cell Mol Life Sci. 57(1):5-15.

Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, van Haperen R, de Crom R, Kawashima S, Yokoyama M, Lefer DJ (2004). Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 286(1):H276-82.

Jurasz P, Sawicki G, Duszyk M, Sawicka J, Miranda C, Mayers I, Radomski MW (2001). Matrix metalloproteinase 2 in tumor cell-induced platelet aggregation: regulation by nitric oxide. Cancer Res. 61(1):376-82.

Kalebic T, Garbisa S, Glaser B, Liotta LA (1983). Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. Science. 221:281-3.

Kamisato S, Uemura Y, Takami N and Okamoto K (1997). Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dépendent protein kinase in alpha-elastininduced macrophage chemotaxis. J Biochem. 121:862-7.

Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A, Kaneko M (1987). K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. Biochem Biophys Res Commun. 142(2):436-40.

Kavi H, Fernandez R, Xie W, Birchler J.A (2005). RNA silencing in Drosophila. FEBS Lett. 579(26):5940-9.

Kennerdell J.R, Carthew R.W (2000). Heritable gene silencing in drosophila using double-stranded RNA. Nature biotech 18:896-898.

Kennerdell J.R, Carthew R.W (1998). Use of arndb-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. Cell. 95:1017-26.

Kerkela E, Ala-Aho R, Lohi J, Grenman R, KAhari V and Saarialho-Kere U (2001). Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14) expression in epithelial skin cancers. Br J Cancer. 84:659-669.

Kerkela E, Bohling T, Herva R, Uria JA and Saarialho-Kere U (2001). Human macrophage metalloelastase (MMP-12) expression is induced in chondrocytes during fetal development and malignant transformation. Bone. 29:487-493.

Ketting RF, Fischer EJ, Bernstein E, Sijen T, Gregory J, PlastErk HA (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. Elegans. Genes and development. 15:2654-2659.

Kevorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S and al (2004). Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. Arthritis Rheum. 50:131-141.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA (2002). Elastic fibres. J Cell Sci. 115(14):2817-28.

Kim VN, Nam JW (2006). Genomics of microRNA. Trends in genetics. 22:163-173.

King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tsichlis PN and Brugge JS (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf- 1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. Mol Cell Biol. 17:4406-18.

Kinoh H, Sato H, Tsunezuka Y, Takino T, Kawashima A, Okada Y, Seiki M (1996). MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. J Cell Sci. 109:953-9.

Kirchheimer JC and Remold HG (1989). Functional characteristics of receptor-bound urokinase on human monocytes: catalytic efficiency and susceptibility to inactivation by plasminogen activator inhibitors. Blood. 74:1396-1402.

Kleiner DE, JR., Unsworth EJ, Krutzsch HC and Stetler-Stevenson WG (1992). Higher-order complex formation between the 72-kilodalton type IV collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases-2. Biochemistry. 31:1665-1672.

Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM, Worthen GS, Johnson GL (1996). Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. J Biol Chem. 271(5):2832-8.

Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G (1996). Cellular mechanisms for human procollagenase 3 (mmp-13) activation: Evidence that mt1-mmp (mmp-14) and gelatinase a (mmp-2) are able to generate active enzyme. J Biol Chem. 271:17124-17131.

Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K and Quaranta V (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. J Cell Biol. 148:615-624.

Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V (2000). Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. J Cell Biol. 148:615-624.

Koshikawa N, Minegishi T, Sharabi A, Quaranta V, Seiki M (2005). Membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. J Biol Chem. 280:88-93.

Kucich U, Christner P, Lippmann M, Fein A, Goldberg A, Kimbel P, Weinbaum G, Rosenbloom J (1983). Immunologic measurement of elastin-derived peptides in human serum. Am Rev Respir Dis. 127(2):S28-30.

Kucich U, Rosenbloom JC, Abrams WR and Rosenbloom J (2002). Transforming growth factor-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38. Am J Respir Cell Mol Biol. 26:183-8.

Kurowska EM. (2002). Nitric oxide therapies in vascular diseases. Curr Pharm Des.8:155-66.

Labrecque L, Nyalendo C, Langlois S, Durocher Y, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Beliveau R (2004). Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase. J Biol Chem. 279: 52132–52140.

- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259):680-5.
- Lafleur MA, Handsley MM, Knauper V, Murphy G, Edwards DR (2002). Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). J Cell Sci. 115:3427-38.
- Lafleur MA, Hollenberg MD, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G, Edwards DR (2001). Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. Biochem J. 357:107-15.
- Lambert V, Wielockx B, Munaut C, Galopin C, Jost M, Itoh T, Werb Z, Baker A, Libert C, Krell HW, Foidart JM, Noel A, Rakic JM (2003). MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. FASEB J. 17:2290-2292.
- Lander HM, Ogiste JS, Pearce SF, Levi R, Novogrodsky A (1995). Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21ras.J Biol Chem. 270(13):7017-20.
- Langlois S, Di Tomasso G, Boivin D, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Beliveau R (2005). Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspasedependent mechanism. Exp Cell Res. 307:452–464.
- Langlois S, Gingras D, Beliveau R (2004). Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation. Blood. 103:3020–3028.
- Lee YS, Nakahara K, Pham J.W, Kim K, He Z, Sontheimerej, Carthew RW (2004). Distinct roles for drosophila dicer-1 and dicer-2 in the siARN/miRNA silencing pathways. Cell. 117(1):69-81.
- Lehti K, Allen E, Birkedal-Hansen H, Holmbeck K, Miyake Y, Chun TH, Weiss SJ (2005). An MT1-MMP-PDGF receptor-beta axis regulates mural cell investment of the microvasculature. Genes Dev. 19:979–991.
- Lehti K, Lohi J, JuntunenMM, Pei D, Keski-Oja J (2002). Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. J Biol Chem 277:8440–8448.
- Libby P, Schönbeck U (2001). Drilling for oxygen. Angiogenesis involves proteolysis of the extracellular matrix. Circ Res. 8:195-197.
- Li H, Nishio K, Yamashita K, Hayakawa T and Hoshino T (1995). Cell cycle-dependent localization of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 immunoreactivity in cultured human gingival fibroblasts. Nagoya J Med Sci. 58:133-142.
- Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, Sato H (2004). Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan- mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. Cancer Res. 64:7058–7064.
- Lim GP, Russell MJ, Cullen MJ and Tokes ZA (1997). Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics. J Neurochem. 68:1606-1611.

Lynch DK, Ellis CA, Edwards PA, Hiles ID (1999). Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. Oncogene. 18(56):8024-32.

Lin KF, Chao L and al (1997). Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. Hypertension. 30:307-13.

Liotta LA, Abe S, Robey PG and Martin GR (1979). Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. Proc Natl Acad Sci USA. 76:2268-2272.

Liu Z, Shipley JM, Vu TH, Zhou X, Diaz LA, Werb Z and al (1998). Gelatinase B-deficient mice are resistant to experimental bullous pemphigoid. J Exp Med. 188:475-482.

Lohi J and Keski-Oja J (1995). Calcium ionophores decrease pericellular gelatinolytic activity via inhibition of 92-kDa gelatinase expression and decrease of 72-kDa gelatinase activation. J Biol Chem. 270:17602-17609.

Lohi J, Lehti K, Valtanen H, Parks WC and Keski-Oja J (2000). Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. Gene. 242:75-86.

Lombard C, Arzel L, Bouchu D, Wallach J, Saulnier J (2006). Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24.Biochimie. 88:1915-21.

Lombard C, Bouchu D, Wallach J, Saulnier J (2005). Proteinase 3 hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. Amino Acids. 28(4):403-8.

Long MM, King VJ, Prasad KU, Freeman BA and Urry DW (1989). Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells. J Cell Physiol. 140:512-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1):265-75.

Lukong KE, Seyrantepe V, Landry K, Trudel S, Ahmad A, Gahl WA, Lefrancois S, Morales CR and Pshezhetsky AV (2001). Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail. J Biol Chem. 276:46172-81.

Luo D, Mari B, Stoll I and Anglard P (2002). Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase. J Biol Chem. 277:25527-25536.

Ma ZL, Yang HY, Tien P (2003). Progress of miRNA and its functions in eukaryotes. Yi chuan xue bao. 30:693-696.

Maccioni FJ, Moon KE (1993). Characterisation of human lung elastin-derived peptides. Clin Biochem. 26(2):85-91.

Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP and al (1999). T lymphocytes induce endothelial matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implication for tubule formation. Am J Pathol. 154:229-238.

Maniataki E, Mourelatos Z (2005). A human, atp-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. Genes development. 19:2979-2990.

Maniglia CA, Gomez JJ, Luikart SD, 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(1):111-20.

Manohar A, Anwar RA (1994). Evidence for a cell-specific negative regulatory element in the first intron of the gene for bovine elastin. Biochem J. 300:147-52.

Marcet-Palacios M, Ceraham K, Cass C, Befus A.D, Mayers I, and Radomski M.W (2003). Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 307, 429-436

Marchenko GN, Marchenko ND and Strongin AY (2003). The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. Biochem J. 372:503-515.

Marchenko ND, Marchenko GN, Weinreb RN, Lindsey JD, Kyshtoobayeva A, Crawford HC and al (2004). Beta-catenin regulates the gene of MMP-26, a novel metalloproteinase expressed both in carcinomas and normal epithelial cells. Int J Biochem Cell Biol. 36:942-956.

Mas VM, Hernandez H, Plo 1, Bezombes C, Maestre N, Quillet-Mary A, Filomenko R, Demur C, Jaffrezou JP and Laurent G (2003). Protein kinase Czeta mediated Raf-1/Extracellular-regulated kinase activation by daunorubicin. Blood. 101:1543-50.

Mathew R, Khanna R, Kumar R, Mathur M, Shukla NK and Ralhan R (2002). Stromelysin-2 overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma: potential clinical implications. Cancer Detect Prev. 26:222-228.

Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siARN into ago2-containing RNAi enzyme complexes. Cell press. 123(4):607-20.

Mazzone M, Baldassarre M, Beznoussenko G, Giacchetti G, Cao J, Zucker S, Luini A, Buccione R (2004). Intracellular processing and activation of membrane type 1 matrix metalloprotease depends on its partitioning into lipid domains. J Cell Sci. 117:6275-6287.

McIntyre M, Bohr DF and al (1999). Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. Hypertension. 34:539-45.

McManus MT, Sharp PA (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat rev genet. 3:737-47.

McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-lewis I (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. J Biol Chem. 276:43503-43508.

Mcquibban GA, Gong JH, Tam EM, Mcculloch CA, Clark-lewis I and Overall CM (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. Science. 289:1202-1206.

Mecham RP (1991). Elastin synthesis and fiber assembly. Ann N Y Acad Sci. 624:137-46.

Mecham RP, Hinek A, Entwistle R, Wrenn DS, Griffin GL and Senior RM (1989a). Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. Biochemistry. 28:3716-22.

Mecham RP, Hinek A, Griffin GL, Senior RM and Liotta LA (1989b). The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. J Biol Chem. 264:16652-7.

Menashi S, Hornebeck W, Robert L, Legrand Y (1989). Elastase-like activity in cultured aortic endothelial cells. Thromb Res. 53(1):11-8.

Mignatti P and Rifkin DB (1996). Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. Enzyme Protein. 49:117-137.

Milkiewicz M, Kelland C, Colgan S, Haas TL (2006). Nitric oxide and p38 MAP kinase mediate shear stress-dependent inhibition of MMP-2 production in microvascular endothelial cells. J Cell Physiol. 208(1):229-37.

Mochizuki S, Brassart B and Hinek A (2002). Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate prolifération of arterial smooth muscle cells. J Biol Chem. 277:44854-63.

Moestrup SK, Holtet TL, Etzerodt M, Thogersen HC, Nykjaer A, Andreasen PA and al (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. 268:13691-13696.

Momohara S, Okamoto H, Komiya K, Ikari K, Takeuchi M, Tomatsu T and al (2004). Matrix metalloproteinase 28/epilysin expression in cartilage from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Arthritis Rheum. 50:4074-4075.

Mongiat M, Sweeney S, San Antonio JD, Fu J, Iozzo R. Endorepellin (2003). A novel inhibitor of angiogenesis derived from the carboxyl terminus of perlecan. J Biol Chem. 278:4238-9.

Monteiro HP, Gruia-Gray J, Peranovich TM, de Oliveira LC, Stern A (2000). Nitric oxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, Src kinase, and mitogenactivated protein kinases in murine fibroblasts. Free Radic Biol Med. 28(2):174-82.

Monteiro HP, Rocha Oliveira CJ, Curcio MF, Moraes MS, Arai RJ (2005). Tyrosine phosphorylation in nitric oxide-mediated signaling events. Methods Enzymol. 396:350-8.

Mook OR, Frederiks WM and Van Noorden CJ (2004). The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. Biochim Biophys Acta. 1705:69-89.

Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG (1994). L-N6-(1-iminoethyl) lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. J Med Chem. 37(23):3886-8.

Morales-Ruiz M, Lee MJ, Zollner S, Gratton JP, Scotland R, Shiojima I, Walsh K, Hla T, Sessa WC (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and

chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. J Biol Chem. 276(22):19672-7.

Mori H, Tomari T, Koshikawa N, Kajita M, Itoh Y, Sato H, Tojo H, Yana I, Seiki M (2002). CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. EMBO J. 21:3949-3959.

Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT and d'Azzo A (1989). Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. J Biol Chem. 264:20655-63.

Murakami H, Yayama K and al (1999). Kallikrein gene delivery inhibits vascular smooth muscle cell growth and neointima formation in the rat artery after balloon angioplasty. Hypertension. 34:164-70.

Murphy G, Segain JP, O'shea M, Cockett M, Ioannou C, Lefebvre O and al (1993). The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. J Biol Chem. 268:15435-15441.

Myllyharju J, Kivirikko KI (2001). Collagens and collagen-related diseases. Ann Med. 33(1):7-21.

Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K and Salvesen G (1990). Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. Biochemistry. 29:5783-5789.

Namkoong S, Lee SJ, Kim CK, Kim YM, Chung HT, Lee H, Han JA, Ha KS, Kwon YG, Kim YM (2005). Prostaglandin E2 stimulates angiogenesis by activating the nitric oxide/cGMP pathway in human umbilical vein endothelial cells. Exp Mol Med. 37(6):588-600.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. The plant cell. 2:279-289.

Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Monteau M, Gillery P, Tournier JM and al (1997). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantificative and morphological analyses. Int J Cancer. 72:556-564.

Negrerie M, Bouzhir L and al. (2001). Control of nitric oxide dynamics by guanylate cyclase in its activated state. J Biol Chem. 276:46815-21.

Nishikura K (2001). A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. Cell. 107:415-8.

Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, Giaever I, Goligorsky MS (1998). Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. Am J Physiol. 274:C236-44.

Novaro V, Colman-Lerner A, Ortega F.V, Jauerbaum A, Paz D, Lo Nostro F, Pustovrh C, Gimeno M.F, and Gonzalez E (2001). Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. Reprod Fertil Dev. 13:411-420.

Novaro V, Pustovrh C, Colman-Lerner A, Radisky D, Lo Nostro F, Paz D, Jauerbaum A, and Gonzalez E (2002). Nitric oxide induces gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) during rat embryo implantation. Fertil Steril. 78:1278-1287.

Ntayi C, Lorimier S, Berthier-Vergnes O, Hornebeck W, Bernard P (2001). Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices. Exp Cell Res. 270(1):110-8.

Nykanen P, Lempaa S, Aaltonen ML, Jurjenson H, Veski P, Marvola M (2001). Citric acid as excipient in multiple-unit enteric-coated tablets for targeting drugs on the colon. Int J Pharm. 229(1-2):155-62.

O'Reilly MS, Holmgren I, Shing Y, and al (1994). Angiostatin a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. Cell. 79:315-28.

Oblander SA, Zhou Z, Galvez BG, Starcher B, Shannon JM, Durbeej M, Arroyo AG, Tryggvason K, Apte SS (2005). Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. Dev Biol. 277:255-269.

O-Charoenrat P, Rhys-Evans PH and Eccles SA (2001). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck.Arch. Otolaryngol Head Neck Surg. 127:813-820.

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M and Okada Y (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. J Biol Chem. 272:2446-2451.

Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1997). Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. J Biol Chem. 272:2446-2451.

Omi K, Tokunaga K, Hohjoh H (2004). Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. FEBS Letters. 558:89-95.

Ooyama T, Fukuda K, Oda H, Nakamura H, Hikita Y (1987). Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. Arteriosclerosis. 7(6):593-8.

Ostuni A, Lograno MD, Gasbarro AR, Bisaccia F, Tamburro AM (2002). Novel properties of peptides derived from the sequence coded by exon 26A of human elastin. Int J Biochem Cell Biol. 34(2):130-5.

Overall CM, Limeback H (1998). Identification and characterization of enamel proteinases isolated from developing enamel Amelogeninolytic serine proteinases are associated with enamel maturation in pig. Biochem J. 256(3):965-72.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327(6122):524-6.

Papapetropoulos A, Andreopoulos S and al (2001). Regulation of the nitric oxide synthase-nitric oxide-cGMP pathway in rat mesenteric endothelial cells. J Appl Physiol. 91:2553-60.

Pardo A and Selman M (1999). Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: the role of metalloproteinases in lung damage. Histol Histopathol. 14:227-33.

Park MJ, Park IC, Hur JH, Kim MS, Lee HC, Woo SH, Lee KH, Rhee CH, Hong SI, Lee SH (2002). Modulation of phorbol ester-induced regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases by SB203580, a specific inhibitor of p38 mitogenactivated protein kinase. J Neurosurg. 97(1):112-8.

Partridge SM, Davis HF and Adair GS (1955). The chemistry of connective tissues. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. Biochem J. 61:11-21.

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. 301:251-265.

Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contri M (1997). Elastic fiber during development and aging. Microsc Res Tech. 38(4):428-35.

Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V and Murphy G (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. FEBS Lett. 503:158-162.

Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS and Hawkes SP (1992). A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. J Biol Chem. 267:17321-17326.

Pei D and Weiss SJ (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature. 375:244-247.

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

Pei D, Majmudar G and Weiss SJ (1994). Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. J Biol Chem. 269:25849-25855.

Phillips PG, Birnby LM (2004). Nitric oxide modulates caveolin-1 and matrix metalloproteinase-9 expression and distribution at the endothelial cell/tumor cell interface. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 286(5):L1055-65.

Pierce RA, Deak SB, Stolle CA, Boyd CD (1990). Heterogeneity of rat tropoelastin mRNA revealed by cDNA cloning. Biochemistry. 29(41):9677-83.

Pierce RA, Mariencheck WI, Sandefur S, Crouch EC and Parks WC (1995). Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. Am J Physiol. 268:491-500.

Pike SE, Yao L, Jones KD, and al (1998). Vasostatin, a calreticulin fragment inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. J Exp Med. 188:2349-56.

Plaisier M, Kapiteijn K, Koolwijk P, Fijten C, Hanemaaijer R, Grimbergen JM, Mulder-Stapel A, Quax PH, Helmerhorst FM, Van Hinsbergh VW (2004). Involvement of membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in capillary tube formation by human endometrial microvascular endothelial cells: Role of MT3-MMP. J Clin Endocrinol Metab. 89:5828-5836.

Polette M and Birembaut P (1998). Membrane-type metalloproteinases in tumor invasion. Int J.Biochem Cell Biol. 30:1195-1202.

Polette M, Gilles C, Marchand V, Seiki M, Tournier JM and Birembaut P (1997). Induction of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) expression in human fibroblasts by breast adenocarcinoma cells. Clin Exp Metastasis. 15:157-163.

Polette M, Gilles C, NawrockI-RabY B, Lohi J, Hunziker W, Foidart JM and al (2005). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. Cancer Res. 65:7691-7698.

Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C and Birembaut P (2004). Tumour invasion and matrix metalloproteinases. Crit Rev Oncol Hematol. 49:179-186.

Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G and al (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. Cancer Res. 54:2419-23.

Privitera S, Prody CA, Callahan JW and Hinek A (1998). The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. J Biol Chem. 273:6319-26.

Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, Weiss SJ (2000). Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. J Exp Med. 192(6):789-99.

Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R and al (1999). Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. Biochem Biophys Res Commun. 255:735-9.

Rao JS (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. Nat Rev Cancer. 3(7):489-501.

Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). Cancer. 33(4):1027-33.

Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. Br J Pharmacol. 101(3):746-52.

Reiser K, McCormick RJ and Rucker RB (1992). Enzymatic and nonenzymatic crosslinking of collagen and elastin. FASEB J. 6:2439-49.

Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I and Uitto J (1994). Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression *in vivo* and *in vitro* at the transcriptional level. Biochem J. 302:331-3.

Remacle A, Murphy G, Roghi C (2003). Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. J Cell Sci. 116:3905-3916.

Remacle AG, RozanovDV, Baciu PC, ChekanovAV, Golubkov VS, Strongin AY (2005). The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). J Cell Sci. 118:4975–4984.

Remy L and Trespeuch C (2005). Matrilysin-1 and cancer pathology. Med Sci (Paris). 21:498-502.

Ribatti D, Vacca A, Dammacco F (2003). New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. Eur J Cancer. 39(13):1835-41.

Ricciardolo FL, Gaston B, Folkerts G (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. Physiol Rev. 84(3):731-65.

Rich CB, Fontanilla MR, Nugent M and Foster JA (1999). Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription through an API/cAMP-response element hybrid site in the distal promoter. J Biol Chem. 274:33433-9.

Rich CB, Goud HD, Bashir M, Rosenbloom J and Foster JA (1993). Developmental regulation of aortic elastin gene expression involves disruption of an IGF-1 sensitive repressor complex. Biochem Biophys Res Commun. 196:1316-22.

Rikitake Y, Hirata K, Kawashima S, Ozaki M, Takahashi T, Ogawa W, Inoue N, Yokoyama M (2002). Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22(1):108-14.

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

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

Robert L, Jacob MP, Frances C, Godeau G, Hornebeck W (1984). Interaction between elastin and elastases and its role in the aging of the arterial wall, skin and other connective tissues. Mech Ageing Dev. 28(2-3):155-66.

Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, Huet E, Vincent L, Lorimier S, Antonicelli F, Soria C, Crepin M, Hornebeck W, Bellon G (2005). Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. J Cell Sci. 118:343-56.

Roignant JY, Carre C, Mugat B, Szymczak D, Lepesant JA, Antoniewski C (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in drosophila. RNA. 9:299-308.

Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R (1993). Extracellular matrix 4: the elastic fiber. FASEB J. 7(13):1208-18.

Rosenbloom J, Bashir M, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Fazio M, Kahari VM and Uitto J (1991). Regulation of elastin gene expression . Ann NY Acad Sci. 624:116-36.

Rozanov DV, Deryugina EI, Ratnikov BI, Monosov EZ, Marchenko GN, Quigley JP, Strongin AY (2001). Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-

MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells. J Biol Chem. 276:25705–25714.

Rozanov DV, Deryugina EI, Monosov EZ, Marchenko ND, Strongin AY (2004). Aberrant, persistent inclusion into lipid rafts limits the tumorigenic function of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignant cells. Exp Cell Res. 293:81-95.

Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Qian Q, Bartlett JDand al (1999). Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. J Dent Res. 78:743-750.

Saarialho-Kere U, KERKela E, Jahkola T, Suomela S, Keski-Oja J and Lohi J (2002). Epilysin (MMP-28) expression is associated with cell proliferation during epithelial repair. J Invest Dermatol. 119:14-21.

Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M and al (2004). Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. J Cell Biol. 167:769-781.

Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F and Sedlacek R (2003). Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. Mol Biol Cell. 14:4569-4580.

Sasaki K, Hattori T, Fujisawa T, Takahashi K, Inoue H, and Takigawa M (1998). Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. J Biochem. 123:431-439.

Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M (1996). Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. FEBS Lett. 393(1):101-4.

Sato H, Okada Y, Seiki M (1997). Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in cell invasion. Thromb Haemost. 78(1):497-500.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E and al (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. Nature. 370:61-65.

Saunders NA and Grant ME (1984). Elastin biosynthesis in chick-embryo arteries. Studies on the intracellular site of synthesis of tropoelastin. Biochem. 221:393-400.

Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Smolenski A, Lohmann SM, Bertoglio J, Chardin P, Pacaud P, and Loirand G (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits Rho-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. J Biol Chem. 275:21722–21729.

Sayago CM and Beierwaltes WH (2001). Nitric oxide synthase and cGMP-mediated stimulation of renin secretion. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 281:R1146-51.

Scadden A.D (2005). The RISC subunit tudor-sn binds to hyper-edited doublestranded RNA and promotes its cleavage. Nature structural and molecular biology. 12:489-496.

Schlossmann J, Feil R, Hofmann F (2003). Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. Ann Med. 35(1):21-7.

Schmidt P, Schramm M and al (2003). Receptor binding assay for nitric oxide- and heme-independent activators of soluble guanylate cyclase. Anal Biochem. 314:162-5.

Schroeder RA and Kuo PC (1995). Nitric oxide: physiology and pharmacology. Anesth Analg. 81:1052-9.

Sedlacek R, Mauch S, Kolb B, Schatzlein C, Eibel H, Peter HH and al (1998). Matrix metalloproteinase MMP-19 (RASI-1) is expressed on the surface of activated peripheral blood mononuclear cells and is detected as an autoantigen in rheumatoid arthritis. Immunobiology. 198:408-423.

Seiki M. (2003) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. Cancer Lett. 194(1):1-11.

Seiki M, Yana I (2003). Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. Cancer Sci. 94(7):569-74.

Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU and Urry DW (1984). Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. J Cell Biol. 99:870-4.

Shapiro AB, Fox K, Lee P, Yang YD, Ling V (1998). Functional intracellular P-glycoprotein. Int J Cancer. 76(6):857-64.

Shaul PW (2002). Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. Annu Rev Physiol. 64:749-74.

Shipley JM, Wesselschmidt RL, Kobayashi DK, Ley TJ and Shapiro SD (1996). Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 93:3942-3946.

Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA (1999). Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. Circ Res. 85(3):247-56.

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen K.L, Parrish S, Timmons L, PlastERK R. A, Fire A (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA triggered gene silencing. Cell. 107:465-476.

Singh RP, Dhawan P, Golden C, Kapoor GS, Mehta KD (1999). One-way cross-talk between p38(MAPK) and p42/44(MAPK). Inhibition of p38(MAPK) induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44 (MAPK) cascade. J Biol Chem. 274(28):19593-600.

Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, Garcia JG (2005). Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. FASEB J. 19(12):1646-56.

Sobue T, Hakeda Y, Kobayashi Y, Hayakawa H, Yamashita K, Aoki T and al (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 directly stimulate the bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. J Bone Miner Res. 16:2205-2214.

Sopata I and Dancewicz AM (1974). Presence of a gelatin-specific proteinase and its latent form in human leucocytes. Biochim Biophys Acta. 370:510-523.

Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Frankenne F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM, Noel A (2002). MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. FASEB J. 16:555-564.

Sounni NE, Roghi C, Chabottaux V, Janssen M, Munaut C, Maquoi E, Galvez BG, Gilles C, Frankenne F, Murphy G, Foidart JM, Noel A (2004). Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. J Biol Chem. 279:13564-13574.

Squadrito GL, Pryor WA (1998). The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrite. Chem Res Toxicol. 11(7):718-9.

Stamatos NM, Curreli S, Zella D and Cross AS (2004). Desialylation of glycoconjugates on the surface of monocytes activates the extracellular signal-related kinases ERK 1/2 and results in enhanced production of specific cytokines. J Leukoc Biol. 75:307-13.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD (1998). How cells respond to interferons. Annu. Rev. Biochem. 67:227-64.

Steck PA, Cheong PH, Nakajima M, Yung WK, Moser RP, Nicolson GL (1987). Altered expression of glycosaminoglycans in metastatic 13762NF rat mamma adenocarcinoma cells. Biochemistry. 26(4):1020-8.

Steenstrup T, Clase KL, Hannon KM (2000). Rapid quantification of cell numbers using computer images. Biotechniques. 28(4):624-6,628.

Stein P, Svoboda P, Anger M, Schultz R.M (2003). RNAi: mammalian oocytes do it without RNA-dependent RNA polymerase. RNA. 9:187-192.

Stein RB and Hanauer SB (2000). Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. Drug Saf. 23:429-48.

Steinlez JJ, Meininger CJ, Forough R, Wu G, Wu MH, and Granger HJ (2002). Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. J Biol Chem. 277:43830-43835.

Sternlicht MD, Bissell MJ and Werb Z (2000). The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. Oncogene. 19:1102-1113.

Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G and al (1997). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. Blood. 89:1708-1715.

Stetler-Stevenson WG (1994). Progelatinase A activation during tumor cell invasion. Invasion Metastasis. 14:259-268.

Stetler-Stevenson WG, Bersch N and Golde DW (1992). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. FEBS Lett. 296:231-234.

Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendas AM, Smith B, Lopez-Otin C and al (2000). Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. J Biol Chem. 275: 14809-14816.

Suenaga N, Mori H, Itoh Y, Seiki M (2005). CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase. Oncogene. 24(5):859-68.

Tahbaz N, Kolb F.A, Zhang H, Jaronczyk K, Filipowicz W, Hobman T.C (2004). Characterization of the interactions between mammalian paz piwi domain proteins and dicer. EMBO reports. 5:189-94.

Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K and al (1998). Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. Proc Natl Acad Sci USA. 95:13221-13226.

Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y and Furukawa Y (2002). Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. Oncogene. 21:5861-5867.

Takeda H, Matozaki T, Takada T, Noguchi T, Yamao T, Tsuda M, Ochi F, Fukunaga K, Inagaki K and Kasuga M (1999). PI 3-kinase gamma and protein kinase C-zeta mediate RAS-independent activation of MAP kinase by a Gi protein-coupled receptor. EMBO J. 18:386-95.

Takino T, Miyamori H, Kawaguchi N, Uekita T, Seiki M, Sato H (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. Biochem Biophys Res Commun. 304:160-166.

Tam EM, Moore TR, Butler GS and Overall CM (2004). Characterization of the distinct collagen binding, helicase and cleavage mechanisms of matrix metalloproteinase 2 and 14 (gelatinase A and MT1-MMP): the differential roles of the MMP hemopexin c domains and the MMP-2 fibronectin type II modules in collagen triple helicase activities. J Biol Chem. 279:43336-43344.

Tam EM, Wu YI, Butler GS, Stack MS and Overall CM (2002). Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. J Biol Chem. 277:39005-39014.

Thomas KA (1996). Vascular endothelial growth factor. J Biol Chem. 271:603–6.

Tiefenbacher CP, Chilian WM (1997). Basic fibroblast growth factor and heparin influence coronary arteriolar tone by causing endothelium-dependent dilation. Cardiovasc Res. 34(2):411-7.

Timar J, Jeney A, Kovalszky I, Kopper L (1995). Role of Proteoglycans in Tumor Progression. Pathol Oncol Res.1(1):85-93.

Tomari Y and Zamore PD (2005). Perspective: machines for RNAi. Genes Dev. 19:517-529.

Toth M, Hernandez-Barrantes S, Osenkowski P, Bernardo MM, Gervasi DC, Shimura Y, Meroueh O, Kotra LP, Galvez BG, Arroyo AG, Mobashery S, Fridman R (2002). Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme. J Biol Chem. 277:26340–26350.

Toth M, Osenkowski P, Hesek D, Brown S, Meroueh S, Sakr W, Mobashery S, Fridman R (2005). Cleavage at the stem region releases an active ectodomain of the membrane type 1 matrix metalloproteinase. Biochem J. 387:497–506.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9):4350-4.

Trachtman H, Futterweit S, Singhal P (1995). Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun. 207(1):120-5.

Tretiak M (1985). Glycosaminoglycan production by murine melanoma variants *in vivo* and *in vitro*. Cancer Res. 45(10):5098-105.

Turpeenniemi-Hujanen T (2005). Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. Biochimie. 87:287-297.

Tuschl T, Zamore P.D, Lehmann R, Bartel D.P, Sharp P.A (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA *in vitro*. Genes and development. 13:3191-3197.

Tyagi SC, Lewis K, Pikes D, Marcello A, Mujumdar VS, Smiley LM and al (1998). Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells. J Cell Physiol. 176:374-382.

Ueda J, Kajita M, Suenaga N, Fujii K, Seiki M (2003). Sequence-specific silencing of MT1-MMP expression suppresses tumor cell migration and invasion: importance of MT1-MMP as a therapeutic target for invasive tumors. Oncogene. 22(54):8716-22.

Uekita T, Gotoh I, Kinoshita T, Itoh Y, Sato H, Shiomi T, Okada Y, Seiki M (2004). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors. J Biol Chem. 279:12734-12743.

Uekita T, Itoh Y, Yana I, Ohno H, Seiki M (2001). Cytoplasmic taildependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. J Cell Biol. 155:1345-1356.

Uemura Y and Okamoto K (1997). Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase. Biochem Mol Biol Int. 41:1085-92.

Uitto J (1979). Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. J Invest Dermatol 72:1-10.

Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. J Cell Physiol. 153: 557-562.

Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A and al (1998). TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. Int J Cancer. 75:246-253.

Vallance P (2003). Nitric oxide: therapeutic opportunities. Fundam Clin Pharmacol. 17:1-10.

Van der Horst GT, Galjart NJ, d'Azzo A, Galjaard H and Verheijen FW (1989). Identification and *in vitro* reconstitution of lysosomal neuraminidase from human placenta. J Biol Chem. 264:1317-22.

Van Muijen GN, Danen EH, VeERKamp JH, Ruiter DJ, Lesley J, Van den Heuvel LP (1995). Glycoconjugate profile and CD44 expression in human melanoma cell lines with different metastatic capacity. Int J Cancer. 61(2):241-8.

Varga Z, Jacob MP, Csongor J, Robert L, Leovey A and Fulop T (1990). Altered hosphatidylinositol breakdown after K-elastin stimulation in PMNLs of elderly. Mech Ageing Dev. 52:61-70.

Varga Z, Jacob MP, Robert L and Fulop T (1989). Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. FEBS Lett. 258:5-8.

Velasco G, Pendas AM, Fueyo A, Knauper V, Murphy G and Lopez-Otin C (1999). Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. J Biol Chem. 274:4570-4576.

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. 4:157-164.

Visse R and Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res. 92:827-839.

Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY and Brown RF (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J Biol Chem. 269:5241-8.

Vrhovski B and Weiss AS (1998). Biochemistry of tropoelastin. Eur Jbiochem. 258:1-18.

Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Cell. 93:411-422.

Wang P, Wang X, Pei D (2004). Mint-3 regulates the retrieval of the internalized membrane-type matrix metalloproteinase, MT5-MMP, to the plasma membrane by binding to its carboxyl end motif EWV. J Biol Chem. 279:20461-20470.

Wang X, Ma D, Keski-Oja J, Pei D (2004). Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal. J Biol Chem. 279:9331–9336.

Weis-Fogh T, Anderson SO (1970). New molecular model for the long-range elasticity of elastin. Nature. 227(5259):718-21.

Westermarck J and Kahari VM (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J. 13:781-792.

Wetzker R and Rommel C (2004). Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention. Curr Pharm Des. 10(16):1915-22.

Wilson CL and Matrisian LM (1996). Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. Int J Biochem Cell Biol. 28:123-136.

Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, Nims RW (1993). Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. Arch Biochem Biophys. 300(1):115-23.

Wu E, Mari BP, Wang F, ANderson IC, Sunday ME and Shipp MA (2001). Stromelysin-3 suppresses tumor cell apoptosis in a murine model. J Cell Biochem. 82:549-555.

Wu YI, Munshi HG, Sen R, Snipas SJ, Salvesen GS, Fridman R, Stack MS (2004). Glycosylation broadens the substrate profile of membrane type 1 matrix metalloproteinase. J Biol Chem. 279: 8278-8289.

Xia Y, Tsai AL and al (1998). Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. J Biol Chem. 273:25804-8.

Yamada Y, Kleinman HK (1992). Functional domains of cell adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol. 4(5):819-23.

Yamamoto M, Akazawa K, Aoyagi M, Yamamoto N, Yamamoto K (2002). Changes in elastin-binding protein in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri. Cell Biol Int. 26(5):441-9.

Yamashit AK, Azumano I, Mai M and Okada Y (1998). Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. Int J Cancer. 79:187-194.

Yang M and Kurkinen M (1998). Cloning and characterization of a novel matrix metalloproteinase (MMP), CMMP, from chicken embryo fibroblasts. CMMP, Xenopus XMMP, and human MMP19 have a conserved unique cysteine in the catalytic domain. J Biol Chem. 273:17893-17900.

Yang M, MurraY MT and Kurkinen M (1997). A novel matrix metalloproteinase gene (XMMP) encoding vitronectin-like motifs is transiently expressed in Xenopus laevis early embryo development. J Biol Chem. 272:13527-13533.

Yang S, Tutton S, Pierce E, Yoon K (2001). Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. Mol Cell Biol. 21(22):7807-16.

Yang TT and Hawkes SP (1992). Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. Proc Natl Acad Sci.USA. 89:10676-10680.

Yi M and Ruoslahti E (2001). A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. Proc Natl Acad Sci USA. 98:620-4.

Yu AE, Hewitt RE, Connor EW and Stetler-Stevenson WG (1997). Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. Drugs Aging. 11:229-244.

Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K and Woessner JF (2000). TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. J Biol Chem. 275:31226-31232.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000). RNAi: double stranded RNA directs the atp-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell. 101(1):25-33.

Zaragoza C, Balbin M, Lopez-Otin C, and Lamas S (2002). Nitric oxide regulates matrix metalloprotease-13 expression and activity in endothelium. Kidney Internal. 61:804-806.

Zaragoza C, Soria E, Lopez E, Browning D, Balbin M, Lopez-Otin C, and Lamas S (2002). Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells. Mol Pharmacol. 62:927-935.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2005). Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme drosha. EMBO journal. 24:138-148.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. Proc Natl Acad Sci USA. 100(17):9779-84.

Zhang M, Parks WC (1999). Post transcriptional regulation of lung elastin expression involves binding of a developmentally regulated cytosolic protein to an open-reading frame cis-element in the messenger RNA. Chest. 116(1 Suppl):74S.

Zhao YG, Xiao AZ, Newcomer RG, Park HI, Kang T, Chung LW and al (2003). Activation of pro-gelatinase B by endometase/matrilysin-2 promotes invasion of human prostate cancer cells. J Biol Chem. 278:15056-15064.

Zhao YG, Xiao AZ, Park HI, Newcomer RG, Yan M, Man YG and al (2004). Endometase/matrilysin-2 in human breast ductal carcinoma in situ and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases-2 and -4: a putative role in the initiation of breast cancer invasion. Cancer Res. 64:590-598.

Zhou Z, Apte SS, Soininen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW, Wang J, Cao Y, Tryggvason K (2000). Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. Proc Natl Acad Sci USA. 97:4052-4057.

Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R (1997a). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. J Clin Invest. (11):2625-34.

Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, Presta M (1997b). Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. Circ Res. 80(6):845-52.

Zimmermann S, Moelling K (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). Science. 286(5445):1741-4.

RESUME

La néoangiogenèse est un des processus essentiel à la progression tumorale et la dissémination métastatique. Son initiation est déclenchée par un « switch » angiogénique en faveur de l'expression, par les cellules tumorales, de facteurs de croissance pro angiogènes lesquels vont favoriser la formation de nouveaux vaisseaux au sein de la tumeur afin de permettre sa croissance et sa progression dans les tissus. L'ensemble de ces processus met en jeu l'expression de métalloprotéinases matricielles qui vont à leur tour dégrader la matrice extracellualire et générer des fragments doués d'activités biologiques, les Matrikines. Parmi ceux-ci, les élastokines, issues de la protéolyse de l'élastine, vont amplifier l'invasion tumorale en agissant sur les cellules par des mécanismes para et autocrines. Par des approches méthodologiques in vivo et in vitro, nous avons démontré que les peptides issus de la dégradation de l'élastine et contenant la séquence VGVAPG étaient capables d'induire la néoangiogenèse en favorisant la migration des cellules endothéliales et leur tubulogenèse, ainsi que l'expression de métalloprotéinases matricielles et de cytokines/facteurs de croissance pro angiogènes. Ces effets sont médiés par la fixation des peptides d'élastine sur le récepteur à l'élastine S-Gal ou EBP (Elastin Binding Protein) car le lactose, un antagoniste de ce récepteur, et V-14, un peptide compétitif, suppriment l'action de ces peptides. L'utilisation d'inhibiteurs nous a permis de démontrer que la MT1-MMP était la principale enzyme impliquée dans l'angiogenèse induite par les peptides d'élastine. Nous avons confirmé son rôle en développant une technique d'interférence par l'ARN visant à invalider son expression. La diminution d'expression de la MT1-MMP, que nous avons appréciée par RT-PCR, Western blot et Elisa, conduit à la suppression des effets des peptides d'élastine notamment dans des modèles d'angiogenèse in vitro. Une approche visant à invalider de façon stable l'expression de la MT1-MMP par l'utilisation du vecteur d'expression de siARN, pRNATin-H1.2/NEO, a également été developpée dans les cellules de fibrosarcomes HT-1080.

Afin de compléter notre étude, les voies de signalisations induites par la fixation des peptides d'élastine sur S-Gal ont été ensuite étudiées. Dans un premier temps, nous avons montré que les peptides d'élastine stimulent de façon concentration- et temps-dépendant la production de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales. L'utilisation d'inhibiteurs de PI₃-kinase, de Akt et de NO synthase nous a permis ensuite de montrer l'implication de la voie PI₃Kinase/Akt/eNOS sur la production de NO et l'expression de MT1-MMP et de proMMP-2. Nous avons démontré que cette voie via le NO induit l'activation de Erk1,2 à travers la production de GMPc. Les effets des peptides d'élastine sur l'expression de la MT1-MMP et la tubulogenèse sont reproduits par un donneur de NO ainsi que par un analogue du GMPc, le 8 bromo cGMP. L'activation de la guanylyl cyclase soluble (GCs) et de Erk1/2 est indispensable à ces effets.

Nous démontrons ainsi que les peptides d'élastine sont capables d'induire l'angiogenèse via l'expression et l'activation de la MT1-MMP. Le mécanisme met en jeu 2 voies de signalisation qui agissent en synergie : la voie PI₃Kinase/Akt/eNOS et la voie GCs/Raf/MEK1/2 / Erk1/2 conduisant à l'induction de l'expression de la MT1-MMP.

Mots clés: Peptides d'élastine, Cellules endothéliales, Angiogenèse, MT1-MMP, Interférence par l'ARN, Nitric Oxyde, GMPc, PI₃Kinase/Akt/eNOS, Raf/ MEK1/2 / Erk 1/2.