

Université de Reims Champagne Ardenne
Ecole Doctorale Sciences, Technologies, Santé (ED 358)

Année 2007

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE**

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 10 décembre 2007

par

Jessica THEVENARD

**CONTROLE DE LA PROGRESSION TUMORALE
PAR DES MATRIKINES
DERIVEES DES COLLAGENES DE MEMBRANE BASALE**

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire
CNRS UMR 6198 - IFR 53 Biomolécules
UFR Médecine de Reims

Co-direction : Monsieur le Docteur Jean-Claude MONBOISSE (Reims)
Madame le Docteur Sylvie BRASSART-PASCO (Reims)

Membres du Jury

Rapporteurs : Madame le Professeur Sylvie RICARD-BLUM (Lyon)
Madame le Docteur Marie-Christine RIO (Strasbourg)

Examineurs : Monsieur le Professeur François-Xavier MAQUART (Reims)
Monsieur le Professeur Dominique PLOTON (Reims)
Monsieur le Docteur Lluís MIR (Villejuif)

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Jean-Claude MONBOISSE (Reims)

A mes Parents

A mon Frère

A Jérôme

Avant tout, je tiens à remercier Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart, directeur du laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6198, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.

Ensuite, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements au Docteur Jean-Claude Monboisse, ainsi qu'au Docteur Sylvie Brassart-Pasco pour avoir dirigé cette thèse et pour m'avoir formée durant ces trois années. Merci pour votre disponibilité, votre gentillesse, vos conseils, votre rigueur scientifique, et merci pour votre aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit.

Que Madame le Professeur Sylvie Ricard-Blum et Madame le Professeur Marie-Christine Rio soient remerciées pour avoir accepté de juger ce travail et d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Professeur Dominique Ploton pour sa participation à ce jury de thèse en tant qu'examineur.

Je remercie le Docteur Lluís Mir pour avoir accepté de juger ce travail. Merci pour votre collaboration et votre accueil lors de ma venue dans votre laboratoire. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier le Docteur Laurent Ramont pour son aide précieuse apportée lors des études *in vivo*. Merci pour ta gentillesse, tes conseils et ta disponibilité.

Merci au Docteur Nicolas Floquet pour sa collaboration, et son aide précieuse pour les études structurales.

J'associe à ces remerciements le Professeur Philippe Gillery, ainsi que les Docteurs William Hornebeck, Georges Bellon, Yanusz Wegrowski, Didier Marot et Frank Antonicelli pour leurs remarques et leurs conseils apportés au cours des réunions de laboratoire.

Je tiens également à remercier le Professeur Laurent Martiny pour m'accueillir dans son laboratoire de biochimie de l'UFR sciences exactes et naturelles pour cette nouvelle année, en tant qu'ATER.

Un grand merci au personnel du laboratoire de biochimie, et plus particulièrement à Coco, Martine, et Aurélie, pour leur gentillesse, leur bonne humeur, leur aide technique et leurs conseils au quotidien.

Un grand merci également à Emilie pour tous les bons moments passés ensemble, pour son aide et son soutien depuis quelques années maintenant. J'espère que tout ce que nous avons partagé durant notre thèse ne s'arrêtera pas de si tôt.

Merci à Marie-France pour son amitié durant ces trois années de thèse.

Merci à Stéphane, Arnaud, Cédric, Johanna, Sandrine mais aussi à Dude, Hervé, Stéphane, Laëtitia, Charlotte, Nico, Benitto et Christelle pour leur bonne humeur, et tous ces bons moments partagés : toutes ces choses qui ont rendu ces trois années de thèse plus légères.

Je remercie Yves Gourdin, responsable du service de reprographie, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je tiens à associer à ces remerciements mes amis, ma famille et ma belle-famille.

Je dédie cette thèse à mes parents et à mon frère qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de croire en moi durant toutes ces années. Tout cela n'aurait jamais été possible sans vous. Mille mercis...

Je ne saurais terminer sans dédier cette thèse à la personne à qui je tiens tant et qui partage ma vie : Jérôme. Merci pour ton soutien, ton aide et tes encouragements qui m'ont rendu cette étape plus facile. Merci pour tout le reste. J'espère que tous nos projets se réaliseront...

Merci à tous...

FINANCEMENT DES TRAVAUX

Je tiens à remercier :

- la Région Champagne Ardenne pour l'allocation de recherche qu'elle m'a attribuée
- le Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche pour m'avoir permis de découvrir l'enseignement supérieur
- l'Université de Reims Champagne Ardenne, le CNRS
- l'Association pour la Recherche sur le Cancer (subvention 3612)
- la Ligue contre le Cancer (Comité départemental de l'Aisne)
- le Cancéropole Grand Est (ACI 2004) et l'Institut National du Cancer, pour le financement des travaux.

Titre : Contrôle de la Progression Tumorale par des Matrikines dérivées des Collagènes de Membrane Basale

La progression du mélanome met en jeu des cascades protéolytiques impliquant les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et le système d'activation du plasminogène, pouvant être contrôlés par des peptides issus de la protéolyse des composants de la matrice extracellulaire, les matrikines. Nous avons étudié les propriétés anti-tumorale et anti-angiogénique des matrikines dérivées des collagènes XIX et IV. Le domaine NC1[α 1(XIX)] exerce de fortes activités anti-angiogénique et anti-tumorale, *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle de mélanome murin et constitue donc une nouvelle matrikine. Le cyclopeptide YSNSG, analogue conformationnel du peptide natif NC1[α 3(IV)185-191], réduit la prolifération et l'invasion des cellules de mélanome humain *in vitro*, en inhibant les cascades protéolytiques impliquant les MMPs et la plasmine. Il exerce une puissante activité anti-angiogénique, en induisant un phénotype non-migratoire des cellules endothéliales. *In vivo*, son activité anti-tumorale est accrue par rapport au peptide natif, suggérant une meilleure biodisponibilité et/ou stabilité. La surexpression des domaines NC1[α 3(IV)] et NC1[α 4(IV)] par des cellules de mélanome réduit fortement leurs capacités prolifératives et invasives. Le développement d'une stratégie thérapeutique chez la souris, par surexpression des matrikines après électroporation *in vivo*, réduit fortement la croissance tumorale et augmente la survie des animaux. Les matrikines dérivées des collagènes de membrane basale, plus particulièrement les domaines NC1[α 3(IV)] et NC1[α 4(IV)], constituent de puissants agents anti-cancéreux, capables de limiter la progression du mélanome.

Mots Clés : [Matrikines] - Potentiel invasif des tumeurs - Angiogenèse
Mélanome - Collagènes- Métalloprotéinases matricielles - Plasmine

Running Title : Control of Tumor Progression by Matrikins derived from Basement Membrane Collagens

Melanoma progression involves proteolytic cascades including matrix metalloproteinases (MMPs) and plasminogen activation system. These proteolytic cascades can both be controlled by peptides derived from basement membranes macromolecules, matrikins. We studied the anti-tumor and anti-angiogenic properties of various matrikins derived from collagens XIX and IV. NC1[α 1(XIX)] domain exhibits strong anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and in an experimental *in vivo* mouse melanoma model, therefore, it constitutes a new matrikin. The YSNSG cyclopeptide, a conformational analogous of the native NC1[α 3(IV)185-191] peptide, reduces *in vitro* human melanoma cell proliferation and invasion, by inhibiting proteolytic cascades involving MMPs and plasmin. It exhibits a potent anti-angiogenic activity, by inducing a non-migratory phenotype of endothelial cells. *In vivo*, its anti-tumor activity is increased *versus* the native peptide, suggesting a better bioavailability and/or stability. Overexpression of NC1[α 3(IV)] and NC1[α 4(IV)] domains by melanoma cells strongly reduces their proliferative and invasive properties. We developed a new therapeutic strategy based on the *in vivo* matrikin overexpression in mice, induced by cDNA electrotransfer. In the model, tumor growth is strongly inhibited and animal survival largely increased. Matrikins derived from basement membrane collagens, especially NC1[α 3(IV)] and NC1[α 4(IV)] domains, represent powerful anticancer agents, able to limit melanoma progression.

Key words : [Matrikins] - Neoplasm invasiveness - Angiogenesis
Melanoma - Collagens - Matrix metalloproteinases - Plasmin

SOMMAIRE

Liste des illustrations.....	1
Liste des abréviations.....	6
Liste des publications et communications.....	9
A- INTRODUCTION GENERALE.....	12
B- ETAT DE LA QUESTION.....	15
I. LE MELANOME.....	16
I.1. DEFINITIONS.....	16
I.2.1. La peau.....	16
I.2.2. Le mélanome.....	17
I.2. GENERALITES SUR LE MELANOME.....	17
I.2.1. Epidémiologie.....	17
I.2.2. Facteurs de risques.....	18
a) Facteurs extrinsèques.....	18
b) Facteurs intrinsèques.....	18
I.2.3. Diagnostic et classifications.....	19
I.2.4. Traitements.....	21
I.3. EVOLUTION DU MELANOME.....	22
I.3.1. Progression tumorale et métastases.....	22
I.3.2. Angiogenèse tumorale.....	23
I.3.2. Intégrines impliquées dans le mélanome.....	24
II. LES METALLOPROTEINASES MATRICIELLES.....	26
II.1. CLASSIFICATION DES MMPs.....	26
II.2. STRUCTURE DES MMPs.....	29
II.3. MECANISMES D'ACTIVATION DES MMPs.....	30
II.3.1. Mécanisme d'activation des pro MMPs.....	30

<u>II.3.2. Mécanismes d'activation de la pro MMP-2</u>	32
II.4. INHIBITION DES MMPs	33
II.5. IMPLICATION DES MMPs DANS LA PROGRESSION TUMORALE	34
<u>II.5.1. Généralités</u>	34
<u>II.5.2. Principales MMPs impliquées dans le mélanome</u>	35
a) <i>La voie MMP-2/MT1-MMP/TIMP-2</i>	35
b) <i>La voie MMP-9</i>	37
c) <i>La voie MMP-1</i>	37
III. LE SYSTEME PLASMINOGENE-PLASMINE	38
III.1. LE PLASMINOGENE	39
III.2. LA PLASMINE	39
III.3. L'ACTIVATEUR DU PLASMINOGENE DE TYPE URINAIRE (U-PA OU UROKINASE)	39
III.4. LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE U-PA : U-PAR	40
III.5. L'ACTIVATEUR DU PLASMINOGENE DE TYPE TISSULAIRE (tPA)	41
III.6. PRINCIPAUX INHIBITEURS DU SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE	41
III.7. IMPLICATION DU SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE DANS LE MELANOME	41
IV. LES MEMBRANES BASALES	43
IV.1. LES PROTEOGLYCANNES	45
IV.2. LES GLYCOPROTEINES	45
IV.3. LES COLLAGENES ASSOCIES AUX MEMBRANES BASALES	46
<u>IV.3.1. Généralités sur les collagènes</u>	46
<u>IV.3.2. Classification des collagènes</u>	47
<u>IV.3.3. Le Collagène XV</u>	50
<u>IV.3.4. Le Collagène XVIII</u>	50
<u>IV.3.5. Le Collagène XIX</u>	51
<u>IV.3.6. Le Collagène IV</u>	53
a) <i>Structure</i>	53
b) <i>Organisation et assemblage supramoléculaire</i>	54
c) <i>Distribution tissulaire</i>	56
V. LES MATRIKINES	57
V.1. MATRIKINES DES LAMININES	57

<u>V.1.1. La laminine 1 (LN-1)</u>	58
<u>V.1.1. La laminine 5 (LN-5)</u>	58
V.2. MATRIKINES DES PROTEOGLYCANNES	59
V.3. MATRIKINES DES COLLAGENES	59
<u>V.3.1. Le collagène XIX</u>	59
<u>V.3.2. Le collagène XVIII</u>	60
<u>V.3.3. Le collagène XV</u>	62
<u>V.3.4. Le collagène IV</u>	62
a) <i>La triple hélice</i>	63
b) <i>Arrestène</i>	64
c) <i>Canstatine</i>	64
d) <i>Tumstatine</i>	65
e) <i>La chaîne $\alpha 6(IV)$</i>	68
CONCLUSION GENERALE	69

C- MATERIEL ET METHODES	70
I. MATERIEL & REACTIFS	71
II. METHODES	75
II.1. CULTURE CELLULAIRE	75
<u>II.1.1. Souches cellulaires utilisées</u>	75
<u>II.1.2. Culture de cellules tumorales</u>	75
<u>II.1.3. Culture de cellules endothéliales</u>	76
II.2. PEPTIDES UTILISES	76
II.3. CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES	77
<u>II.3.1. Plasmides utilisés</u>	77
<u>II.3.2. Constructions plasmidiques</u>	78
II.4. TRANSFECTION STABLE DE CELLULES DE MELANOME HUMAIN	79
<u>II.4.1. Mise au point : transfection transitoire</u>	79
<u>II.4.2. Transfection stable de cellules de mélanome humain</u>	79
<u>II.4.3. Sélection des clones positifs</u>	80
II.5. ETUDE DE VIABILITE CELLULAIRE – TEST AU BLEU TRYPAN	80
II.6. ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE	81
<u>II.6.1. Test WST-1</u>	81

<u>II.6.2. Coloration des noyaux au violet cristal</u>	82
II.7. ETUDE DE L'ADHESION CELLULAIRE.....	82
II.8. ETUDE DE L'INVASION CELLULAIRE.....	83
II.9. ETUDE DE L'EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE.....	84
<u>II.9.1. Formation de pseudotubes sur Matrigel®</u>	84
<u>II.9.2. Technique de blessure cicatricielle</u>	84
II.10. COLORATION CYTOCHIMIQUE AU HOECHST-33342.....	85
II.11. TECHNIQUE DE RT-PCR.....	85
<u>II.11.1. Extraction des ARN totaux</u>	85
<i>a) Protocole expérimental</i>	85
<i>b) Analyses quantitative et qualitative des ARN</i>	86
<i>c) Traitement des échantillons d'ARN à la DNase I</i>	86
<u>II.11.2. RT-PCR semi-quantitative</u>	87
<i>a) Principe</i>	87
<i>b) Protocole expérimental</i>	88
<i>c) Analyses quantitative et qualitative des ADN</i>	89
<u>II.11.3. PCR temps réel</u>	90
<i>a) Principe</i>	90
<i>b) Appareil Lightcycler</i>	90
<i>c) Protocole</i>	90
<i>d) Couples d'amorces utilisés</i>	91
II.12. ANALYSE PROTEIQUE.....	92
<u>II.12.1. Préparation des échantillons</u>	92
<i>a) Obtention des milieux conditionnés</i>	92
<i>b) Concentration des échantillons</i>	92
<i>c) Obtention des extraits membranaires</i>	93
<i>d) Obtention des extraits nucléaires</i>	93
<i>e) Dosage protéique et préparation des échantillons</i>	93
<u>II.12.2. Caractérisation des Protéinases par Zymographie</u>	94
<i>a) Obtention des gélatinases associées aux membranes</i>	94
<i>b) Zymographie en gel de gélatine</i>	94
<i>c) Zymographie en gel de gélatine/plasminogène</i>	95
<i>d) Zymographie inversée</i>	95

<u>II.12.3. Immunodétection des protéines : western-blot</u>	95
<i>a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS</i>	95
<i>b) Transfert</i>	96
<i>c) Incubations et révélation</i>	96
<u>II.12.4. Dosage de l'activité plasmine</u>	97
<i>a) Principe</i>	97
<i>b) Protocole expérimental</i>	97
<u>II.12.5. Dosage de l'activité TIMP-2</u>	97
II. 13. ANALYSE EN MICROSCOPIE CONFOCALE.....	99
<u>II.13.1. Marquages fluorescents</u>	99
<i>a) Marquage de l'actine F</i>	99
<i>b) Immunomarquages</i>	99
<i>c) Contre marquage nucléaire</i>	100
<u>II.13.2. Le microscope confocal</u>	100
<i>a) Principe</i>	100
<i>b) Réglages et observations</i>	101
II.14. METHODES D'ETUDE <i>IN VIVO</i>	102
<u>II.14.1. Modèle animal murin</u>	102
<u>II.14.2. Modèle expérimental de tumeurs sous-cutanées</u>	102
<i>a) Induction tumorale et traitement péri-tumoral</i>	102
<i>b) Induction tumorale et traitement intra-péritonéal (i.p.)</i>	103
<u>II.14.3. Modèle d'électroporation <i>in vivo</i></u>	103
<i>a) Principe</i>	103
<i>b) Protocole expérimental</i>	105
<u>II.14.4. Méthodes de mesure</u>	105
<u>II.14.5. Dosage du peptide $\alpha 3$(IV) dans les sérums de souris par la</u> <u>technique ELISA</u>	105
<u>II.14.6. Etudes morphologiques des tumeurs</u>	106
<u>II.14.7. Préparation des extraits tumoraux</u>	107
II.15. ETUDES STATISTIQUES.....	107

D- RESULTATS	108
I. EFFET DU COLLAGENE DE TYPE XIX SUR LA CROISSANCE TUMORALE.....	109
I.1. EFFET DU COLLAGENE XIX SUR LA CROISSANCE TUMORALE <i>IN VIVO</i>	109
I.2. EFFET DU COLLAGENE XIX SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES TUMORALES <i>IN VITRO</i>	111
I.3. EFFET DU COLLAGENE XIX SUR L'INVASION DES CELLULES TUMORALES <i>IN VITRO</i>	111
I.4. EFFET DU COLLAGENE XIX SUR L'ANGIOGENESE.....	113
I.4.1. Effets sur la vascularisation de la tumeur <i>in vivo</i>	113
I.4.2. Effets sur la formation de pseudotubes <i>in vitro</i>	115
I.4.3. Effets sur la prolifération et l'apoptose des cellules <i>in vitro</i>	116
I.5. EFFET DU COLLAGENE XIX SUR L'EXPRESSION DE LA MT1-MMP.....	117
I.5.1. Effets inhibiteurs <i>in vivo</i>	117
I.5.2. Effets inhibiteurs <i>in vitro</i> sur les cellules endothéliales.....	118
II. EFFETS D'UN CYCLOPEPTIDE DERIVE DE LA TUMSTATINE.....	121
II.1. STRUCTURE DU CYCLOPENTAPEPTIDE YSNSG.....	121
II.2. EFFET ANTI-TUMORAL DU PEPTIDE C5.....	122
II.2.1. Effets du peptide C5 sur l'adhésion cellulaire.....	122
II.2.2. Effets inhibiteurs du peptide C5 sur la prolifération cellulaire.....	125
II.2.3. Effets du peptide C5 sur l'invasion cellulaire.....	125
II.2.4. Effets du peptide C5 sur les MMPs et les TIMPs.....	126
a) Effets sur l'activité gélatinolytique.....	127
b) Effets sur l'expression de la MT1-MMP.....	128
c) Effets sur les TIMPs.....	129
II.2.5. Effets du peptide C5 sur le système d'activation du plasminogène.....	130
a) Effets sur les activateurs du plasminogène (<i>uPA</i> et <i>tPA</i>).....	131
b) Effets sur l'inhibiteur des activateurs du plasminogène <i>PAI-1</i>	132
II.2.6. Effets du peptide C5 sur la croissance tumorale <i>in vivo</i>	132
II.3. EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE DU PEPTIDE C5.....	134
II.3.1. Effets sur la vascularisation de la tumeur <i>in vivo</i>	134
II.3.2. Effets sur la formation de pseudotubes par les cellules endothéliales.....	135
a) Effet inhibiteur du peptide C5.....	135

b) Effet des inhibiteurs de protéases : aprotinine et galardine.....	137
II.3.3. Effets du peptide C5 sur la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales <i>in vitro</i>	138
II.3.4. Effets du peptide C5 sur la migration des cellules endothéliales <i>in vitro</i>	139
II.3.5. Effets du peptide C5 sur les MMPs et les TIMPs.....	141
a) Effets sur l'activité gélatinolytique et sur la sécrétion des TIMPs.....	141
b) Effets sur l'expression de la MT1-MMP.....	142
II.3.6. Effets du peptide C5 sur le système d'activation du plasminogène.....	143
a) Effets sur les activateurs du plasminogène et l'inhibiteur PAI-1.....	143
b) Effets sur l'activité plasmine.....	145
c) Effets sur le récepteur à l'urokinase uPAR.....	145
II.3.7. Effets du peptide C5 sur la distribution des intégrines $\beta 1$ et sur l'organisation du cytosquelette.....	146
III. LES MATRIKINES DU DOMAINE NC1 DU COLLAGENE DE TYPE IV.....	149
III.1. EFFETS DE LA TUMSTATINE SUR LES CELLULES DE MELANOME HUMAIN <i>IN VITRO</i>	149
III.1.1. Transfection des cellules de mélanome humain UACC-903 par l'ADNc des domaines NC1[$\alpha 3$ (IV)181-229] et NC1[$\alpha 5$ (IV)181-239].....	149
III.1.2. Criblage des clones cellulaires positifs à la transfection.....	150
III.1.3. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur la prolifération cellulaire.....	151
III.1.4. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'apoptose.....	151
III.1.5. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire : p21 ^{WAF1} et phospho-pRb.....	154
III.1.6. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur les propriétés invasives <i>in vitro</i> des cellules UACC-903.....	155
III.1.7. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'activité plasmine.....	156

<u>III.1.8. Effets de la surexpression du domaine α3C sur les MMPs</u>	
<u>et les TIMPs</u>	157
<i>a) Effets sur l'activité gélatinolytique</i>	157
<i>b) Effets sur la sécrétion des TIMPs</i>	158
<i>c) Effets sur l'expression de la MT1-MMP</i>	159
III.2. ESSAIS THERAPEUTIQUES AVEC LA TUMSTATINE.....	160
III.3. EFFETS DU DOMAINE NC1[α 4(IV)] SUR LES CELLULES DE MELANOME	
HUMAIN <i>IN VITRO</i>	162
<u>III.3.1. Transfection stable des cellules UACC-903 et criblage des clones</u>	
<u>positifs</u>	162
<i>a) Transfection stable des cellules de mélanome humain par l'ADNc</i>	
<i>codant les domaines α4L et α4C</i>	162
<i>b) Criblage par la technique de RT-PCR</i>	162
<i>c) Criblage par immunocytochimie</i>	164
<u>III.3.2. Effet de la surexpression des domaines α4L et α4C sur la</u>	
<u>prolifération cellulaire</u>	166
<u>III.3.3. Effet de la surexpression des domaines α4L et α4C sur</u>	
<u>l'apoptose</u>	167
<u>III.3.4. Effet de la surexpression des domaines α4L et α4C sur</u>	
<u>l'invasion cellulaire</u>	168
<u>III.3.5. Effet de la surexpression des domaines α4L et α4C sur le système</u>	
<u>d'activation du plasminogène</u>	171
<u>III.3.6. Effets de la surexpression des domaines α4L et α4C sur les</u>	
<u>MMPs et les TIMPs</u>	172
<i>a) Effets sur l'activité gélatinolytique</i>	173
<i>b) Effets sur la sécrétion des TIMPs</i>	173
<i>c) Effets sur l'expression de la MT1-MMP</i>	175
<u>III.3.7. Effets de la surexpression des domaines α4L et α4C sur</u>	
<u>l'adhésion cellulaire sur Matrigel®</u>	176
III.4. ESSAIS THERAPEUTIQUES.....	177
<u>III.4.1 Dosage de la tumstatine sérique</u>	178
<u>III.4.2. Croissance tumorale</u>	179
<u>III.4.3. Survie des animaux</u>	181

E- DISCUSSION	183
I. EFFET DU COLLAGENE DE TYPE XIX SUR LA CROISSANCE TUMORALE.....	184
II. EFFETS D'UN CYCLOPEPTIDE DERIVE DE LA TUMSTATINE.....	187
II.1. EFFET ANTI-TUMORAL DU PEPTIDE C5.....	187
II.2. EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE DU PEPTIDE C5.....	190
III. LES MATRIKINES DES DOMAINES NC1 DU COLLAGENE DE TYPE IV.....	193
IV. ESSAIS THERAPEUTIQUES.....	198
V. DISCUSSION GENERALE.....	199
F- CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	203
G- BIBLIOGRAPHIE	206
H- ANNEXES	245

Liste des Illustrations

➤ LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> :	Représentation de la peau et des annexes cutanées.....	16
<u>Figure 2</u> :	Illustration des critères de reconnaissance d'un mélanome : la règle ABCDE.....	20
<u>Figure 3</u> :	Croissance tumorale et métastases.....	22
<u>Figure 4</u> :	Néo-angiogenèse tumorale.....	24
<u>Figure 5</u> :	Structure des différentes classes de métalloprotéinases matricielles.....	30
<u>Figure 6</u> :	Mécanisme d'activation des métalloprotéinases matricielles.....	31
<u>Figure 7</u> :	Mécanismes d'activation de la pro MMP-2.....	32
<u>Figure 8</u> :	Expression de la MMP-2 et de la MT1-MMP par les cellules tumorales et stromales au front d'invasion de la tumeur.....	36
<u>Figure 9</u> :	Le système plasminogène-plasmine.....	38
<u>Figure 10</u> :	Représentation schématique du récepteur de l'urokinase.....	40
<u>Figure 11</u> :	Représentation schématique de l'architecture des membranes basales.....	44
<u>Figure 12</u> :	Représentation schématique des interactions entre le collagène de type XVIII et les autres composants de la membrane basale.....	51
<u>Figure 13</u> :	Représentation schématique des chaînes α des collagènes de type XV, XVIII et XIX de membranes basales.....	52
<u>Figure 14</u> :	Représentation schématique du collagène de type IV.....	54
<u>Figure 15</u> :	Représentation schématique de la formation des réseaux de collagène de type IV.....	55
<u>Figure 16</u> :	Représentation schématique des sous domaines du collagène de type XVIII.....	60
<u>Figure 17</u> :	Les matrikines dérivées des domaines NC1 du collagène IV.....	63
<u>Figure 18</u> :	Inhibition des cascades protéolytiques impliquées dans l'invasion tumorale par le peptide NC1[α 3(IV)].....	67
<u>Figure 19</u> :	Représentation structurale du peptide NC1[α 3(IV)185-203] d'après simulations Monte Carlo.....	68
<u>Figure 20</u> :	Carte des plasmides p3XFlag-CMV TM -9 et pVAX1.....	78
<u>Figure 21</u> :	Schéma des constructions plasmidiques.....	79
<u>Figure 22</u> :	Principe du test WST-1.....	81

<u>Figure 23</u> :	Schéma d'une chambre de Boyden modifiée.....	83
<u>Figure 24</u> :	Principe de la réaction de RT-PCR.....	87
<u>Figure 25</u> :	Schéma d'une colonne Nanosep.....	92
<u>Figure 26</u> :	Principe du dosage de l'activité plasmine.....	97
<u>Figure 27</u> :	Principe du Test ELISA TIMP-2.....	98
<u>Figure 28</u> :	Schéma d'un microscope confocal.....	102
<u>Figure 29</u> :	Schéma des modèles expérimentaux <i>in vivo</i>	103
<u>Figure 30</u> :	Principe de l'électroporation.....	104
<u>Figure 31</u> :	Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la croissance tumorale <i>in vivo</i>	110
<u>Figure 32</u> :	Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la prolifération des cellules tumoraux B16F1 <i>in vitro</i>	111
<u>Figure 33</u> :	Inhibition de l'invasion des cellules tumorales <i>in vitro</i> par le domaine NC1 du collagène XIX.....	112
<u>Figure 34</u> :	Effets du domaine NC1 du collagène XIX sur la vascularisation tumorale <i>in vivo</i>	114
<u>Figure 35</u> :	Inhibition de la formation de pseudotubes sur Matrigel® par le domaine NC1 du collagène XIX.....	115
<u>Figure 36</u> :	Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la prolifération des cellules endothéliales HMEC-1 <i>in vitro</i>	116
<u>Figure 37</u> :	Le domaine NC1 du collagène XIX n'induit pas l'apoptose des cellules endothéliales HMEC-1.....	117
<u>Figure 38</u> :	Effet inhibiteur du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression de la MT1-MMP <i>in vivo</i>	118
<u>Figure 39</u> :	Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression de la MT1-MMP <i>in vitro</i>	119
<u>Figure 40</u> :	Structure du peptide YSNSG.....	122
<u>Figure 41</u> :	Effets du peptide C5 sur l'adhésion cellulaire.....	124
<u>Figure 42</u> :	Effets inhibiteurs du peptide C5 sur la prolifération cellulaire.....	125
<u>Figure 43</u> :	Inhibition de l'invasion cellulaire par le peptide C5.....	126
<u>Figure 44</u> :	Effets du peptide C5 sur la sécrétion des gélatinases dans les milieux de culture.....	127
<u>Figure 45</u> :	Effets du peptide C5 sur l'activation de la pro MMP-2 à la surface cellulaire.....	128
<u>Figure 46</u> :	Inhibition de l'expression et de l'activation de la pro MT1-MMP par le peptide C5.....	129
<u>Figure 47</u> :	Effets du peptide C5 sur la sécrétion des TIMPs dans les milieux de culture.....	130

<u>Figure 48</u> :	Effets inhibiteurs du peptide C5 sur la sécrétion des activateurs du plasminogène.....	131
<u>Figure 49</u> :	Stimulation de la sécrétion de PAI-1 par le peptide C5.....	132
<u>Figure 50</u> :	Inhibition de la croissance tumorale <i>in vivo</i> par le peptide C5.....	133
<u>Figure 51</u> :	Inhibition de la néo-angiogenèse <i>in vivo</i> par le peptide C5.....	135
<u>Figure 52</u> :	Inhibition de la formation de pseudotubes <i>in vitro</i> par le peptide C5.....	136
<u>Figure 53</u> :	Inhibition de la formation de pseudotubes <i>in vitro</i> par des inhibiteurs de protéases.....	137
<u>Figure 54</u> :	Absence d'effet du peptide C5 sur la prolifération des cellules endothéliales HUVEC <i>in vitro</i>	138
<u>Figure 55</u> :	Inhibition de la migration des cellules HUVEC <i>in vitro</i> par le peptide C5 et par des inhibiteurs de protéases.....	140
<u>Figure 56</u> :	Le peptide C5 n'a pas d'effet sur la sécrétion de la MMP-2 et des TIMPs.....	142
<u>Figure 57</u> :	Inhibition de l'expression et de l'activation de la MT1-MMP par le peptide C5.....	143
<u>Figure 58</u> :	Effets du peptide C5 sur la sécrétion des activateurs du plasminogène et de l'inhibiteur PAI-1 par le peptide C5.....	144
<u>Figure 59</u> :	Inhibition de l'activité plasmine par le peptide C5.....	145
<u>Figure 60</u> :	Inhibition de l'expression de uPAR par le peptide C5.....	146
<u>Figure 61</u> :	Le peptide C5 inhibe le <i>clustering</i> des intégrines $\beta 1$ et altère l'organisation du cytosquelette des cellules HUVEC.....	148
<u>Figure 62</u> :	Séquences et positionnement des amorces utilisées pour le criblage des clones positifs à la transfection.....	150
<u>Figure 63</u> :	Vérification par électrophorèse de la présence du plasmide dans les cellules UACC-903 transfectées.....	151
<u>Figure 64</u> :	Effets inhibiteurs de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur la prolifération cellulaire.....	152
<u>Figure 65</u> :	Effets de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'apoptose.....	153
<u>Figure 66</u> :	Effets de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'expression des protéines p21 ^{WAF1} et phospho-pRb.....	155
<u>Figure 67</u> :	Inhibition de l'invasion cellulaire par la surexpression du domaine $\alpha 3C$	156
<u>Figure 68</u> :	Absence d'effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'activité plasmine.....	157
<u>Figure 69</u> :	Effets de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur la MMP-2.....	158

<u>Figure 70</u> :	Inhibition de la sécrétion des TIMPs dans les milieux de culture par la surexpression du domaine $\alpha 3C$	158
<u>Figure 71</u> :	Inhibition de l'activation de la MT1-MMP par la surexpression du domaine $\alpha 3C$	159
<u>Figure 72</u> :	Inhibition de la croissance tumorale <i>in vivo</i> par la surexpression des domaines $\alpha 3C$ et $\alpha 4C$	161
<u>Figure 73</u> :	Vérification par électrophorèse de la présence des inserts dans les cellules UACC-903 transfectées.....	163
<u>Figure 74</u> :	Vérification par immunocytochimie de l'expression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ par les cellules UACC-903 transfectées.....	165
<u>Figure 75</u> :	Effets inhibiteurs de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur la prolifération cellulaire.....	167
<u>Figure 76</u> :	Absence d'effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur l'apoptose.....	168
<u>Figure 77</u> :	Inhibition de l'invasion cellulaire par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$, et par les inhibiteurs de protéases.....	170
<u>Figure 78</u> :	Absence d'effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur la sécrétion des activateurs de la plasmine, et sur l'activité plasmine générée.....	172
<u>Figure 79</u> :	Absence d'effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur la sécrétion de la MMP-2.....	173
<u>Figure 80</u> :	Inhibition de la sécrétion des TIMPs dans les milieux de culture par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$	174
<u>Figure 81</u> :	Inhibition de la sécrétion du TIMP-3 dans les milieux de culture par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$	175
<u>Figure 82</u> :	Inhibition de l'activation de la MT1-MMP par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$	176
<u>Figure 83</u> :	Effets de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur l'adhésion cellulaire.....	177
<u>Figure 84</u> :	Dosage du domaine $\alpha 3L$ sérique des souris traitées par la technique d'électrotransfert.....	178
<u>Figure 85</u> :	Effets de la surexpression des domaines $\alpha 3L$, $\alpha 3C$, $\alpha 4L$, $\alpha 4C$ et $\alpha 5C$ sur la croissance tumorale <i>in vivo</i>	180
<u>Figure 86</u> :	Effets de la surexpression des domaines $\alpha 3L$, $\alpha 3C$, $\alpha 4L$, $\alpha 4C$ et $\alpha 5C$ sur la survie des souris.....	182
<u>Figure 87</u> :	Schéma récapitulatif des effets du cyclopeptide YSNSG sur les cascades protéolytiques impliquées dans l'invasion tumorale.....	189

Figure 88 : Implications d'uPAR et du complexe uPAR/intégrine dans le phénomène de migration cellulaire.....192

➤ **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Classification des métalloprotéinases matricielles (MMPs).....28

Tableau 2 : Classification et assemblage supramoléculaire des familles de collagène.....48

Tableau 3: Les matrikines dérivées du domaine en triple hélice du collagène IV.....64

Liste des abréviations

AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AEC	3 amino-9-éthylcarbazole
AMP	Adénosine monophosphate
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BET	Bromure d'éthidium
b-FGF	<i>Basic-fibroblast growth factor</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase
dNTPs	Désoxyribonucléotides triphosphates
DTT	1,4-dithiothréitol
ECGM	<i>Endothelial cell growth medium</i>
ECGS	<i>Endothelial cell growth serum</i>
ECL	Electrochimiluminescence
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Endothelial growth factor</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N4-tetraacetic acid</i>
EHS	<i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACIT	<i>Fibril Associated Collagens with Interrupted Triplehelix</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPI	Glycosyl phosphatidyl inositol

HEPES	<i>N2 hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethano-sulfonique acid</i>
HMEC-1	<i>Human microvasculature endothelial cells 1</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IL	Interleukine
Ig	Immunoglobuline
INF γ	Interféron γ
i.p.	Intra-péritonéal
JDE	Jonction dermo-épidermique
LN	Laminine
LRP	<i>Lipoprotein receptor-related-peptide</i>
MAP kinases	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MCS	<i>Multiclone site</i>
MEC	Matrice extra-cellulaire
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MT-MMP	<i>Membrane-type matrix metalloproteinase</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NC	Non collagénique
NEM	N-Ethyl-Maléimide
NS	Non significatif
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor</i>
PARP	Poly ADP-ribose polymérase
pb	Paire de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Proprotein convertase</i>
PCI	<i>Protein C inhibitor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	Polyéthylène téréphthalate
PI3-kinase	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKB	Protéine kinase B (ou Akt)
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluorure
PN-1	Protéinase Nexine-1

pNA	Para-nitroaniline
pRb	Protéine du rétinoblastome
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
s.c.	Sous-cutané
SAB	Sérum albumine bovine
SDS	Sodium dodécyl sulfate
siRNA	Small interfering nucleic acid
SVF	Sérum de veau fœtal
TAE	<i>Tris acétate EDTA</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline-tween</i>
TEMED	Tétraméthyl-éthylène-diamine
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
tPA	<i>Tissular plasminogen activator</i>
UACC	<i>University of Arizona Cancer Center</i>
uPA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
uPAR	<i>Urokinase plasminogen activator receptor</i>
UV	Ultraviolet
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Liste des Publications & Communications

➤ PUBLICATIONS

Thevenard J, Ramont L, Devy J, Brassart B, Floquet N, Schneider L, Pluot M, Maquart FX, Monboisse JC, Brassart-Pasco S.

The YSNSG cyclopeptide derived from Tumstatin inhibits tumor angiogenesis by down-regulating endothelial cell migration.

Molecular Cancer Research (soumis)

Ramont L, Brassart-Pasco S, **Thevenard J**, Deshorgue A, Ventéo L, Laronze JY, Pluot M, Monboisse JC, Maquart FX.

The NC1 domain of XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth.

Molecular Cancer Therapeutics 2007 ; 6 (2) : 506-514.

Thevenard J, Floquet N, Ramont L, Prost E, Nuzillard JM, Dauchez M, Yezid H, Alix AJ, Maquart FX, Monboisse JC, Brassart-Pasco S.

Structure and anti-tumoral properties of the YSNSG cyclopeptide derived from Tumstatin.

Chemistry and Biology 2006 ; 13 (12) : 1307-1315.

➤ BREVET

Monboisse JC, Ramont L, Brassart-Pasco S, Floquet N, **Thevenard J**.

Cyclopentapeptide à activité anti-cancéreuse dérivé du collagène de type IV.

Université de Reims Champagne Ardenne, France.

Brevet, 23 mars 2006, N° 06/02530.

Extension internationale WO 2007/107654 A1, 27 septembre 2007.

➤ **COMMUNICATIONS ORALES**

Thevenard J, Brassart-Pasco S, Ramont L, Mir L, Maquart FX, Monboisse JC.

Contrôle de la progression tumorale par des matrikines dérivées du collagène de type IV : une nouvelle stratégie thérapeutique.

Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims. Reims, 24 octobre 2007.

Thevenard J

Activités anti-tumorale et anti-angiogénique d'un analogue dérivé de la tumstatine.

Journée des jeunes chercheurs de l'IFR 53 Biomolécules. Reims, 14 juin 2007.

Thevenard J, Floquet N, Ramont L, Prost E, Nuzillard JM, Dauchez M, Alix AJP, Maquart FX, Brassart-Pasco S, Monboisse JC

Effet anti-tumoral du cyclopeptide YSNSG dérivé de la tumstatine.

Cancéropôle Grand Est (Axe IV). Strasbourg, 24 janvier 2007.

Thevenard J, Floquet N, Ramont L, Prost E, Nuzillard JM, Dauchez M, Alix AJP, Maquart FX, Monboisse JC, Brassart-Pasco S.

Effet anti-tumoral du cyclopeptide YSNSG dérivé de la tumstatine.

Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims. Reims, 25 octobre 2006.

Thevenard J, Floquet N, Ramont L, Prost E, Nuzillard JM, Dauchez M, Alix AJP, Maquart FX, Monboisse JC, Brassart-Pasco S.

Effet anti-tumoral du cyclopeptide YSNSG dérivé de la tumstatine.

Journées des jeunes chercheurs IFR 53 Biomolécules. Reims, 13 juin 2006.

➤ **COMMUNICATIONS PAR VOIE D'AFFICHE**

Thevenard J, Devy J, Ramont L, Floquet N, Alix AJP, Nuzillard JM, Schneider L, Pluot M, Maquart FX, Brassart-Pasco S, Monboisse JC.

Activités anti-tumorale et anti-angiogénique d'un cyclopeptide dérivé de la tumstatine.

Forum du Cancéropôle Grand Est. Vittel, 19 octobre 2007.

Thevenard J, Floquet N, Brassart-Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC

Effet anti-tumoral d'un analogue peptidique de la tumstatine.

Eurocancer 2007. Paris, 26 et 27 juin 2007.

Thevenard J, Floquet N, Ramont L, Prost E, Nuzillard JM, Dauchez M, Yezid H, Alix AJP, Maquart FX, Monboisse JC, Brassart-Pasco S.

Structural and anti-tumor properties of the YSNSG cyclopeptide derived from Tumstatin.

Federation of European Connective Tissue Societies (FECTS). Oulu (Finlande), du 01 au 05 juillet 2006.

Thevenard J, Ramont L, Maquart FX, Brassart-Pasco S, Monboisse JC.

Contrôle de la Progression Tumorale par la Chaîne $\alpha 3$ du Collagène de type IV (Tumstatine).

Forum des jeunes chercheurs de la Société de Biologie de Reims. Reims, 26 octobre 2005.

Thevenard J, Floquet N, Brassart-Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC

Effet anti-tumoral d'un analogue peptidique de la tumstatine.

Société Française de Tissu Conjonctif. Lyon, 20 mai 2006.

Ramont L, Brassart-Pasco S, **Thevenard J**, Deshorgue A, Ventéo L, Laronze JY, Pluot M, Monboisse JC, Maquart FX.

Le domaine NCI du collagène de type XIX inhibe la croissance tumorale du mélanome in vivo.

Société Française de Tissu Conjonctif. Lyon, 20 mai 2006.

A- Introduction Générale

Le mélanome, tumeur maligne dont la fréquence est actuellement en pleine expansion, est un cancer de très mauvais pronostic, avec un risque élevé de métastases ganglionnaires et viscérales. L'explosion prévisible des cas de mélanome, dans les années à venir, en fait un problème de santé publique. L'exérèse chirurgicale est actuellement le seul traitement curatif du mélanome au stade précoce. Aux stades plus avancés, les traitements palliatifs actuels, surtout représentés par la polychimiothérapie, ont peu progressé et restent peu efficaces.

L'invasion tumorale est une phase clé de la maladie cancéreuse. Elle permet la progression et la dissémination des cellules cancéreuses dans l'ensemble de l'organisme et aboutit à la formation de métastases, cause la plus fréquente du décès des patients. Les différentes étapes de l'invasion tumorale nécessitent la dégradation et le remodelage de la matrice extracellulaire, ce qui implique notamment la sécrétion puis l'activation d'enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou le système de la plasmine.

Au cours de ce processus de progression tumorale, les interactions entre cellules cancéreuses et matrice extracellulaire peuvent être contrôlées par certains domaines des macromolécules de la matrice, appelés matrikines ; c'est notamment le cas des domaines NC1 des collagènes de membranes basales (types IV, XV, XVIII et XIX). Les domaines NC1 des différentes chaînes du collagène de type IV exercent des activités anti-tumorales et/ou anti-angiogéniques. Parmi ces matrikines, le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène IV, encore appelé tumstatine, possède une activité anti-tumorale qui s'exerce via sa séquence 185-203. L'effet anti-tumoral, obtenu *in vivo*, est reproduit par la séquence correspondant aux résidus 185-191 (appelée peptide L7). Cette activité biologique dépend de la conformation, puisque la présence d'un coude β au niveau des résidus YSNS est indispensable.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous décrirons quelques généralités sur la progression du mélanome, les cascades protéolytiques impliquées, la structure des principaux constituants des membranes basales, et les matrikines qui en dérivent.

Puis, après la description des principales techniques utilisées, nous développerons les résultats obtenus.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressée au collagène XIX, collagène mineur associé à la membrane basale dont les propriétés biologiques sont encore inconnues.

Nous avons étudié les effets du domaine NC1 du collagène XIX sur la progression tumorale en utilisant un modèle *in vivo* expérimental de mélanome chez la souris.

Ensuite, nous avons étudié les effets du domaine NC1 du collagène de type IV sur la progression tumorale, dans un modèle de mélanome humain, selon deux approches. Nous avons conçu et étudié les activités anti-tumorale et anti-angiogénique d'un cyclopeptide analogue du peptide L7, sur des cellules cancéreuses humaines, et sur des cellules endothéliales humaines, dans le but de mettre au point un nouvel agent thérapeutique dans la lutte contre le mélanome.

Nous avons également induit la surexpression du domaine NC1[α 3(IV)181-229] par transfection stable de ces mêmes cellules tumorales, pour ensuite étudier les effets biologiques de cette séquence. Par ailleurs, nous avons recherché une activité biologique pour les domaines NC1 des chaînes α 4(IV) et α 5(IV), pour lesquels aucune activité n'avait encore été décrite.

A partir des résultats obtenus sur les cellules tumorales en culture, nous avons développé une stratégie thérapeutique basée sur la surexpression de ces matrikines *in vivo*, par électrotransfert de constructions plasmidiques codant ces matrikines. Nous avons alors étudié l'évolution de la croissance tumorale du mélanome, ainsi que la survie des animaux.

B- Etat de la Question

I. LE MELANOME

I. 1. DEFINITIONS

I.2.1. La peau

La peau est l'organe élastique externe recouvrant tout l'organisme et représentant environ 3 % de la masse corporelle. Ses principales fonctions sont de protéger l'individu contre les agressions environnementales en jouant un rôle de barrière, et de thermoréguler l'organisme afin de limiter les dépenses énergétiques. Ce tissu possède de nombreux récepteurs sensoriels tactiles et des fonctions immunes qui lui sont propres.

Anatomiquement, la peau est constituée de 4 couches superposées (Figure 1) :

- l'épiderme, couche la plus externe
- la jonction dermo-épidermique (JDE), ou lame basale, qui assure un accrochage solide entre l'épiderme et le derme
- le derme, qui constitue le tissu conjonctif de soutien de la peau
- l'hypoderme, couche la plus profonde de la peau

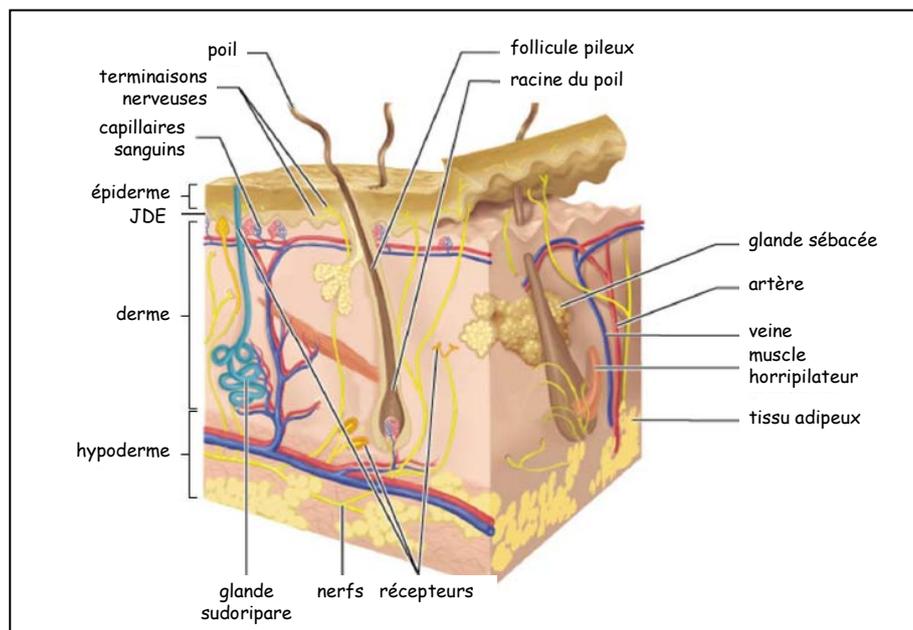


Figure 1 : Représentation de la peau et des annexes cutanées

(Disponible à partir de : URL :

<http://www.cnrs.fr/dissiers/doschim/imArt:peau:derme01.html>)

I.2.2. Le mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne résultant de la transformation des mélanocytes, cellules responsables de la pigmentation de la peau d'origine neuro-ectodermique. Le mélanome peut se développer à partir de la rétine, des méninges ou du tractus intestinal, mais la grande majorité se développe à partir de la peau.

Actuellement le mélanome représente 10 % des cancers de la peau et 1 % de l'ensemble des cancers. C'est le cancer cutané le plus agressif en raison de ses hauts potentiels métastatique et invasif.

I. 2. GENERALITES SUR LE MELANOME

I.2.1. Epidémiologie

En France, comme dans la plupart des pays occidentaux, le mélanome représente un problème de santé publique majeur par sa fréquence, sa létalité, notamment en cas de prise en charge tardive, et par son indéniable augmentation durant les deux dernières décennies. Son incidence est estimée à 5 à 10 nouveaux cas pour 100 000 habitants et par an ; elle augmente de 10 % par an et double tous les 10 ans depuis 1960. En revanche cette incidence est faible dans les pays à populations noires ou jaunes.

Le mélanome touche tous les âges, en dehors de l'enfant où la survenue de ce type de cancer reste exceptionnelle. Environ 60 % des mélanomes sont recensés dans la population féminine. Bien que la moitié des cas survienne chez les personnes de plus de 50 ans, c'est l'un des cancers les plus fréquents chez les jeunes adultes. Il est au premier rang des cancers de la femme de 25 à 29 ans, et au deuxième rang chez les femmes de 30 à 34 ans (Remontet et coll., 2003).

Le mélanome représente la première cause de mortalité par cancer cutané. La mortalité (taux de mortalité : 1,1 à 1,6 pour 100 000 habitants par an) tend à augmenter moins rapidement que l'incidence, avec toutefois une croissance de 2,5 % par an en France. Ceci peut être attribué à un diagnostic plus précoce de la maladie. (Haute autorité de santé, 2006 ; Chérié-Challine et coll., 2004).

I.2.2. Facteurs de risques

a) Facteurs extrinsèques

Le soleil est le seul facteur environnemental actuellement impliqué dans l'épidémiologie du mélanome (Gilchrest et coll, 1999) et 90 % des mélanomes sont liés à une exposition excessive au soleil. Les rayons ultraviolet A (UV A) provoquent un vieillissement prématuré de la peau et affectent le système immunitaire, permettant la multiplication des cellules anormales. Les rayons ultraviolet B (UV B), quant à eux, brûlent la peau ("coup de soleil"), endommageant ainsi le matériel génétique des cellules cutanées et provoquant des mutations pouvant aboutir au cancer.

Le mélanome est plus fréquent et plus agressif chez des patients immunodéprimés (Veness et coll., 1999).

b) Facteurs intrinsèques

Le phototype, qui représente la sensibilité au soleil, constitue le risque individuel majeur. Il inclut la couleur de la peau, des cheveux et des yeux, et détermine le type de réactions cutanées déclenchées par le soleil. Ainsi, les sujets à phototype faible (phototypes I et II de Fitzpatrick), c'est-à-dire à peau claire et ne bronzant pas ou peu, sont plus sujets au développement d'un mélanome que les individus de phototype III ou IV, présentant une peau bronzant facilement, naturellement mieux adaptée (Andreassi et coll., 1999). Cependant, même les peaux les mieux adaptées ne doivent pas s'exposer abusivement au soleil car le risque de développer des cancers cutanés reste non négligeable.

Les naevi, plus communément appelés "grains de beauté", peuvent être à l'origine du développement d'un mélanome. Toutefois, seuls 20 à 30 % des mélanomes semblent être issus de la transformation d'un naevus, les mélanomes apparaissant *de novo*. Le nombre, la taille et l'aspect des naevi sont des facteurs de risque importants concernant le développement d'un mélanome. En effet, le risque de développer un mélanome sur un naevus congénital de grande taille (couvrant 5 % de la surface corporelle) est élevé (Swerdlow et coll., 1995).

Environ 10 % des mélanomes sont en relation avec les facteurs génétiques. Les phototypes clairs, la capacité à générer des naevi et la présence de naevi atypiques sont en

partie génétiquement transmis. Ainsi, la prédisposition familiale est définie comme au moins 2 mélanomes sur 3 générations.

A partir de ces données, il est possible de repérer de nombreux individus susceptibles de développer un mélanome, bien que l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques reste plus efficace, comme la protéine S-100 qui permet d'identifier un mélanome peu différencié (Abraha et coll., 1997). La prévention ne suffisant pas à éviter l'apparition de nouveaux cas de mélanomes, il convient donc de les diagnostiquer clairement de façon précoce.

I.2.3. Diagnostic et classifications

Le diagnostic du mélanome est anatomo-clinique et l'interprétation anatomo-pathologique est à la base du diagnostic, de la prise de décisions thérapeutiques et de l'évaluation du pronostic.

Le diagnostic clinique repose sur l'analyse morphologique d'une lésion cutanée pigmentée selon la règle ABCDE. Un mélanome se présente généralement sous la forme d'une lésion asymétrique (A), à bords irréguliers (B). La pigmentation peut parfois envahir la peau à proximité de la lésion. La couleur perd son homogénéité (C) avec des zones dépigmentées et des teintes variables allant du gris au rouge. Le mélanome a, le plus souvent, un diamètre supérieur à 6 mm (D) et on observe une évolution ou extension permanente de la lésion (E) (Figure 2).

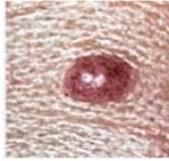
<u>Naevus normal</u>	<u>Mélanome</u>	<u>Signes</u>	<u>Caractéristiques</u>
		Asymétrie	la moitié du naevus ne correspond pas à l'autre moitié
		Bordure	les bords du naevus sont irréguliers
		Couleur	la couleur est variable à l'intérieur du naevus
		Diamètre	le diamètre du naevus est supérieur à 6 mm

Figure 2 : Illustration des critères de reconnaissance d'un mélanome : la règle ABCDE

Toute lésion suspecte de mélanome doit être excisée en vue d'un examen histopathologique. L'étude histologique permet d'affirmer la nature mélanocytaire de la tumeur ainsi que sa malignité. Enfin, il permet d'évaluer le degré d'invasion de la tumeur en profondeur et de mesurer son épaisseur, ce qui représente le principal facteur pronostic.

La classification de Breslow est basée sur l'épaisseur de la tumeur en mm (Breslow, 1970) :

- $\leq 0,75$ mm : 96 % de survie après 5 ans
- 0,76 à 1,50 mm : 87 % de survie après 5 ans
- 1,51 à 4 mm : 76 % de survie après 5 ans
- > 4 mm : 47 % de survie après 5 ans

Il existe une corrélation inverse entre l'indice de Breslow et la survie après le traitement.

Le niveau d'invasion selon Clark et Mihm (Clark et coll., 1969) est basé sur le concept de franchissement de "barrières anatomiques" :

- Clark I : mélanome intra-épidermique, sans risque métastatique
- Clark II : invasion du derme papillaire
- Clark III : invasion de la jonction réticulo-papillaire dermique
- Clark IV : invasion du derme réticulaire
- Clark V : invasion de l'hypoderme

Le bilan de ces classifications permet de déterminer 3 grands stades cliniques du mélanome d'intérêt pronostic :

- Stade I : tumeur primitive sans atteinte ganglionnaire ni métastases
- Stade II : atteinte ganglionnaire régionale
- Stade III : dissémination métastatique ganglionnaire au-delà du premier relais et/ou métastases viscérales.

I.2.4. Traitements

Au stade I clinique, le traitement est chirurgical et repose sur l'exérèse élargie de la tumeur. La marge de sécurité est calculée en fonction de l'indice de Breslow, ce qui rend souvent nécessaire une seconde intervention après examen histologique de la pièce opératoire. La survie des patients après 5 ans est globalement de 95 %.

Au stade II clinique, le traitement consiste en l'exérèse de la lésion et en un curage ganglionnaire régional complet. Des traitements adjuvants, notamment avec l'interféron- α ou l'interleukine-2, n'ont pas une efficacité suffisante en terme de survie pour être systématiquement proposés. Le taux de survie après 5 ans est de 45 %.

Au stade III clinique, le traitement repose sur la chimiothérapie cytostatique qui se révèle, en règle générale, décevante. La survie n'excède pas 7 mois, quelles que soient les modalités thérapeutiques.

Les traitements actuels utilisés dans la lutte contre le mélanome malin apparaissent décevants. Seul un traitement précoce permet d'envisager la guérison.

I. 3. EVOLUTION DU MELANOME

I.3.1. Progression tumorale et métastases

L'histogenèse des mélanomes suit une théorie biphasique. En effet, la première étape est une progression superficielle des cellules, au dessus de la membrane basale puis dans le derme superficiel, avec une croissance horizontale sans caractère métastatique. Dans une seconde phase de croissance verticale, les cellules pénètrent profondément dans le derme ; elles acquièrent un fort potentiel invasif. Les cellules quittent alors la tumeur primaire et gagnent la circulation sanguine afin de coloniser d'autres organes ; c'est la formation de métastases (Figure 3). Les principales localisations secondaires métastatiques sont pulmonaires, hépatiques et cérébrales (Thomas, 2002).

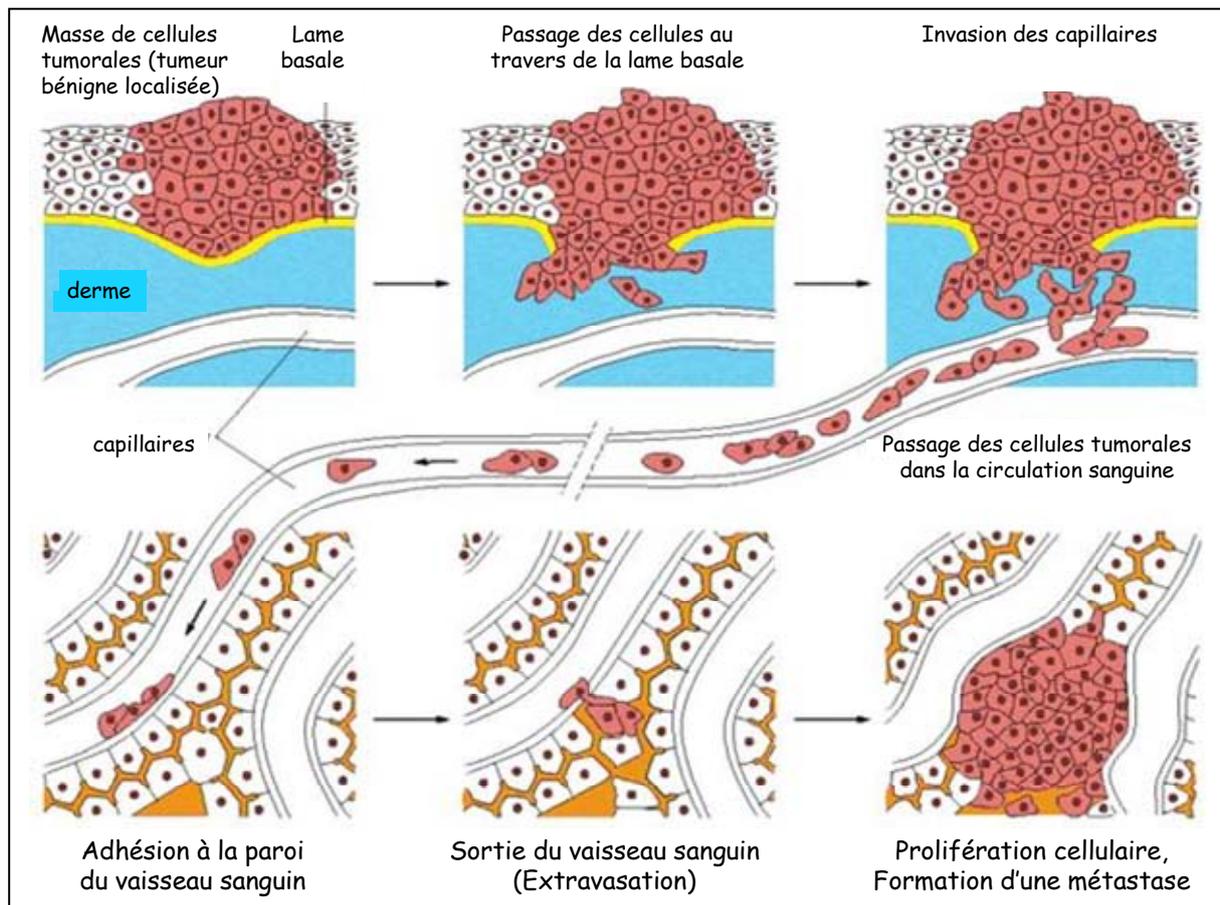


Figure 3 : Croissance tumorale et métastases

Les cellules cancéreuses, formant la tumeur bénigne, prolifèrent et deviennent plus invasives, pénétrant la lame basale sous-jacente, la tumeur est alors classée comme maligne. Les cellules tumorales quittent la tumeur primaire et sont amenées vers d'autres organes, via le sang ou la lymphe, pour former des métastases

I.3.2. Angiogenèse tumorale

La formation de nouveaux vaisseaux, ou néo-angiogenèse, est nécessaire à la croissance tumorale (Folkman, 1971). Du fait de leur croissance rapide, les cellules tumorales se retrouvent en hypoxie et en acidose, et leurs besoins en nutriments ne peuvent être assurés que par de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 4). De plus, la vascularisation des tumeurs permet le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique, assurant ainsi leur transport passif. La néo-angiogenèse est donc un élément essentiel pour la formation de métastases.

Le recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins s'organise en différentes étapes qui se déroulent séquentiellement. Les cellules tumorales en hypoxie sécrètent des inducteurs angiogéniques tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) ; les cellules endothéliales de vaisseaux déjà existants sont alors activées. Ces cellules dégradent la membrane basale et migrent vers le stimulus angiogénique en formant une colonne appelée bourgeon vasculaire, tout en continuant à proliférer. Par la suite, les cellules se différencient et s'organisent en tubes formant des lumières. Le raccordement de ces tubes les uns aux autres permet l'établissement de réseaux vasculaires dans lesquels pourra s'établir la circulation sanguine. L'étape finale du développement de nouveaux capillaires est la formation d'une membrane basale (Tandle et coll, 2004).

La néo-angiogenèse se poursuit tant que la tumeur se développe, permettant l'irrigation et l'apport de nutriments aux zones hypoxiques et nécrotiques de la tumeur.

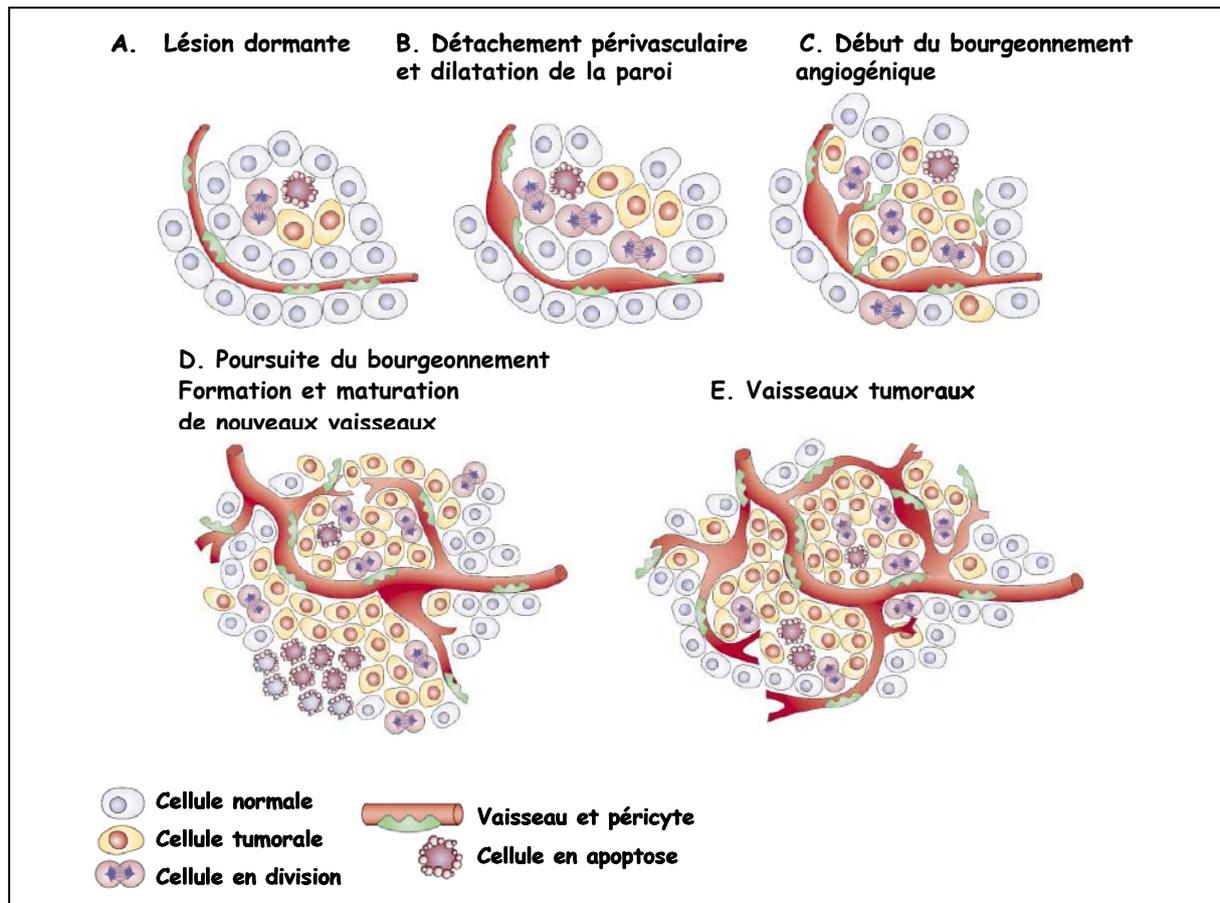


Figure 4 : Néo-angiogenèse tumorale

(A) La plupart des tumeurs se développent sous forme de nodules non vascularisés, jusqu'à ce qu'elles atteignent un état stationnaire avec des cellules en prolifération et en apoptose. L'initiation de l'angiogenèse est alors nécessaire à la croissance tumorale. (B) La première étape commence avec le détachement péri-vasculaire et la dilatation des vaisseaux sanguins. (C) Elle est suivie d'un bourgeonnement angiogénique, (D) de la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux sanguins, et du recrutement des cellules périvasculaires. (E) La néo-angiogenèse continue tant que la tumeur se développe. (Adapté de Berger et Benjamin., 2003).

I.3.2. Intégrines impliquées dans le mélanome

Les interactions entre les cellules tumorales et les macromolécules de la MEC sont médiées par des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire, les intégrines. Elles constituent une famille de glycoprotéines transmembranaires formées par l'association non covalente de 2 sous-unités α et β (Hynes, 1992).

De nombreuses études ont montré que le profil d'expression des intégrines évoluait lors de la transformation maligne du mélanome. L'expression des intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$,

$\alpha 5\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$ (Trikha et coll., 1997) et $\alpha v\beta 3$ est nettement augmentée dans les tumeurs primaires et métastatiques de mélanome, contrairement à l'expression des intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ qui est fortement diminuée (Kuphal et coll., 2005).

L'intégrine $\alpha v\beta 3$ joue un rôle primordial dans les processus d'invasion tumorale et de tumorigénicité des mélanomes, puisque son expression est corrélée à la croissance tumorale, au potentiel invasif et à l'apparition des métastases. Cette intégrine, peu exprimée lors de la phase de croissance horizontale, est nettement surexprimée au cours de la phase verticale du développement tumoral (Albelda et coll., 1990). La présence de cette intégrine est souvent associée à un mauvais pronostic (Hieken et coll., 1999).

L'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ permet la prolifération cellulaire, l'adhésion des cellules aux molécules de la matrice extracellulaire (vitronectine, fibrinogène...) et induit la migration de ces cellules sur ou au travers d'un substrat.

L'intégrine $\alpha v\beta 3$ n'est pas exprimée par les cellules endothéliales des parois vasculaires normales mais son expression est fortement augmentée à l'intérieur des tumeurs, suggérant également son rôle dans l'angiogenèse tumorale.

II. LES METALLOPROTEINASES MATRICIELLES

Les métalloprotéinases matricielles ou MMPs (pour “Matrix metalloproteinases”) sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques (cicatrisation, angiogenèse, apoptose, embryogenèse...) et pathologiques (inflammation, progression tumorale, formation de métastases, fibrose...). Elles composent une famille d’au moins 26 membres décrits à ce jour, qui présentent des propriétés communes (Somerville et coll., 2003):

- Elles dégradent au moins un composant de la matrice extracellulaire
- Elles possèdent un ion zinc (Zn^{2+}) dans leur site catalytique
- Elles sont sécrétées sous forme latente et nécessitent une activation correspondant à la protéolyse de leur domaine N-terminal
- Elles présentent de fortes homologies de structure
- Elles sont inhibées par des inhibiteurs spécifiques d’origine tissulaire appelés TIMPs (pour Tissue Inhibitor of Metalloproteinases)

II. 1. CLASSIFICATION DES MMPs

Les MMPs sont réparties en 6 classes différentes selon leur structure et leur spécificité de substrat (Tableau 1) (Visse et Nagase, 2003).

- ❖ Les matrilysines (MMP-7 et -26) sont les MMPs structurellement les plus simples, car elles ne contiennent pas de domaine hémopexine, domaine commun à toutes les autres MMPs. Ces protéases sont spécifiquement exprimées par les cellules cancéreuses d’origine épithéliale et elles présentent un très large spectre de dégradation des composants matriciels.
- ❖ Les collagénases interstitielles (MMP-1, -8, et -13) interviennent dans la dégradation des collagènes fibrillaires (collagènes de type I, II, III et VII). Le clivage protéolytique du collagène fibrillaire par ces enzymes conduit à la formation de collagène dénaturé (gélatine), en libérant 2 fragments correspondant aux $\frac{3}{4}$ N-terminaux et $\frac{1}{4}$ C-terminal de la molécule de collagène.

- ❖ Les stromélysines (MMP-3, -10 et -11), sur le plan structural, sont très proches des collagénases interstitielles. Elles sont essentiellement exprimées par les cellules épithéliales et possèdent un spectre protéolytique très étendu, incluant de nombreux protéoglycannes et glycoprotéines.

- ❖ Les gélatinases (MMP-2 et -9) présentent une activité protéolytique dirigée contre le collagène interstitiel dénaturé (gélatine) et le collagène de type IV des membranes basales. Structurellement, ces gélatinases sont caractérisées par la présence de 3 motifs fibronectine de type II au sein de leur domaine catalytique, permettant la liaison de l'enzyme à son substrat préférentiel : la gélatine.

- ❖ Les MMPs transmembranaires (MT1 à MT6-MMP) ont pour caractéristique essentielle de se lier à la membrane plasmique, soit par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire hydrophobe présent dans le domaine hémapexine (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP), soit par un groupement glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) (MT4-MMP et MT6-MMP). Ces protéases participent à la dégradation des composants de la matrice extracellulaire et jouent un rôle essentiel dans l'activation d'autres MMPs.

- ❖ Un groupe hétérogène, dont le rôle exact est encore mal défini.

Tableau 1 : Classification des métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Classe	N°	Nom	Substrats matriciels	MM (kDa)
Matrilysines	MMP-7	Matrilysine-1	Fibronectine, laminine, gélatine, collagène IV, protéoglycane	28/19
	MMP-26	Matrilysine-2	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine, gélatine, collagènes I et IV	28
Collagénases interstitielles	MMP-1	Collagénase interstitielle	Collagènes I, II, III, VII, VIII, X, gélatine, entactine, téna-scine, agrécane	55/45
	MMP-8	Collagénase neutrophile	Collagènes I, II, III, V, VII, VIII, X, gélatine, fibronectine, agrécane	85/65
	MMP-13	Collagénase-3	Collagènes I, II, III, IV, V, X, XI, XIV, gélatine, fibronectine, laminine, téna-scine agrécane, perlécane	60/48
Stromélysines	MMP-3	Stromélysine-1	Gélatine, fibronectine, laminine, collagènes II, III, IV, V, IX, X, XI, vitronectine, protéoglycane	57/48
	MMP-10	Stromélysines-2	Fibronectine, laminine, gélatine, collagènes I, III, IV, V, X	54/48
	MMP-11	Stromélysines-3	Fibronectine, laminine, gélatine, élastine, protéoglycane, collagènes III, IV, VI, IX, X	55/44
Gélatinases	MMP-2	Gélatinase-A	Gélatine, fibronectine, laminine, décorine, entactine, élastine, collagènes IV, V, VII, X et XI	72/66
	MMP-9	Gélatinases-B	Gélatine, fibronectine, protéoglycane, entactine, élastine, collagènes IV, V et XIV	92/84
Métalloprotéinases de type membranaire	MMP-14	MT1-MMP	Collagènes I, II, III, IV, V, fibronectine, laminine, vitronectine, téna-scine, entactine, protéoglycane	66/60
	MMP-15	MT2-MMP	Collagènes I et III, fibronectine, laminine, gélatine, nidogène, téna-scine, agrécane, perlécane	72/60
	MMP-16	MT3-MMP	Collagène III, fibronectine, gélatine	64/60
	MMP-17	MT4-MMP	Gélatine, fibrinogène, fibronectine	57/53
	MMP-24	MT5-MMP	Non connu	73/70
	MMP-25	MT6-MMP	Collagène IV, gélatine, fibronectine, fibrine, protéoglycane	73/70
Autres	MMP-12	Métallo-élastase	Elastine, fibronectine, collagène IV, entactine, vitronectine, laminine	60/48
	MMP-18		?	53
	MMP-19		?	57
	MMP-20	Enamélysine	Collagènes IV et XVIII, fibronectine, laminine, téna-scine, caséine, protéoglycane	54/43
	MMP-21	α -MMP	?	63
	MMP-22	c-MMP	Caséine	?
	MMP-23		?	43
	MMP-27		?	56
	MMP-28	Epilysine	Caséine	58/48

II. 2. STRUCTURE DES MMPs

Structurellement, les MMPs sont caractérisées par la présence de domaines communs et d'autres domaines plus spécifiques, permettant d'identifier les différentes classes de MMPs (Figure 5) (Ray et Stetler-Stevenson, 1994 ; Chantrain et DeClerck, 2002).

Les domaines structuraux communs à l'ensemble des MMPs sont :

- ❖ Le peptide signal (ou pré-domaine) : cette séquence signal est nécessaire à l'adressage des protéases jusqu'à la surface cellulaire. Son clivage intervient rapidement lors de la synthèse, pour permettre la libération de la pro-enzyme.
- ❖ le pro-domaine : ce domaine d'environ 80 acides aminés permet de maintenir la pro-enzyme sous forme latente, via une séquence PRCGXPD qui interagit avec le domaine catalytique au niveau de la cystéine.
- ❖ le domaine catalytique : ce domaine, composé approximativement de 170 acides aminés, contient la séquence spécifique HEXXHXXGXXH dont les résidus histidine jouent le rôle de ligand pour l'atome de zinc du site actif.
- ❖ Le domaine hémapexine : ce domaine est présent dans la plupart des MMPs, à l'exception des matrilysines, et est relié au domaine catalytique par une région charnière. Il est situé à l'extrémité C-terminale et comporte une séquence homologue de la vitronectine ou de l'hémapexine qui intervient dans la reconnaissance du substrat.

En plus de ces domaines hautement conservés, d'autres domaines sont propres à certaines classes de MMPs :

- ❖ Le domaine fibronectine de type II, présent dans le site catalytique des gélatinases, permet l'interaction des MMP-2 et -9 avec la gélatine et les collagènes.
- ❖ Un site de clivage par la furine (enzyme de la famille des pro-protéines convertases), situé à l'extrémité du pro-domaine de la MMP-11 et des MT-MMPs, permet leur activation.
- ❖ Un domaine transmembranaire, spécifique des MT-MMPs, est responsable de l'ancrage de ces protéases à la membrane plasmique.

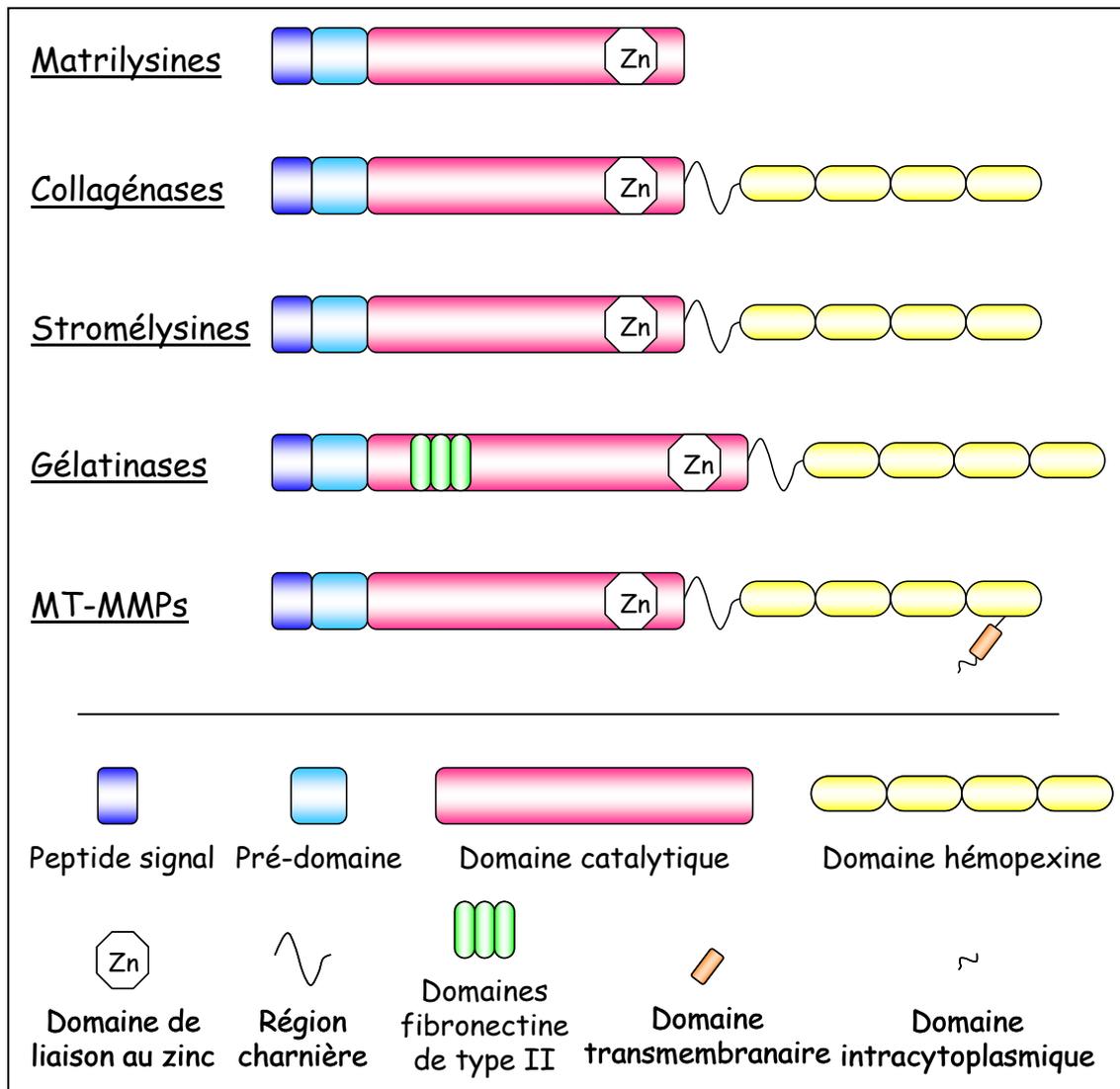


Figure 5 : Structure des différentes classes de métalloprotéinases matricielles

(Adapté de Egeblad et Werb, 2002)

II. 3. MECANISMES D'ACTIVATION DES MMPs

II.3.1. Mécanisme d'activation des pro MMPs

La plupart des MMPs sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs et doivent être activées pour exercer leurs rôles physiologiques. L'absence d'activité enzymatique des zymogènes est le résultat de l'interaction entre l'atome de zinc du site catalytique et le groupement thiol d'un résidu de cystéine du pro-domaine. L'activation enzymatique se fait par dissociation de la liaison Cys-Zn²⁺. Ce clivage est réalisé par des MMPs déjà activées ou

par certaines sérine protéases, comme la plasmine. La cystéine réagit alors avec une molécule d'eau, et la libération du pro-domaine N-terminal se fait par autoprotéolyse (Figure 6) (Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990).

Par ailleurs, les pro MMPs peuvent être activées *in vitro* par différents agents tels que les radicaux libres oxygénés, les dérivés organomercurels, le SDS, l'urée ou la chaleur, qui induisent la dissociation entre la cystéine et l'atome de zinc, et conduisent à l'autoprotéolyse du pro-domaine.

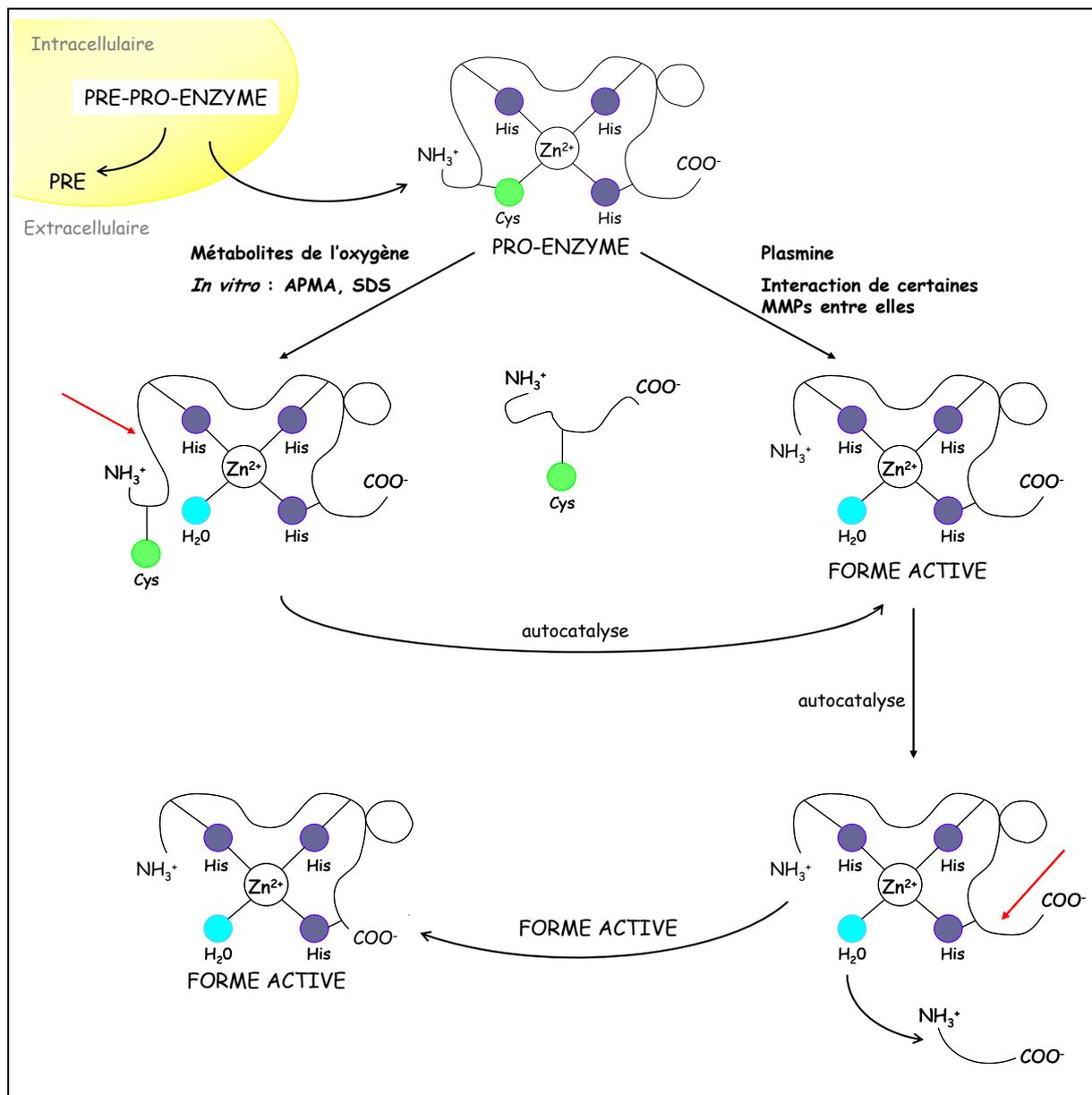


Figure 6 : Mécanisme d'activation des métalloprotéinases matricielles

(Adapté de Ray et Stetler-Stevenson, 1994)

II.3.2. Mécanismes d'activation de la pro MMP-2

L'activation de la pro MMP-2 par la MT1-MMP implique l'intervention du TIMP-2. La fixation stoéchiométrique du TIMP-2, sur le domaine catalytique de la MT1-MMP, est suivie par la fixation du domaine hémopexine C-terminal de la pro MMP-2 sur le domaine C-terminal du TIMP-2. La formation du complexe trimoléculaire MT1-MMP/TIMP-2/pro MMP-2, au niveau membranaire, facilite le clivage du pro-domaine de la pro MMP-2 par une molécule de MT1-MMP libre, générant ainsi une forme intermédiaire de MMP-2. L'activation complète est réalisée par un processus d'autocatalyse, ou par action de la plasmine, et donne naissance à la forme active de la MMP-2 de 66 kDa (Figure 7) (Butler et coll., 1998).

Dans les cellules endothéliales et les cellules de mélanome, l'activation de la pro MMP-2 par la MT1-MMP peut faire intervenir des récepteurs membranaires. Cette activation est alors indépendante du TIMP-2 et est induite par la fixation de la pro MMP-2 sur l'intégrine $\alpha\beta3$ (Figure 7) (Deryugina et coll., 2001 ; Brooks et coll., 1996).

La pro MMP-2 peut également être activée par action de l'activateur du plasminogène urokinase (uPA). Dans ce cas, la MT1-MMP sert uniquement de récepteur (Monea et coll., 2002).

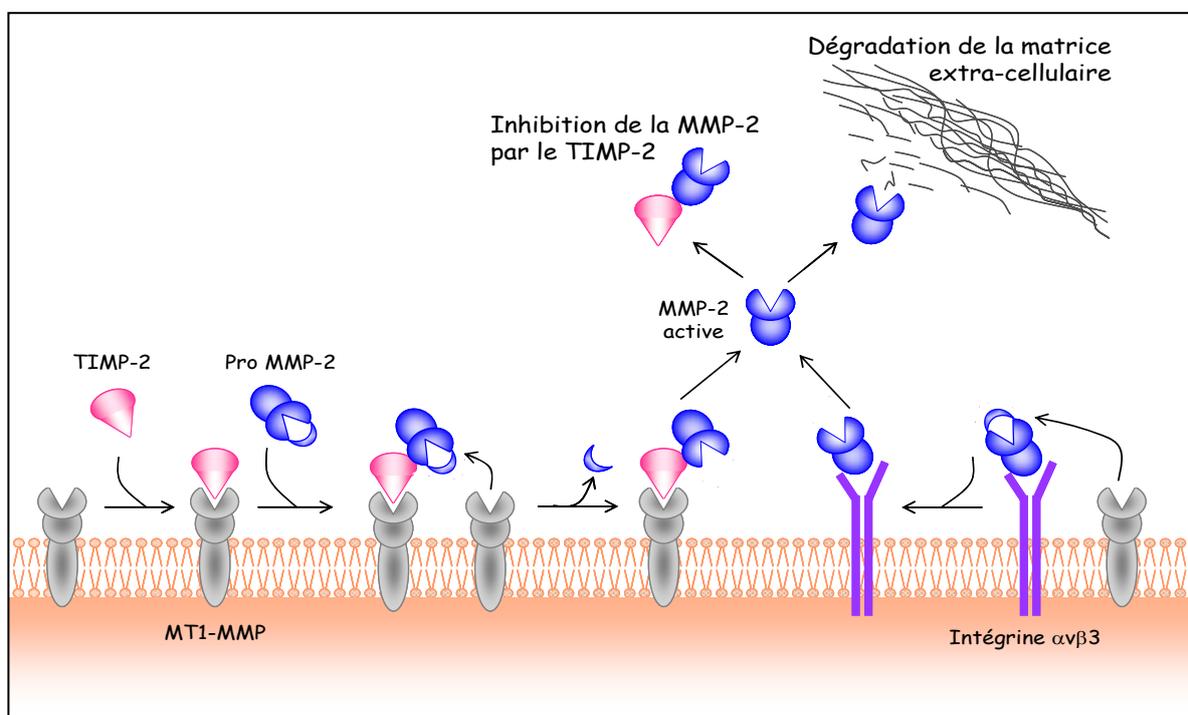


Figure 7 : Mécanismes d'activation de la pro MMP-2

(Adapté de Hofmann et coll., 2000)

II.4. INHIBITION DES MMPs

Dans l'espace extracellulaire, l'activité des MMPs dépend de l'équilibre entre leur inhibition et leur activation.

Les inhibiteurs endogènes majeurs des MMPs sont constitués par les TIMPs (Corcoran, 1996). Ils forment des complexes équimoléculaires avec les formes actives des MMPs. L'interaction entre le domaine N-terminal des TIMPs et le domaine catalytique des MMPs bloque l'accès à la poche contenant l'atome de zinc (Bode et coll., 1999). Ils constituent une famille multigénique, mais partagent des analogies de structure et de fonction. Ils sont actuellement au nombre de 4, désignés sous les termes de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, et TIMP-4, de masses moléculaires respectives 28,5, 21, 22 et 22,5 kDa. Ils jouent un rôle important dans le contrôle de la dégradation de la matrice extracellulaire, l'invasion tumorale, la formation de métastases et l'angiogenèse en limitant l'activité des MMPs. Les TIMPs inhibent toutes les MMPs avec des degrés d'affinité variables, à l'exception du TIMP-1 qui inhibe peu l'activité des MT-MMPs.

Le TIMP-2 a la particularité de jouer un double rôle dans la régulation de la pro MMP-2, puisqu'il favorise son activation lorsqu'il est présent en faible quantité, alors qu'il est inhibiteur à forte concentration.

Indépendamment de leur activité inhibitrice, les TIMPs jouent un rôle important dans le processus tumoral, en intervenant dans la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'angiogenèse (Jiang et coll., 2000).

Il existe d'autres inhibiteurs, comme l' α 2-macroglobuline, mais leur affinité vis-à-vis des MMPs est très faible.

Le rôle grandissant des MMPs dans de nombreux processus pathologiques, notamment dans la progression cancéreuse, a mené au développement d'inhibiteurs synthétiques. Les inhibiteurs les plus connus sont des dérivés d'hydroxamate (Batimastat®, Marimastat®). Leur potentiel inhibiteur a été démontré *in vitro* mais, tout comme pour l' α 2-macroglobuline, leur spécificité est faible (Cuniasse et coll., 2005). De plus, les essais cliniques en phases I et II ont révélé de nombreux effets secondaires toxiques (Chantrain et DeClerck., 2002).

II. 5. IMPLICATION DES MMPs DANS LA PROGRESSION TUMORALE

II.5.1. Généralités

La progression tumorale nécessite la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), permettant aux cellules de proliférer, migrer et envahir les tissus sains adjacents. Les MMPs constituent l'une des familles de protéases fortement impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et des membranes basales (Nagase et Woessner, 1999). Elles exercent également une activité protéolytique contre des protéines non matricielles et interviennent dans la plupart des étapes de la progression tumorale (Chantrain et DeClerck, 2002):

- Perte d'adhérence : les MMP-3 et -7 dégradent la cadhérine E, ce qui rompt les adhésions intercellulaires. En favorisant le transfert de la β -caténine vers le noyau cellulaire, elles induisent l'expression de gènes promoteurs du cancer, comme Wnt-1 et Int-2 (Hollmann et coll., 2001).
- Invasion : les MMP-1, -2, -9, et la MT1-MMP favorisent la migration cellulaire. Elles sont essentiellement sécrétées par les cellules stromales, au niveau du front d'invasion (Stetler Stevenson et coll., 1993). Dans le cas des mélanomes, ces protéases sont également sécrétées par les cellules tumorales.
- Prolifération : plusieurs MMPs sont capables de libérer des facteurs de croissance et de participer à leur activation (DeClerc et coll., 1992).
- Angiogenèse : certaines MMPs, exprimées par les cellules endothéliales, peuvent stimuler l'angiogenèse en libérant des facteurs pro-angiogéniques, comme VEGF et bFGF (Berger et coll., 1999). La MT1-MMP joue un rôle important dans les phénomènes de migration des cellules endothéliales ; elle induit la migration, l'invasion, et la formation de pseudotubes capillaires sur gélatine (Gálvez et coll., 2001 ; Seiki et coll., 2003 ; Bauvois, 2004). En revanche, d'autres MMPs peuvent avoir un effet négatif sur l'angiogenèse, en produisant des facteurs anti-angiogéniques, comme certaines matrikines (O'Reilley et coll., 1999 ; Wen et coll., 1999).
- Intravasation, extravasation et croissance métastatique : ces processus sont liés à la capacité des MMPs à dégrader les membranes basales entourant l'épithélium vasculaire.

II.5.2. Principales MMPs impliquées dans le mélanome

De nombreuses protéases sont impliquées dans le développement des mélanomes et dans les phénomènes de dissémination métastatique (Hofmann et coll., 2000a). Les cellules de mélanome expriment essentiellement les collagénases MMP-1 et -13, les gélatinases MMP-2 et -9 et la MT1-MMP, ainsi que les TIMP-1, -2 et -3 (Hofmann et coll., 2005). L'augmentation de l'expression des MMP-1, -2, -9 et MT1-MMP est souvent corrélée à un phénotype invasif.

a) La voie MMP-2/MT1-MMP/TIMP-2

In vitro, la MMP-2 active est spécifiquement exprimée par les lignées cellulaires hautement invasives (Capon et coll., 1999). Dans les lignées peu invasives, la forte sécrétion de TIMP-2 inhibe l'activation de la pro MMP-2 (Kurshat, 1999).

La surexpression de l'intégrine $\alpha\beta 3$ et/ou de la MT1-MMP stimule l'activation de la pro MMP-2 (Figure 7) (Hofmann et coll., 2000b). La MT1-MMP joue également un rôle direct dans la progression tumorale et la dissémination métastatique, puisqu'elle est capable de dégrader de nombreux composants matriciels, comme le collagène I, la gélatine ou encore les protéoglycannes. De plus, des études ont montré que l'extinction de son expression entraîne une inhibition de l'invasion cellulaire, et ce dans des lignées cellulaires tumorales qui produisent des niveaux élevés d'autres MMPs. Ces observations démontrent que la MT1-MMP contribue à la progression tumorale, indépendamment de ses capacités à activer la pro MMP-2 (Koike et coll., 2002 ; Sounni et Noel, 2005 ; Sato et coll., 2005).

D'autre part, la surexpression de la MMP-2 stimule la migration des cellules de mélanome (Hofmann et coll., 2000a). A l'opposé, l'adhésion ainsi que l'étalement des cellules tumorales en culture sont stimulés par la surexpression du TIMP-2.

In vivo, l'augmentation de l'activité de la MMP-2 par surexpression de la MT1-MMP et/ou de l'intégrine $\alpha\beta 3$ augmente, de manière significative, l'agressivité de la tumeur (Hofmann et coll., 1999). La surexpression de MT1-MMP est corrélée à une augmentation de la croissance tumorale, et de la vascularisation *in vivo* (Sounni et coll., 2003). La MMP-2 est essentiellement exprimée et sécrétée par les cellules tumorales et stromales au front de migration, par les cellules métastatiques, ainsi que par les cellules endothéliales participant à la néovascularisation. La MT1-MMP est localisée au front de migration de la tumeur, au

même endroit que la MMP-2 active (Figure 8) (Hofmann et coll., 2005). L'utilisation de souris déficientes en MMP-2 a permis de démontrer l'implication de cette protéase dans les phénomènes de croissance tumorale, de néoangiogenèse et de dissémination métastatique (Itoh et coll., 1998). La MMP-2 intervient donc à tous les stades du développement de la tumeur.

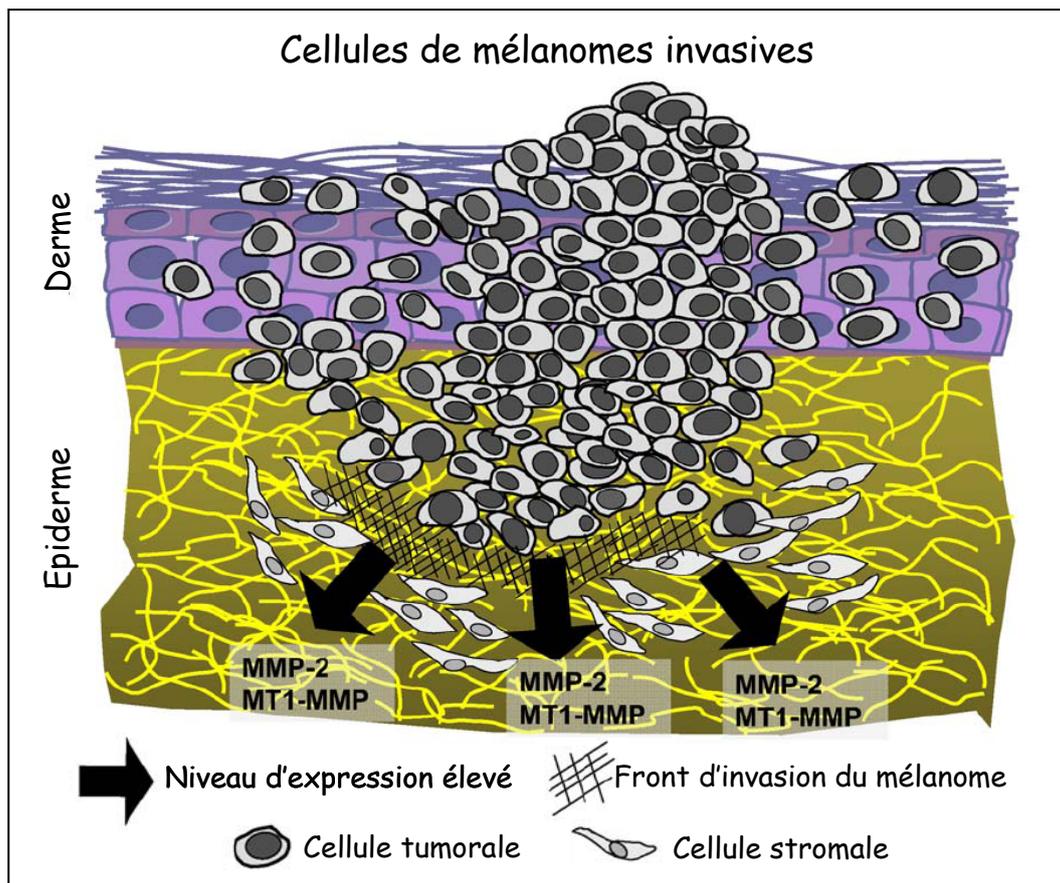


Figure 8 : Expression de la MMP-2 et de la MT1-MMP par les cellules tumorales et stromales au front d'invasion de la tumeur

(Adapté de Hofmann et coll., 2005)

Chez les patients atteints de mélanome, le dosage sérique de la MMP-2, bien que non corrélé au stade de la tumeur, constitue un mauvais facteur pronostique, que ce soit pour la présence de métastases ou pour la survie après 5 ans (Wollina et coll., 2001).

b) La voie MMP-9

Concernant le rôle de la MMP-9, des résultats contradictoires ont été obtenus.

Dans des modèles de mélanomes humains, la MMP-9 est exclusivement exprimée au cours de la phase de croissance horizontale, et pas lors de la phase de croissance verticale. Ces observations suggèrent un rôle de la MMP-9 dans les phases précoces de la progression tumorale (Van den Oord et coll., 1997).

En revanche, dans des modèles murins, la MMP-9 est retrouvée uniquement dans les stades les plus avancés du mélanome ; son expression est alors corrélée à l'agressivité de la tumeur. L'utilisation de souris déficientes en MMP-9 a permis de mettre en évidence une inhibition significative du nombre de métastases, après injection de cellules tumorales (Itoh et coll., 1999). La MMP-9 semble donc participer activement à la formation de métastases.

c) La voie MMP-1

Cette protéase est sécrétée au cours de la progression tumorale, à partir des stades III et IV de Clark, par les fibroblastes au contact des cellules de mélanome (Wandel et coll., 2000). La MMP-1 participe activement à la dégradation de la matrice extracellulaire, en particulier des collagènes.

III. LE SYSTEME PLASMINOGENE-PLASMINE

Le système d'activation du plasminogène, initialement impliqué dans la fibrinolyse, participe à la dégradation de la matrice extracellulaire ainsi qu'à l'activation de diverses MMPs, contribuant ainsi à augmenter les capacités invasives des cellules tumorales (Figure 9).

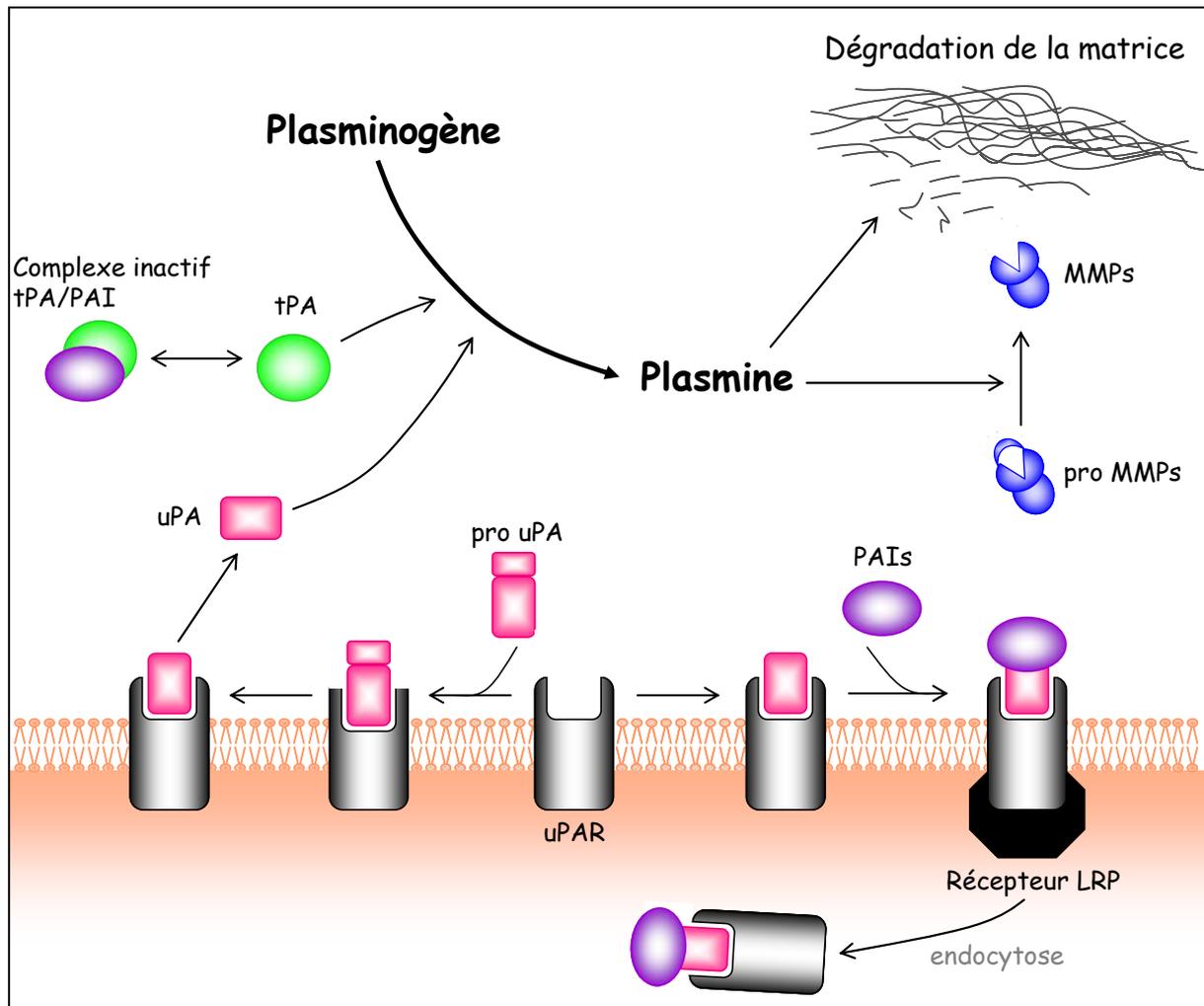


Figure 9 : Le système plasminogène-plasmine

Le plasminogène est activé en plasmine par uPA ou tPA. La plasmine ainsi générée est capable de dégrader directement la matrice extracellulaire ou d'activer d'autres voies protéolytiques.

III. 1. LE PLASMINOGENE

Le plasminogène est une glycoprotéine de 92 kDa constituée de 791 acides aminés, synthétisée essentiellement par le foie, et présente dans la circulation sanguine. Pour être actif, il doit être clivé en 2 sites : d'une part entre l'arginine 561 et la valine 562 par des activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) ou tissulaire (tPA), d'autre part entre les lysines 77 et 78, par autolyse. Ces 2 clivages protéolytiques aboutissent à la formation de la plasmine, forme active du plasminogène (Andreasen et coll., 1997).

L'angiostatine, peptide composé des 4 premiers domaines kringle, est une molécule capable de réguler l'angiogenèse (Cao et coll., 1997 ; Stack et coll., 1999).

III. 2. LA PLASMINE

La plasmine est une protéine de 90 kDa composée de deux chaînes polypeptidiques reliées par deux ponts disulfure. Une chaîne A, dite lourde, contient 5 domaines de type kringle (structures formant 2 boucles concentriques reliées par 3 ponts disulfure) à l'extrémité N-terminale et une chaîne B, dite légère, contenant le site catalytique de la molécule. C'est une sérine protéase capable de dégrader des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine...) et d'activer diverses MMPs par clivage protéolytique (Monea et coll., 2002).

III. 3. L'ACTIVATEUR DU PLASMINOGENE DE TYPE URINAIRE (uPA OU UROKINASE)

L'urokinase ou uPA est une protéine de 50 kDa composée de deux chaînes polypeptidiques reliées par 2 ponts disulfure. L'uPA est une sérine protéase qui comporte un domaine de type facteur de croissance (similaire à l'EGF), un domaine de type kringle présent sur la chaîne A, et un domaine catalytique présent sur la chaîne B. Cette protéase est synthétisée sous forme inactive (pro uPA), et est secondairement activée par la plasmine. Son rôle principal est de cliver le plasminogène en plasmine ; ce processus péricellulaire nécessite la fixation d'uPA sur son récepteur membranaire (uPAR) (Andreasen et coll., 1997). Il requiert également la présence d'une protéine p11, dont le rôle précis est encore mal défini, mais dont l'extinction d'expression abolit l'activation d'uPA (Choi et coll., 2003).

III. 4. LE RECEPTEUR MEMBRANAIRE DE uPA : uPAR

Le récepteur de l'uPA est une protéine d'environ 55 kDa, composée d'une seule chaîne polypeptidique, et ancrée à la membrane plasmique par un GPI. Il comporte 3 domaines homologues (D1 à D3) d'environ 90 acides aminés (Ploug et coll., 1991). Le domaine D1 de uPAR fixe uPA, sous forme latente ou active, via son domaine de type facteur de croissance, mais il ne le protège pas des inhibiteurs (Figure 10). uPAR participe ainsi à l'activation péricellulaire du plasminogène en plasmine. Il est également capable de fixer d'autres molécules, comme la vitronectine ou les sous-unités d'intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$, probablement par l'intermédiaire de son domaine D2.

uPAR est impliqué dans les phénomènes d'adhésion, de prolifération, d'apoptose et de migration cellulaire en jouant un rôle dans l'activation de l'urokinase, mais également en induisant des voies de transduction impliquant des kinases ainsi que des constituants du cytosquelette (Blasi et Carmeliet, 2002 ; Ragno, 2006 ; Besch et coll., 2007).

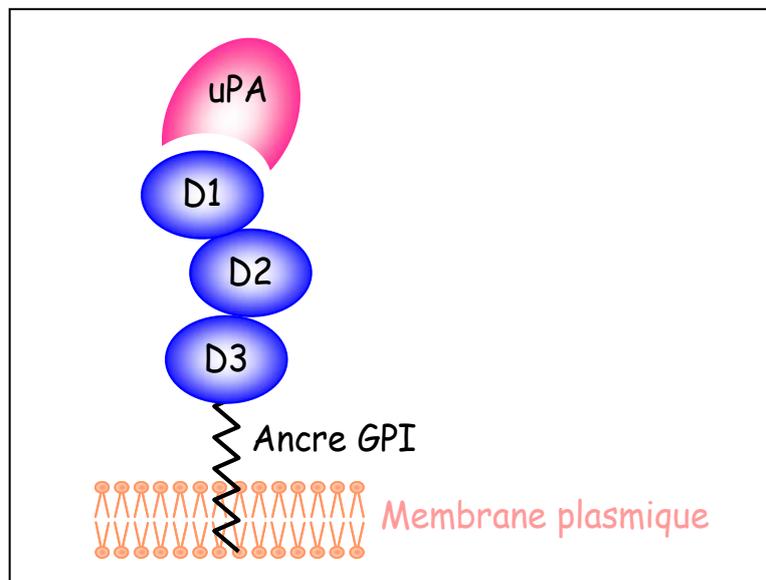


Figure 10 : Représentation schématique du récepteur de l'urokinase

(Adapté de Blasi et Carmeliet., 2002)

III. 5. L'ACTIVATEUR DU PLASMINOGENE DE TYPE TISSULAIRE (tPA)

tPA est une protéine de 66 kDa composée d'une seule chaîne polypeptidique. Cette protéine comporte 4 domaines principaux : un domaine catalytique de type sérine protéase, un domaine de type facteur de croissance (similaire à l'EGF), et deux domaines impliqués dans la fixation des substrats. En premier lieu, tPA est un acteur dans la fibrinolyse, mais un rôle de plus en plus important lui est attribué dans le processus d'invasion tumorale, en particulier dans le cas du mélanome (De Vries et coll., 1996).

III. 6. PRINCIPAUX INHIBITEURS DU SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE

Les 3 principaux inhibiteurs de cette cascade protéolytique appartiennent à la famille des serpins (Serine Proteinase Inhibitors) (Vassalli et coll., 1991). L' α 2-antiplasmine est un inhibiteur de la plasmine. Deux autres inhibiteurs des activateurs du plasminogène ont été caractérisés, PAI-1 et PAI-2 (inhibiteurs des activateurs du plasminogène 1 et 2), capables d'inhiber uPA et tPA. D'autres inhibiteurs non spécifiques, comme la protéinase Nexin-1 (PN-1) et la protéin C inhibitor (PCI) ont également été décrits (Vassalli et coll., 1991).

PAI-1 est retrouvé dans le plasma sous forme inactive, son association avec la vitronectine le stabilise sous sa forme active (Schvartz, 1999).

PAI-1 se fixe au complexe membranaire uPA/tPA, l'ensemble est internalisé par endocytose (participation du récepteur de type LRP : lipoprotein Receptor-related-peptide), puis chaque constituant du complexe est recyclé par la machinerie cellulaire (De Vries et coll., 1996 ; Nykjaer et coll., 1997).

III. 7. IMPLICATION DU SYSTEME PLASMINOGENE/PLASMINE DANS LE MELANOME

La protéolyse matricielle, mécanisme indispensable à la migration et l'invasion des cellules tumorales, est en partie dépendante du système plasminogène/plasmine (Andreasen et coll., 2000). La plasmine participe à la dégradation de la matrice extracellulaire de manière directe, mais également de manière indirecte en activant d'autres cascades protéolytiques.

Dans les tissus tumoraux, la synthèse de tPA est généralement plus faible que celle d'uPA, sauf dans les mélanomes cutanés. Elle est localisée au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins et autour des cellules tumorales, au niveau du front d'invasion (De Vries et coll., 1995). tPA est essentiellement impliqué dans les phases initiales de la progression tumorale (Baramova et coll., 1994 ; De Vries et coll., 1996). Plus tardivement, au cours de la migration et de la dissémination métastatique, uPA retrouve son rôle prépondérant, comme dans d'autres types cellulaires (De Vries et coll., 1996).

En effet, la synthèse d'uPA est accrue dans les lignées à haut potentiel invasif. La dégradation de la matrice extracellulaire *in vitro*, ainsi que la production d'uPA et de PAI-1 par les cellules de mélanome, sont corrélées avec leur capacité à former des métastases (Quax et coll., 1991). C'est lors du processus métastatique que le rôle d'uPA est le mieux décrit (Gershtein et coll., 2001). La surexpression d'uPA dans les cellules tumorales induit une augmentation du nombre de métastases ; au contraire, la formation de métastases peut être réduite par l'utilisation d'un anticorps anti-uPA (Hearing et coll., 1988).

Le rôle des activateurs du plasminogène, uPA et tPA, dans la progression tumorale est sous le contrôle des inhibiteurs PAI-1 et PAI-2. Ce contrôle de l'équilibre activateur/inhibiteur est essentiel dans ce processus. La surexpression de PAI-2 contrôle l'activité d'uPA, et permet la réduction de la croissance tumorale *in vivo*, ainsi que l'inhibition de la formation de métastases (Mueller et coll., 1995). Le rôle de PAI-1 dépend de sa concentration. Ainsi à de faibles concentrations, de l'ordre du nanomolaire, ce qui reflète le taux physiologique circulant chez la souris, PAI-1 apparaît comme un partenaire indispensable lors de l'invasion tumorale (Khatib et coll., 2001). En revanche, à de fortes concentrations, de l'ordre du micromolaire, PAI-1 permet l'inhibition d'uPA et de tPA, réduisant ainsi l'angiogenèse et la progression tumorale (Devy et coll., 2002). Concernant le rôle de PAI-1 dans la formation des métastases, aucune relation avec son expression n'a été démontrée (Eitzman et coll., 1996). Des expériences ont également permis de démontrer l'implication d'uPAR dans les phénomènes d'apoptose, puisque l'invalidation de ce récepteur par l'utilisation d'ARN interférents induit fortement l'apoptose dans des cellules de mélanome, via l'augmentation d'expression des protéines p53 et de p21 (Besch et coll., 2007).

L'ensemble de ces résultats montre l'importance du système plasminogène/plasmine dans la progression tumorale.

IV. LES MEMBRANES BASALES

Les membranes basales, structures denses et amorphes, sont des matrices extracellulaires spécialisées qui ont longtemps été considérées comme de simples supports architecturaux, permettant la cohésion des tissus. Il est maintenant admis que cette structure, en perpétuel renouvellement, est un environnement dynamique pour les cellules qui régule diverses fonctions cellulaires. En effet, les membranes basales établissent de nombreuses interactions avec les cellules, via les récepteurs membranaires, comme les intégrines, induisant de nombreux signaux cellulaires (Ghohestani et coll., 2002 ; Bosman et Stamenkovic, 2003). Ainsi, les membranes basales sont impliquées dans la régulation du comportement cellulaire, notamment dans les processus de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire lors de la progression tumorale (Paulsson, 1992 ; Miosge, 2001). Ce sont également des composants structuraux et fonctionnels importants de toutes les parois vasculaires et capillaires, et elles jouent donc un rôle crucial dans la progression tumorale.

Les membranes basales sont composées de trois grandes classes de protéines possédant des propriétés variées : les protéoglycannes, les glycoprotéines de structure et les collagènes, que nous développerons plus particulièrement (Figure 11) (Yurchenco et Schittny, 1990 ; Kalluri, 2003). Chaque protéine exerce une fonction particulière, et la combinaison de toutes ces fonctions assure aux membranes basales des propriétés structurales diversifiées, ainsi qu'une grande capacité de régulation de l'activité cellulaire (Bosman et Stamenkovic, 2003).

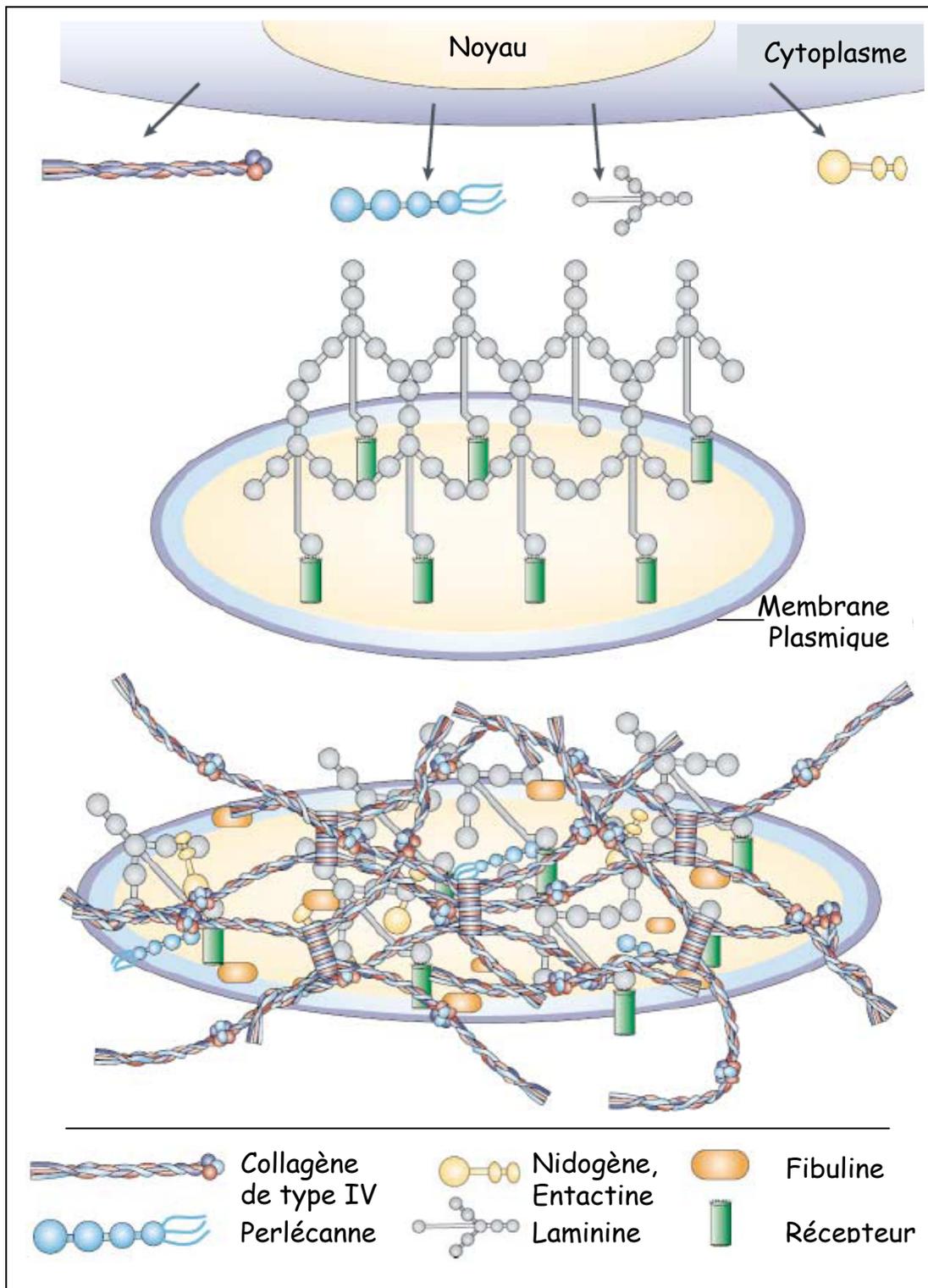


Figure 11 : Représentation schématique de l'architecture des membranes basales

(Adapté de Kalluri, 2003).

IV.1. LES PROTEOGLYCANNES

Les membranes basales contiennent des protéoglycannes qui leur confèrent des propriétés importantes, comme une forte hydratation, une perméabilité sélective, la capacité à fixer des facteurs de croissance, et une grande résistance aux dégradations protéolytiques. Les protéoglycannes comprennent deux membres majoritaires, le perlécane et l'agrine, constitués d'une protéine cœur associée à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes à héparane sulfate.

Le perlécane est le protéoglycane à héparane sulfate majoritaire des membranes basales. Son nom provient de son aspect en ombrage rotatoire, montrant 7 perles sur une ficelle ("beads on a string") (Noonan et coll., 1991). Il est constitué d'une protéine cœur de 350 à 400 kDa, composée de 5 domaines différents, et de 3 ramifications glycaniques d'héparane sulfate de 35 à 40 kDa (Paulsson et coll., 1987). Sa principale propriété est de se fixer aux autres composants de la membrane basale, et de fixer des facteurs de croissance, comme le bFGF (Paulson et coll., 1987).

L'agrine, quant à elle, a été isolée au sein des membranes basales du système neuromusculaire. Ce protéoglycane à héparane sulfate, constitué d'une protéine cœur multidomaine de 220 kDa, tient son nom de sa capacité à agréger les récepteurs d'acétylcholine présents dans les membranes post-synaptiques (Smith et coll., 1987 ; Bezakova et Ruegg, 2003).

IV.2. LES GLYCOPROTEINES

Les glycoprotéines matricielles possèdent des structures et des fonctions variées. Elles participent à différentes fonctions grâce à la présence de motifs structuraux spécialisés, notamment des séquences capables de reconnaître et de fixer des récepteurs à la surface cellulaire, ou des protéines extracellulaires, comme les collagènes ou les protéoglycannes. Ces protéines jouent donc un rôle très important dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Elles sont, par conséquent, impliquées dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire.

Les laminines, glycoprotéines présentes dans les membranes basales, sont formées de 3 chaînes polypeptidiques distinctes, α , β et γ , associées en triple hélice par des ponts disulfure. On dénombre actuellement 5 chaînes α ($\alpha 1$ à $\alpha 5$), 3 chaînes β ($\beta 1$ à $\beta 3$) et 3

chaînes γ ($\gamma 1$ à $\gamma 3$), formant au moins 15 isoformes de laminine (Colognato et Yurchenco., 2000). Les laminines possèdent de nombreux domaines d'interaction avec le collagène IV et l'entactine (ou nidogène), et jouent ainsi un rôle d'interconnexion entre les composants majeurs de la membrane basale que sont le collagène IV, les laminines et le perlécane. Les laminines 1, 5, 6 et 7 sont retrouvées dans les membranes basales de manière ubiquitaire (Aumailley et Krieg, 1996 ; Lindblom et Paulsson, 1996).

Le nidogène (ou entactine) est une glycoprotéine sulfatée de 150 kDa, entrant dans la composition des membranes basales (Bender et coll., 1981 ; Lindblom et Paulson, 1996). Deux isoformes sont actuellement décrites : le nidogène-1, de distribution tissulaire ubiquitaire, et le nidogène-2, de répartition plus restreinte. Cette protéine, d'environ 1250 acides aminés, est composée de 3 domaines globulaires, G1, G2, G3, et d'un domaine R en bâtonnet. Elle contient de nombreux résidus cystéine, une séquence RGD et 2 sites potentiels de fixation du Ca^{2+} . Le nidogène semble jouer un rôle d'interconnexion entre les composants majeurs de la membrane basale, le collagène IV, les laminines et le perlécane (Hopf et coll., 2001).

IV.3. LES COLLAGENES ASSOCIES AUX MEMBRANES BASALES

IV.3.1. Généralités sur les collagènes

Les protéines appartenant à la superfamille des collagènes sont les plus abondantes de l'organisme humain (25 à 30 % des protéines totales) ; elles peuvent représenter jusqu'à 80 % des protéines de la matrice extracellulaire selon les tissus. Elles jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité des tissus et des organes chez l'homme (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005), et sont également impliquées dans de nombreux processus physiopathologiques, tels que l'embryogenèse, la cicatrisation, ou le contrôle de l'invasion tumorale.

Le terme de collagène désigne les protéines de la matrice extracellulaire présentant, au sein de leur structure, au moins un domaine en triple hélice. Ce domaine est formé par l'association de 3 chaînes polypeptidiques, appelées chaînes α , enroulées en hélice autour d'un axe central. Dans la partie hélicoïdale, ces chaînes sont constituées d'une succession de triplets d'acides aminés (G-X-Y)_n, où X et Y sont respectivement la proline (40 % des cas), et l'hydroxyproline (10 % des cas). Ce triplet est responsable de la formation de la triple hélice. Les résidus glycine sont positionnés au centre de la triple hélice, laquelle est stabilisée par des

liaisons hydrogène établies par les groupements hydroxyle des nombreux résidus hydroxyproline (Gelse et coll., 2005). Dans la majorité des molécules de collagènes, les domaines hélicoïdaux sont interrompus par des domaines non hélicoïdaux. Les zones globulaires sont appelées domaines “NC” (pour “non collagéniques”), et les zones en triple hélice sont nommées domaines “COL” (pour “collagéniques”).

Les collagènes sont synthétisés sous forme de précurseurs, appelés procollagènes, contenant des propeptides N et C-terminaux. Ces propeptides sont clivés par 2 MMPs spécifiques lors de leur maturation (Gelse et coll., 2005).

IV.3.2. Classification des collagènes

A ce jour, 28 types de collagènes, et 43 chaînes polypeptidiques, ont été décrits. Plusieurs groupes ont été établis selon leur structure et leur assemblage supramoléculaire (Tableau 2) (Myllyharju et Kivirikko, 2004 ; Gelse et coll., 2005 ; Ricard-Blum et Ruggiero, 2005) :

- Les collagènes fibrillaires
- Les collagènes de membranes basales
- Les collagènes à filaments perlés
- Les collagènes de fibrilles d’ancrage
- Les collagènes à réseaux hexagonaux
- Les collagènes FACITs (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices)
- Les collagènes transmembranaires
- Les multiplexines (Multiple triple helix domains and interruptions)

Type de collagène	Assemblage moléculaire	Nom du gène	Distribution tissulaire
Collagènes Fibrillaires			
I	$[\alpha 1(\text{I})]_2\alpha 2(\text{I})$	COL1A1, COL1A2	os, derme, tendon, ligament, cornée
II	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	COL2A1	cartilage, humeur vitrée
III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	COL3A1	peau, paroi vasculaire, intestin, gencives
V	$\alpha 1(\text{V})\alpha 2(\text{V})\alpha 3(\text{V})$	COL5A1, COL5A2, COL5A3	poumon, cornée, os, placenta
XI	$\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$	COL11A1, COL11A2, COL11A3	cartilage, humeur vitrée
XXIV	$[\alpha 1(\text{XXIV})]_3$	COL24A1	os, cartilage, cornée, peau
XXVII	$[\alpha 1(\text{XXVII})]_3$	COL27A1	cartilage, œil, oreille, poumon
Collagènes de membranes basales			
IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV}), \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 à COL4A6	membranes basales
Collagènes à filaments perlés			
VI	$\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 3(\text{VI})$	COL6A1, COL6A2, COL6A3	derme, cartilage, placenta, poumons, parois vasculaires
Collagènes de fibrilles d'ancrage			
VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	COL7A1	peau, JDE
Collagènes à réseaux hexagonaux			
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$	COL8A1, COL8A2	cellules endothéliales, membrane de Descemet de l'œil
X	$[\alpha 3(\text{X})]_3$	COL10A1	cartilage hypertrophique

Tableau 2 : Classification et assemblage supramoléculaire des familles de collagène

(Adapté de Gelse et coll., 2003 ; Myllyharju et Kivirikko, 2004)

Type de collagène	Assemblage moléculaire	Nom du gène	Distribution tissulaire
Collagènes FACITs			
IX	$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$	COL9A1, COL9A2	cartilage, humeur vitrée, cornée
XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	COL12A1	ligaments, tendons, os, derme
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	COL9A1	derme, tendon, paroi vasculaire, placenta, poumons, foie
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	COL16A1	placenta
XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	COL19A1	cerveau, œil, testicule
XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$	-	cartilage, cornée, peau, tendon
XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	COL21A1	paroi vaisseaux sanguins
XXII	$[\alpha 1(\text{XXII})]_3$	COL22A1	cartilage, tendon
XXVI	$[\alpha 1(\text{XXVI})]_3$	COL26A1	ovaire, testicule
Collagènes transmembranaires			
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	COL13A1	épiderme, placenta, os, muscle
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	COL17A1	épiderme, JDE
XXIII	$[\alpha 1(\text{XXIII})]_3$	COL23A1	os, cartilage, cornée, poumon
XXV	$[\alpha 1(\text{XXV})]_3$	COL25A1	cerveau
Multiplexines			
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	COL15A1	membranes basales (reins, muscle lisse, pancréas)
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	COL18A1	poumons, foie, rein, capsule du cristallin
Autre			
XXVIII	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$	COL28A1	peau, intestin, reins, poumons, cerveau

Tableau 2 : suite

Dans la suite, nous ne développerons que la structure et les rôles des collagènes associés aux membranes basales.

IV.3.3. Le Collagène XV

Le collagène de type XV est un collagène non fibrillaire de la famille des multiplexines. C'est un homotrimère, d'environ 200 kDa, constitué de 3 chaînes $\alpha 1(XV)$ formant une triple hélice centrale, interrompue par de nombreux domaines non collagéniques (NC). Chaque chaîne α est composée, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, d'un domaine NC1 de 555 résidus, d'un domaine collagénique de 577 résidus, interrompu par 9 domaines NC, et d'un domaine NC11 de 256 résidus (Figure 12) (Myers et coll., 1992). Il a une large distribution tissulaire, avec une forte expression dans le cœur, le muscle squelettique et le placenta. Il est essentiellement localisé dans la zone de certaines membranes basales épithéliales, notamment des capillaires (Hagg et coll., 1997 ; Eklund et coll, 2001).

Le collagène XV joue un rôle structural important, en conférant une stabilité mécanique aux muscles squelettiques et aux microvaisseaux. Des souris déficientes en collagène XV présentent une dégénérescence progressive des cellules musculaires, ainsi qu'une microvasculature cardiaque anormale (Eklund et coll., 2001).

IV.3.4. Le Collagène XVIII

Le collagène de type XVIII présente de grandes homologies de séquence avec le collagène de type XV. Ce protéoglycane à héparanne sulfate est un homotrimère de 300 kDa, constitué de chaînes $\alpha 1(XVIII)$ formant une triple hélice. Chaque chaîne α comporte une séquence signal de 25 résidus, un domaine N-terminal NC1 de 301 résidus, un domaine collagénique de 674 résidus interrompu par 9 domaines NC, et un domaine NC11 de 312 résidus, situé en C-terminal. (Figure 12) (Rehn et Pihlajaniemi, 1994).

Le collagène XVIII est un composant des membranes basales de nombreux types cellulaires épithéliaux et vasculaires. On le retrouve dans les cellules musculaires lisses, les alvéoles pulmonaires, mais également dans des capillaires spécialisés comme les sinusoides du foie ou de la rate (Tomono et coll., 2002). Le variant d'épissage le plus court est exprimé dans les reins, le cœur, le placenta, la prostate, les ovaires, les muscles squelettiques et l'intestin (Halfter et coll., 1998), alors qu'un variant d'épissage plus long est exprimé préférentiellement dans le foie (Musso et coll., 1998). Au sein des membranes basales, le collagène XVIII interagit avec de nombreuses molécules, comme le perlécane ou la

laminine. Il peut également se lier à la surface cellulaire via des protéoglycannes à héparane sulfate, tel le glypicanne, et ainsi médier des effets biologiques, comme l'activité anti-angiogénique (Figure 12) (Marneros et Olsen, 2005).

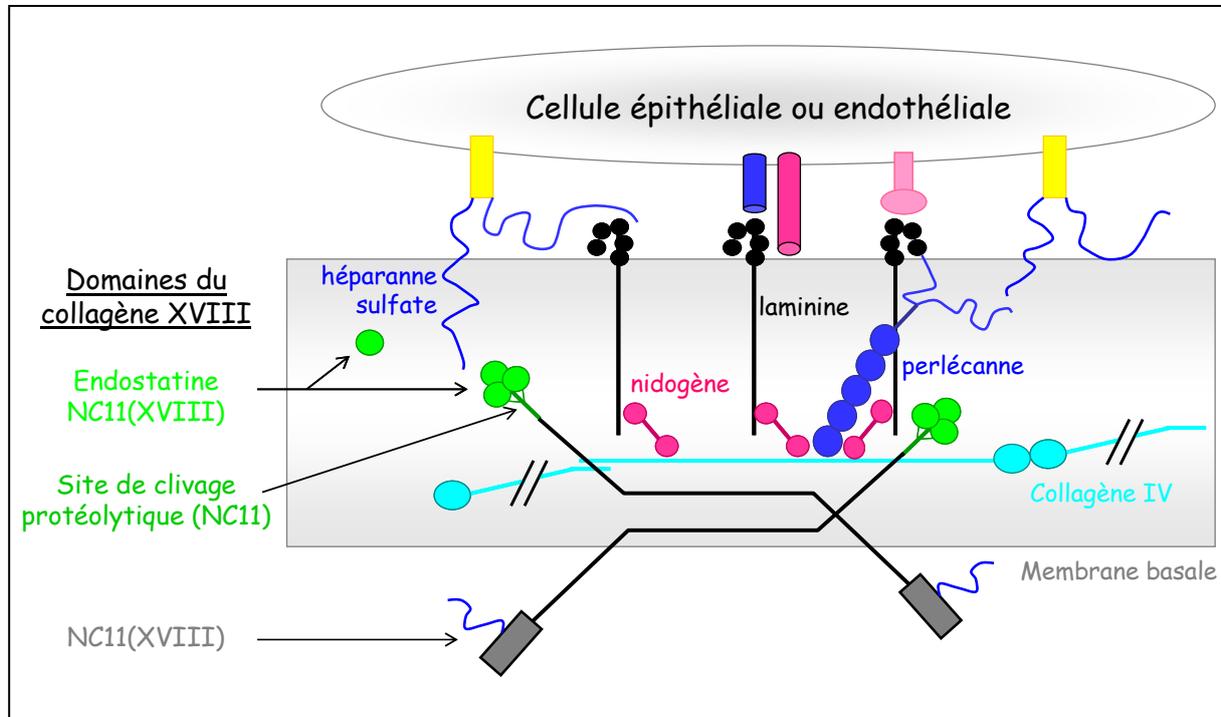


Figure 12 : Représentation schématique des interactions entre le collagène de type XVIII et les autres composants de la membrane basale

(Adapté de Marneros et Olsen, 2005).

L'utilisation de souris déficientes en collagène XVIII a permis de démontrer l'importance de ce collagène dans la vision, puisque l'inactivation du gène COL18 est associée à d'importants déficits oculaires (Marneros et coll., 2004 ; Marneros et Olsen, 2005).

IV.3.5. Le Collagène XIX

Le collagène de type XIX, composant mineur des membranes basales, a été découvert à partir d'un rhabdomyosarcome, tumeur maligne solide provenant des muscles striés (Myers et coll., 1993 ; Myers et coll., 1994). Ce collagène, de la famille des collagènes FACIT, est un homotrimère de 400 kDa, composé de chaînes $\alpha 1$ (XIX). Chaque chaîne est constituée de 1142 résidus, formant 6 domaines non collagéniques et 5 régions en triple hélice. De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on retrouve un peptide signal de 23

résidus, un domaine NC6 de 268 résidus, un domaine collagénique de 832 résidus interrompu par 4 régions NC (de 20 à 40 résidus), et un court domaine NC1 C-terminal de 19 résidus, présentant des homologies avec la thrombospondine (Figure 13) (Myers et coll., 1997). Les chaînes α s'associent pour former une structure en triple hélice, laquelle est stabilisée par de nombreux ponts disulfure intrachaînes, formés entre les 14 résidus de cystéine présents dans le polypeptide. La microscopie électronique par ombrage rotatoire montre une molécule en forme de bâtonnets (Myers et coll., 2003).

La distribution du collagène XIX, très large dans les tissus embryonnaires, est restreinte aux zones des membranes basales vasculaires, neuronales et de certaines membranes basales épithéliales, chez l'adulte (Sumiyoshi et coll., 1997 ; Amenta et coll., 2003). Ce collagène semble jouer un rôle dans la différenciation myogénique (Myers et coll., 1999) et dans le processus d'angiogenèse (Myers et coll., 1997). D'autre part, il disparaît au cours de la progression tumorale, dans le cancer du sein, et sa disparition apparaît essentielle au remodelage de la matrice extracellulaire, nécessaire à l'infiltration des cellules tumorales (Amenta et coll., 2003).

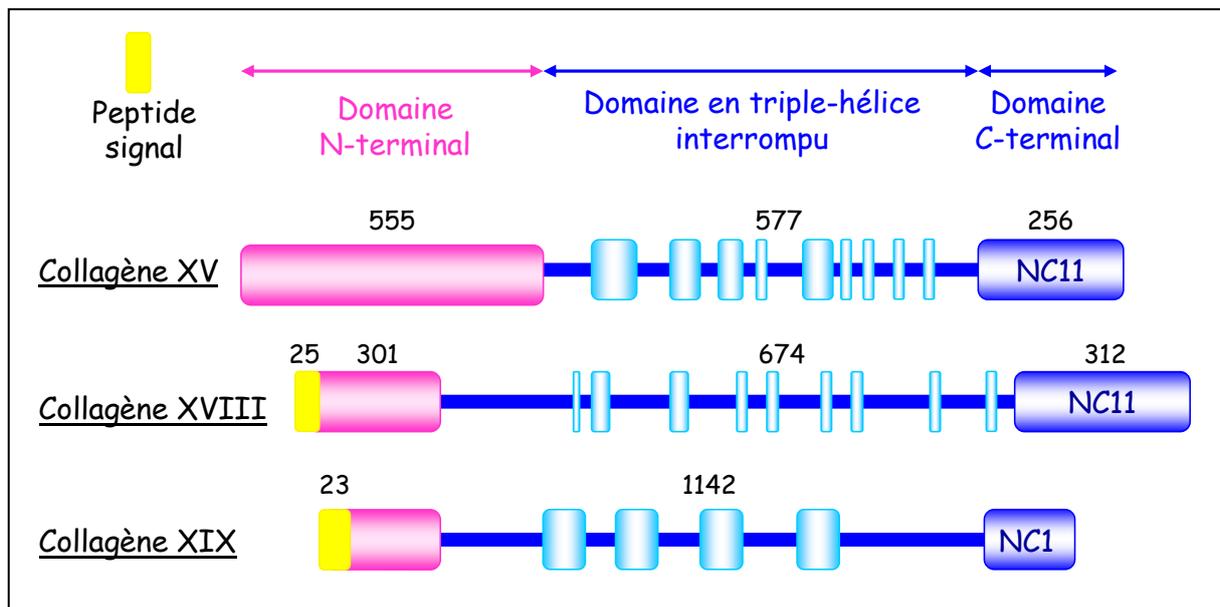


Figure 13 : Représentation schématique des chaînes α des collagènes de type XV, XVIII et XIX de membranes basales

(Adapté de Kefalides et Borel, 2005).

IV.3.6. Le Collagène IV

Le collagène de type IV, composant majeur des membranes basales, est également appelé “collagène formant des réseaux” (“network-forming collagen”), du fait de sa capacité à s’auto-assembler en réseaux. Ce collagène est essentiel à l’intégrité et aux fonctions biologiques des membranes basales (Myllyharju et Kivirikko, 2004) ; il intervient notamment dans les mécanismes d’adhésion, de migration, de différenciation et de croissance cellulaire (Aumailley et Timpl, 1986).

a) Structure

Le protomère de collagène de type IV est formé par l’association de 3 chaînes polypeptidiques $\alpha(\text{IV})$ parmi 6 possibles, $\alpha 1(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$. Chaque chaîne, entièrement séquencée (Zhou et coll., 1994), est codée par un gène différent ; ces gènes sont situés sur les chromosomes 13 ($\alpha 1$, $\alpha 2$), 2 ($\alpha 3$, $\alpha 4$) et X ($\alpha 5$, $\alpha 6$), en tandem, avec un promoteur commun. Leurs séquences sont relativement bien conservées, puisque 50 à 70 % d’homologies sont observées entre elles. Chaque chaîne $\alpha(\text{IV})$ comporte 3 domaines (Figure 14):

- un domaine 7S, d’environ 15 acides aminés, situé en N-terminal. Ce domaine est facile à isoler par ultracentrifugation, et sédimente avec un coefficient de Sverdberg égal à 7S, d’où son nom.
- un long domaine central en triple hélice, constitué d’environ 1400 acides aminés, avec la répétition Gly-Xaa-Xaa. Ce domaine est interrompu par une vingtaine de régions non collagéniques très courtes, conférant une certaine flexibilité à la molécule, et une spécificité de digestion protéolytique, notamment à la pepsine.
- un domaine globulaire non collagénique, situé en C-terminal, appelé domaine NC1, d’environ 230 acides aminés. Ce domaine est essentiel à la formation de la triple hélice de collagène.

Les chaînes α sont toutes glycosylées sur des résidus lysine du domaine collagénique, et sur des résidus asparagine de l’extrémité N-terminale (Nayak, 1991). L’interaction entre ces différentes chaînes α du trimère se fait via leur domaine NC1 (Figure 14).

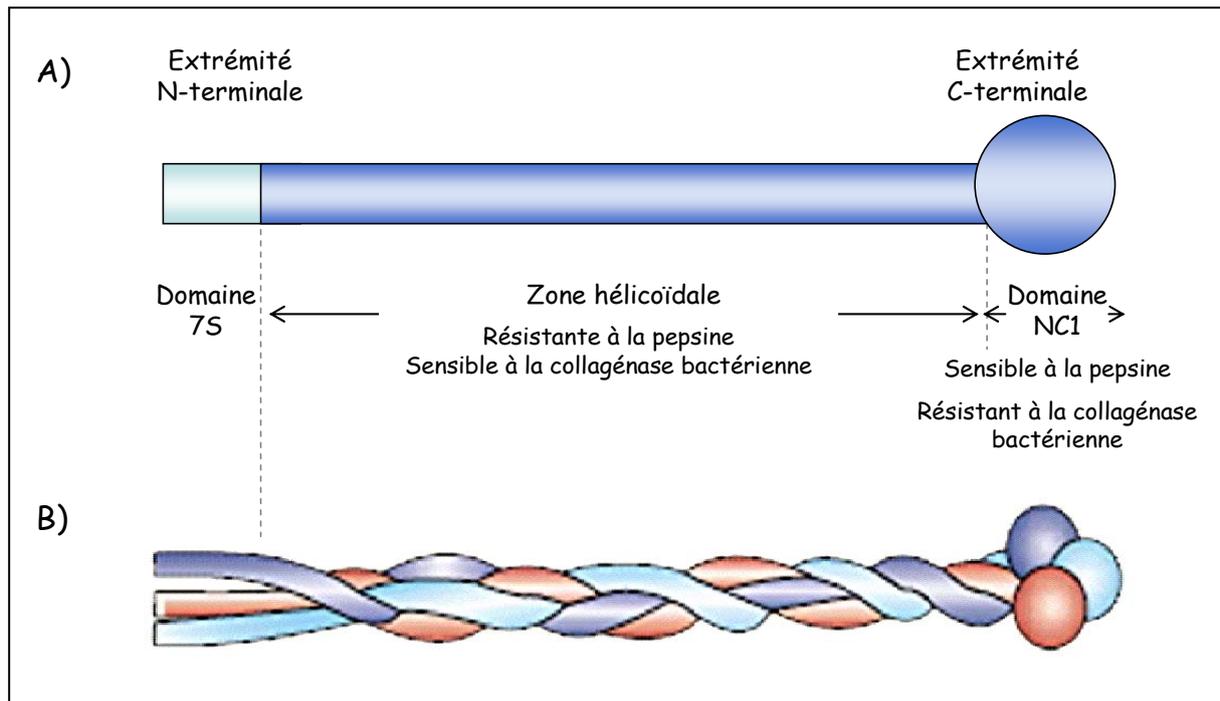


Figure 14 : Représentation schématique du collagène de type IV

A) Représentation de la chaîne α du collagène de type IV. B) Représentation du protomère de collagène de type IV, formé par l'association de 3 chaînes α .

b) Organisation et assemblage supramoléculaire

Le collagène de type IV ne forme pas de fibrilles, mais il polymérise sous forme de réseau, qui constitue l'essentiel de la *lamina densa* de la membrane basale.

Les domaines terminaux, 7S et NC1, sont les sites primordiaux pour la formation des oligomères de collagène de type IV (Timpl et coll., 1981). La formation de dimères se fait par l'intermédiaire des domaines NC1 ; ces dimères sont stabilisés par des ponts disulfure interchaînes, qui se forment grâce à la présence de 12 résidus cystéine, hautement conservés dans les 6 chaînes α (IV). Lors de la formation des tétramères, ce sont les domaines 7S de quatre protomères qui interagissent entre eux, deux dans un sens et deux dans le sens opposé, par de nombreux ponts disulfure, ainsi que par des liaisons croisées dérivées de la lysine et de l'hydroxylysine. Cette architecture compacte explique la résistance des domaines N-terminaux à la digestion collagénasique. L'ensemble des dimères et des tétramères se combine pour former un maillage très résistant (Figure 15) (Timpl, 1989).

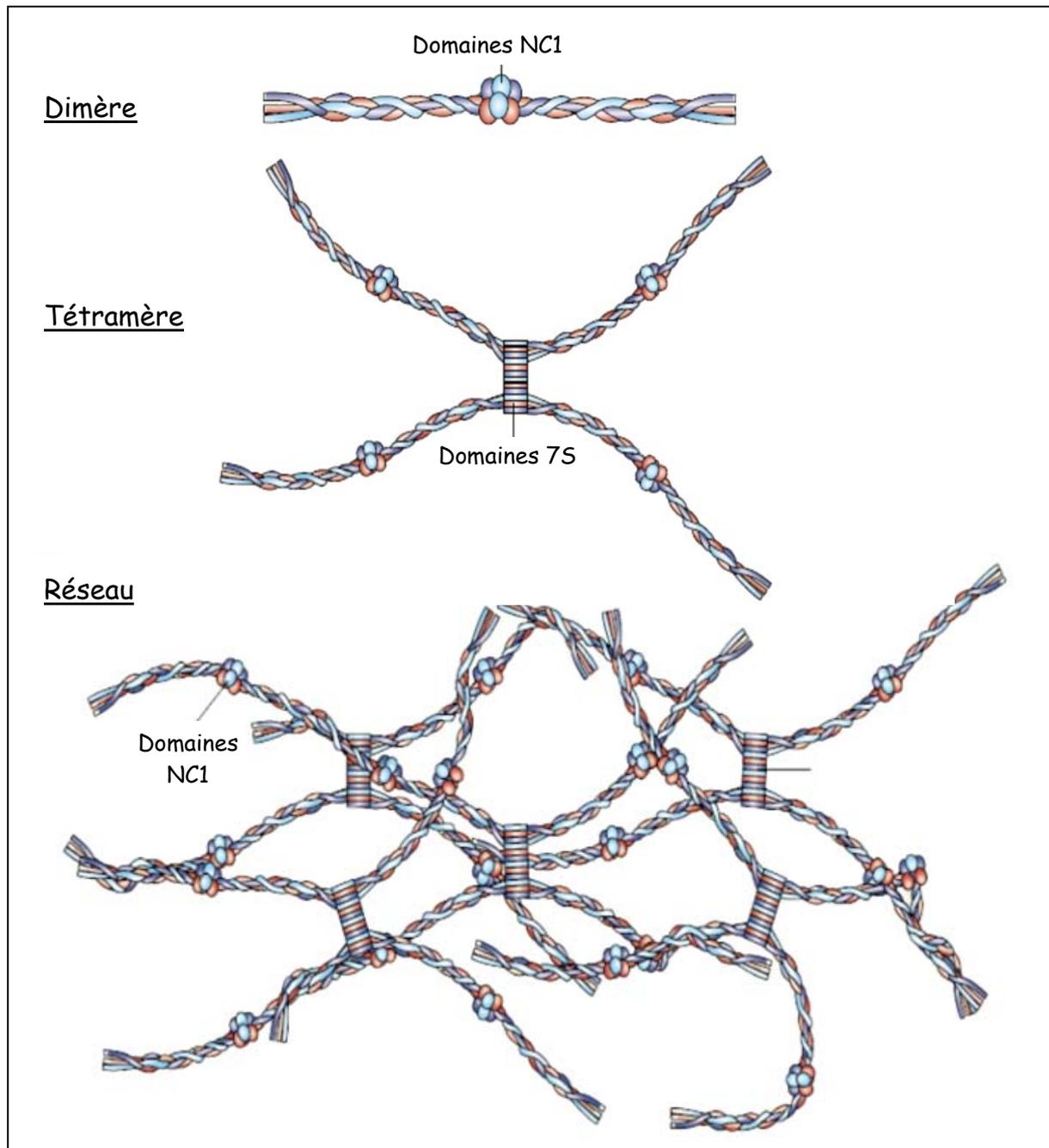


Figure 15 : Représentation schématique de la formation des réseaux de collagène de type IV

(Adapté de Kalluri, 2003)

Plusieurs épaisseurs de ce réseau de collagène de type IV se superposent pour former des mailles plus fines, dont les interstices sont obturés par des protéoglycannes et des glycoprotéines, comme les laminines ou l'entactine (ou nidogène) (Figure 11).

c) Distribution tissulaire

La distribution tissulaire des différentes chaînes α (IV) est très variable. Les chaînes $\alpha 1$ (IV) et $\alpha 2$ (IV) semblent ubiquitaires dans les membranes basales aux stades embryonnaires et adultes, où on les retrouve essentiellement associées sous la forme [$\alpha 1$ (IV)₂, $\alpha 2$ (IV)]. Cette association correspond également à la composition du collagène de type IV extrait de la tumeur d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de souris (Wisdom et coll., 1992). Il est à noter que des mutations, survenant à l'état embryonnaire dans les isoformes majeures [$\alpha 1$ (IV)₂, $\alpha 2$ (IV)], sont létales (Gelse et coll., 2003).

La distribution des chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ est plus restreinte et semble spécifique du stade de développement (Kelley et coll., 2002).

Les chaînes $\alpha 3$ (IV) et $\alpha 4$ (IV) sont spécifiques de certaines membranes spécialisées, comme le glomérule rénal, les fibres musculaires synaptiques, l'aorte, la cochlée, le poumon ou encore la capsule du cristallin (Butkowski et coll., 1989 ; Kalluri et coll., 2000). Des études immunologiques ont montré que les chaînes $\alpha 3$ (IV) et $\alpha 4$ (IV) étaient colocalisées dans le glomérule rénal (Butkowski et coll., 1987)

La chaîne $\alpha 5$ (IV) est surtout exprimée dans les membranes basales vasculaires, le rein, la jonction neuromusculaire, et la peau. Elle est également présente, chez l'embryon, dans la capsule du cristallin, mais elle semble remplacée par la chaîne $\alpha 3$ (IV) chez l'adulte (Kelley et coll., 2002).

La chaîne $\alpha 6$ (IV) est localisée dans la capsule du cristallin, le rein, le poumon, l'œsophage et la peau.

Des mutations ou des délétions intervenant dans les gènes codant les différentes chaînes α (IV) sont à l'origine de diverses pathologies, comme le syndrome d'Alport ou la leiomyomatose (Hudson et coll., 1993). Dans le syndrome de Goodpasture, des auto-anticorps dirigés contre le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ (IV) se fixent sur les membranes basales, notamment après exposition du domaine NC1 aux radicaux libres oxygénés (Saus et coll., 1988 ; Borza et coll., 2000).

V. LES MATRIKINES

De récentes données montrent que les macromolécules de la matrice peuvent contrôler diverses fonctions cellulaires, par elles-mêmes, ou bien par l'intermédiaire de certains de leurs domaines constitutifs. En se fixant sur des récepteurs spécifiques, ces molécules induisent un signal de transduction intracellulaire aboutissant à l'adhésion, la prolifération, la migration cellulaire ou à une modulation des propriétés invasives de ces cellules, et notamment des cellules cancéreuses. Pour désigner ces modules peptidiques issus des macromolécules de la matrice, nous avons proposé le terme de Matrikines (Maquart et coll., 1999), qui désigne des peptides libérés par protéolyse partielle et contrôlée de macromolécules de la matrice extracellulaire, capables de réguler des fonctions cellulaires. Le terme de matricryptines (Davies et coll., 2000) désigne des peptides issus de macromolécules matricielles, mais dont la protéine d'origine n'exerce pas l'activité biologique du peptide. Parmi les matrikines, certaines exercent une activité pro-angiogénique et pro-tumorale, d'autres sont anti-angiogéniques et anti-tumorales.

Nous ne présenterons, dans ce chapitre, que les matrikines dérivées des principales protéines des membranes basales ou associées aux membranes basales, en nous intéressant essentiellement à leurs rôles lors de la progression tumorale.

V. 1. MATRIKINES DES LAMININES

Différentes isoformes de laminine interagissent avec les cellules cancéreuses, notamment avec les cellules de mélanome. Au cours de l'invasion tumorale et de la dissémination métastatique, les cellules tumorales traversent les membranes basales, avec des phénomènes de dégradation protéolytique qui engendrent la libération de peptides de laminine.

V.1.1. La laminine 1 (LN-1)

La laminine-1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) exerce de multiples activités biologiques, comme l'induction de l'adhésion et de l'étalement des cellules, et elle stimule leur prolifération. Elle entraîne également une augmentation de la sécrétion des MMPs et de la dissémination métastatique.

La chaîne $\alpha 1$ de la LN-1, via sa séquence SIKVAV, est capable de stimuler la croissance tumorale et la formation de métastases (Sweeney et coll., 1991), ainsi que l'angiogenèse chez la souris (Kibbey et coll., 1992 ; Grant et coll., 1992). Le peptide LQVQLSIR de la chaîne $\alpha 1$ stimule le potentiel invasif des cellules de mélanome B16F10 (Engbring et coll., 2002). D'autres séquences de cette chaîne induisent l'adhésion et l'invasion des cellules de mélanome, en se fixant sur l'intégrine $\alpha 6\beta 1$, et en provoquant l'augmentation de la production de MMP-9 (Kuratomi et coll., 1999).

Des séquences peptidiques isolées de la chaîne $\beta 1$ (PDSGR et RYVVLPR) induisent l'adhésion cellulaire (Kleinman et coll., 1989). En revanche, la séquence YIGSR se révèle inhibitrice de la croissance tumorale et de la colonisation métastatique des poumons chez la souris (Nomizu et coll., 1993).

Le peptide C16 de la chaîne $\gamma 1$ (KAFDITYVRLRF) stimule la migration et le potentiel métastatique des cellules de mélanome, par augmentation de la synthèse de pro MMP-9 (Kuratomi et coll., 2002).

La plupart des séquences de la LN-1 stimulent l'adhésion cellulaire ainsi que la progression du mélanome. La laminine 1 constitue une molécule pro-tumorale.

V.1.2. La laminine 5 (LN-5)

La laminine-5, composée de l'association des chaînes $\alpha 3$, $\beta 3$ et $\gamma 2$, est essentiellement exprimée dans les membranes basales épithéliales. Elle induit l'adhésion cellulaire en interagissant avec diverses intégrines, comme les intégrines $\alpha 3\beta 1$ ou $\alpha 6\beta 4$ (Tsuji et coll., 2002). Elle stimule la migration et l'invasion des cellules de mélanome, en augmentant la synthèse de MMP-9 (Rousselle, 2002). Le clivage de la chaîne $\gamma 2$, par la MMP-2 ou la MT1-MMP, est un signal inducteur de la migration des cellules normales et cancéreuses, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Giannelli et coll., 1997 ; Koshikawa et coll., 2004). L'expression de cette chaîne est essentiellement retrouvée dans les tissus cancéreux, au front invasif de la tumeur

(Tran et coll., 2005). L'ensemble de ces observations démontre l'action pro-tumorale de la laminine-5.

V. 2. MATRIKINES DES PROTEOGLYCANNES

Le perlécane, protéoglycane à héparane sulfate majoritaire des membranes basales, stimule la progression tumorale (Timar et coll., 2002). L'augmentation de l'expression du perlécane est corrélée à l'augmentation des propriétés invasives et à l'augmentation du potentiel métastatique des cellules de mélanome (Cohen et coll., 1994). La suppression de son expression, par utilisation d'ADN complémentaire anti-sens, diminue la prolifération et l'invasion des cellules de mélanome, ainsi que la croissance tumorale et l'angiogenèse *in vivo* (Adatia et coll., 1997 ; Sharma et coll., 1998).

L'extrémité C-terminale de la protéine cœur du perlécane, également appelée endorépeline, démontre des activités opposées à celles du perlécane (Bix et Iozzo, 2005). Cette molécule inhibe la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de pseudotubes *in vitro*, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Elle est également un puissant inhibiteur de l'angiogenèse dans divers modèles *in vivo* (Mongiat et coll., 2003 ; Bix et coll., 2006). Ces effets sont médiés par l'interaction entre l'endorépeline et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Bix et coll., 2004). L'endorépeline est libérée par clivage protéolytique du perlécane via diverses protéases, comme la plasmine, la thrombine, la MMP-1 ou encore la MMP-3 (Whitelock et coll., 1996).

V. 3. MATRIKINES DES COLLAGENES

V.3.1. Le collagène XIX

Actuellement, aucune activité biologique n'a été décrite concernant le domaine NC1 du collagène de type XIX.

V.3.2. Le collagène XVIII

L'endostatine est un fragment de 20 kDa, dérivé du domaine non collagénique NC11 du collagène XVIII, situé en C-terminal (Figure 16) (O'Reilly et coll., 1997 ; Ortega et Werb, 2002). Elle a été initialement purifiée à partir de milieux de culture issus d'une lignée cellulaire d'hémangioendothéliome de souris, puis caractérisée chez la souris et chez l'Homme. Elle peut être générée, *in vitro*, par clivage protéolytique du domaine C-terminal du collagène XVIII, via de nombreuses protéases comme la cathepsine L, l'élastase ou encore diverses MMPs, comme les MMP-3, -7, -9, -12, -13, -20, et la MT1-MMP, pour lesquelles les sites de clivage potentiels ont été mis en évidence dans la région charnière entre les domaines de trimérisation et les domaines endostatine (Ferrerias et coll., 2000 ; Heljasvaara et coll., 2005). Les fragments obtenus par clivage via les MMP-7 et -14 portent respectivement les noms de néostatine-7 et néostatine-14 (Chang et coll., 2005). L'endostatine est détectée dans le sérum humain, sous forme de différents variants protéolytiques, de masses moléculaires entre 16 et 21 kDa. Les taux physiologiques d'endostatine circulante sont de l'ordre de 30 à 100 ng/mL (John et coll., 1999 ; Standker et coll., 1997). L'endostatine peut se lier à l'héparine et aux protéoglycannes à héparane sulfate, comme le perlécane ; cette interaction nécessite la présence de cations divalents, comme le zinc (Ricard-Blum et coll., 2004). L'endostatine interagit également avec les laminines, ainsi qu'avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 5$ et $\alpha \nu\beta 3$ (Rehn et coll., 2001 ; Sudhakar et coll., 2003).

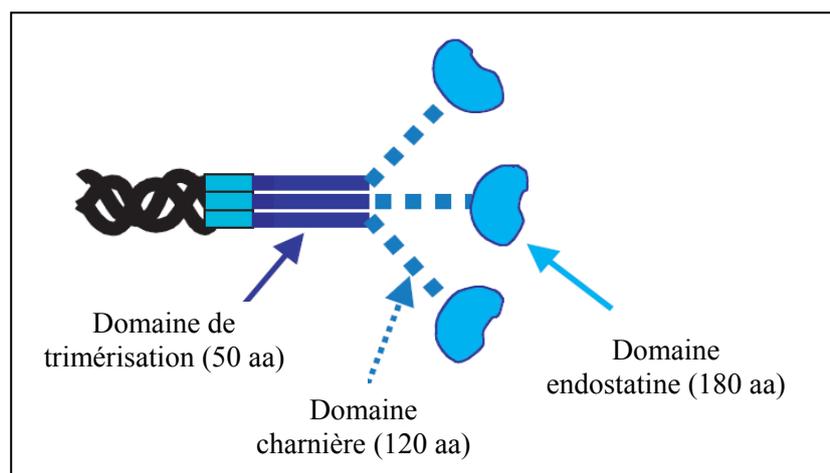


Figure 16 : Représentation schématique des sous domaines du collagène de type XVIII

(Adapté de Ortega et Werb, 2002)

La principale fonction de l'endostatine est d'inhiber l'angiogenèse (O'Reilly et coll., 1997 ; Marneros et Olsen, 2001 ; Ortega et Werb, 2002).

In vitro, elle induit l'apoptose des cellules endothéliales (Dhanabal et coll., 1999a), ainsi que l'inhibition de leur prolifération induite par les facteurs de croissance bFGF et VEGF, via deux mécanismes distincts (O'Reilly et coll., 1997 ; Ricard-Blum et coll., 2004). Les capacités migratoires des cellules endothéliales sont inhibées, dans un modèle de chambre de Boyden (Dhanabal et coll., 1999b). En bloquant l'activation de la pro MMP-2, par inhibition de l'activité catalytique de la MT1-MMP, ainsi que l'activité catalytique de la MMP-2, en se fixant directement à son domaine catalytique, l'endostatine inhibe l'invasion des cellules endothéliales (Kim et coll., 2000 ; Lee et coll., 2004). Elle contrôle également le système d'activation du plasminogène en stimulant la synthèse d'uPA, et en inhibant celle de PAI-1 (O'Reilly et coll., 1997).

In vivo, l'endostatine bloque efficacement l'angiogenèse et supprime la croissance des tumeurs primaires et des métastases dans divers modèles animaux expérimentaux (O'Reilly et coll., 1997 ; Dhanabal et coll., 1999b ; Jin et coll., 2001 ; Folkman, 2006).

Les effets anti-angiogénique et anti-tumoral de l'endostatine ne sont obtenus que pour des doses pharmacologiques très supérieures (100 à 1000 fois) aux concentrations physiologiques. Néanmoins, il est observé que des patients atteints de trisomie 21 (Syndrome de Down), et ayant par conséquent une copie supplémentaire du gène du collagène XVIII porté par le chromosome 21, sont relativement protégés contre le développement de diverses tumeurs solides. Leur taux d'endostatine circulante est d'environ 1,7 fois supérieur aux individus normaux (Zorick et coll., 2001). Des lignées de souris transgéniques, surexprimant l'endostatine dans ces mêmes proportions, présentent des croissances tumorales nettement diminuées par rapport aux souris ne surexprimant pas l'endostatine (Sund et coll., 2005). Toutefois, à long terme, ces souris surexprimant l'endostatine développent des problèmes oculaires (Elamaa et coll., 2005).

Divers essais cliniques ont été réalisés avec l'endostatine recombinante seule ou en association avec d'autres médicaments. Les thérapies géniques, notamment l'administration d'adénovirus codant l'endostatine, permettent une inhibition de la croissance tumorale et des métastases dans divers types de cancers (Folkman et coll., 2006). L'endostatine est généralement bien tolérée par les patients et induit une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales et tumorales.

V.3.3. Le collagène XV

La restine est un fragment de 22 kDa, issu du clivage protéolytique du domaine NC10 du collagène XV. Elle présente environ 60 % d'homologie avec l'endostatine, d'où son appellation "endostatin-like", et exerce également des activités anti-angiogénique et anti-tumorale. Contrairement à l'endostatine, la restine ne fixe ni le zinc ni l'héparine, mais elle présente un grand répertoire de ligands communs à l'endostatine dans les protéines de la matrice extracellulaire, comme la laminine-1, le nidogène, ou encore le perlécane (Sasaki et coll., 2000).

La restine inhibe la migration des cellules endothéliales *in vitro* ; quant à son effet sur leur prolifération, il est variable selon les lignées étudiées (Ramchandran et coll., 1999 ; Xu et coll., 2002).

In vivo, l'angiogenèse est inhibée, dans un modèle de membrane chorio-allantoïdienne de poulet (Sasaki et coll., 2000). L'administration systémique de restine supprime également la croissance tumorale chez la souris. Ces propriétés anti-tumorales semblent reposer sur le potentiel anti-angiogénique de la molécule (Ramchandran et coll., 1999).

La restine est décelée, à faible concentration, dans le sérum humain, ce qui laisse envisager un rôle physiologique pour cette matrikine (John et coll., 2004).

V.3.4. Le collagène IV

Certaines enzymes comme les MMPs, notamment les MMP-2 et -9, ou la pepsine, peuvent dégrader le collagène IV et ainsi libérer des fragments de la triple hélice ou des domaines NC1, lesquels exercent diverses activités biologiques. Le collagène de type IV est à l'origine de nombreuses matrikines issues des différentes chaînes α (IV) qui le composent (Figure 17). Ces fragments sont présents dans la circulation sanguine (Ortega et Werb, 2002).

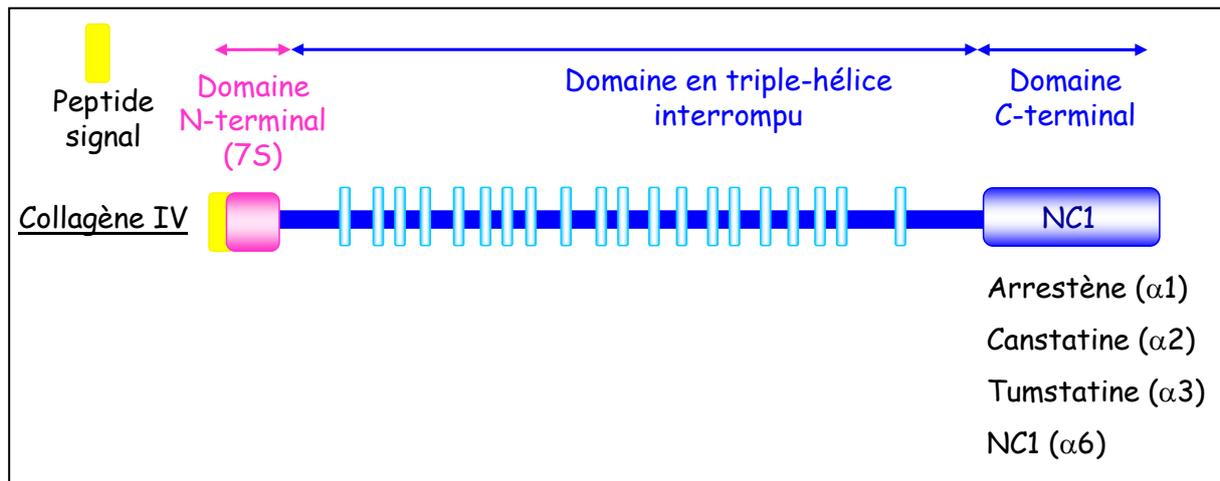


Figure 17: Les matrikines dérivées du collagène de type IV

(Adapté de Pasco et coll., 2004a)

a) La triple hélice

Différentes séquences peptidiques de la zone en triple hélice de la chaîne $\alpha 1(\text{IV})$ induisent l'adhésion, l'étalement et la migration des cellules de mélanome, en se fixant sur divers récepteurs des cellules tumorales, comme l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ ou le protéoglycane CD44 (Tableau 3) (Pasco et coll., 2004a). De même, la région en triple hélice du collagène IV, obtenue par digestion pepsique, induit l'adhésion de cellules de mélanome murin, de façon dépendante de la séquence RGD (Chelberg et coll., 1989 ; Chelberg et coll., 1990). L'induction de ces propriétés invasives par le domaine en triple hélice semble due à l'activation de la pro MMP-2, dans les cellules cancéreuses de fibrosarcome HT-1080 (Maquoi et coll., 2000).

Le fragment CB3, obtenu par action du bromure de cyanogène sur la triple hélice du collagène IV, exerce des effets biologiques similaires et interagit avec les cellules endothéliales via les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (Vandenberg et coll., 1991).

<u>Séquences</u>	<u>Effets biologiques</u>	<u>Récepteurs cellulaires</u>
$\alpha 1(\text{IV})$ 1263-1277	Adhésion des cellules de mélanome, étalement et migration	CD44
$\alpha 1(\text{IV})$ 531-543	Adhésion des cellules de mélanome	$\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$
$\alpha 1(\text{IV})$ CB3	Adhésion des cellules de mélanome et de fibrosarcome	$\alpha 3\beta 1$

Tableau 3: Les matrikines dérivées du domaine en triple hélice du collagène IV

(Adapté de Pasco et coll., 2004a)

b) Arrestène

L'arrestène est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse de 26 kDa, issu du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 1$ du collagène IV (Colorado et coll., 2000 ; Pasco et coll., 2005). *In vitro*, cette molécule inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi que la formation de pseudotubes sur Matrigel®. En revanche, elle semble n'exercer aucun effet sur les cellules tumorales. *In vivo*, elle inhibe l'angiogenèse, la formation de métastases pulmonaires et la croissance tumorale de carcinomes rénaux (Colorado et coll., 2000).

L'utilisation de souris invalidées pour l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ a permis de démontrer que tous ces effets étaient médiés par l'interaction de l'arrestène avec cette intégrine (Sudhakar et coll., 2005).

c) Canstatine

Le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 2(\text{IV})$, appelé canstatine, est un fragment de 24 kD présentant des propriétés anti-angiogéniques. La canstatine recombinante inhibe la prolifération, la migration des cellules endothéliales et la formation de pseudotubes *in vitro* (Kamphaus et coll., 2000). Elle induit également l'apoptose des cellules endothéliales en exerçant une régulation négative au niveau de la protéine anti-apoptotique Flip (He et coll., 2003 ; Panka et coll., 2003). Ces propriétés anti-angiogéniques résident dans deux séquences N et C-terminales ; la séquence N-terminale est plus particulièrement responsable de l'induction de l'apoptose (He et coll., 2003 ; He et coll., 2004).

In vivo, la canstatine inhibe la croissance tumorale dans des modèles de mélanome et de fibrosarcome. Cette inhibition de croissance tumorale est imputable au potentiel anti-angiogénique de la molécule, puisque la canstatine n'exerce aucune activité sur les cellules

tumorales (Petitclerc et coll., 2000). Les mêmes effets sont observés dans des modèles de cancer du sein chez la souris nude (He et coll., 2003 ; He et coll., 2004). L'ensemble de ces effets semble médié par l'interaction de la canstatine avec les intégrines $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$ (Petitclerc et coll., 2000 ; Roth et coll., 2005). Plus récemment, il a été démontré que la canstatine, délivrée par adénovirus, est également capable d'inhiber les cellules tumorales (Magnon et coll., 2005).

d) Tumstatine

La tumstatine est un peptide de 28 kDa, issu de la protéolyse du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV. *In vivo*, elle est libérée par clivage du domaine NC1[$\alpha 3$ (IV)] par la MMP-9, ce qui a été démontré grâce à l'utilisation de souris déficientes en pro MMP-9. Ce peptide est également généré par les MMP-2, -3 et -13, mais de manière moins efficace. Les concentrations physiologiques de tumstatine circulante sont de l'ordre de 300 à 350 ng/mL, chez la souris (Hamano et coll., 2003).

Cette matrikine exerce à la fois des activités anti-angiogénique et anti-tumorale par deux régions distinctes, que sont respectivement la séquence 54-132, encore appelée tum-5, et la séquence 185-203 (Hamano et Kalluri, 2005).

❖ Activité anti-angiogénique

Par des expériences de mutation et de délétion, le fragment correspondant à la séquence 54-132 de la tumstatine a été identifié comme responsable de l'activité anti-angiogénique de la molécule, et a été appelée tum-5 (Maeshima et coll., 2001a ; Maeshima et coll., 2001b). Ce fragment inhibe la prolifération des cellules endothéliales par blocage du cycle cellulaire en phase G1, et induit leur apoptose, en stimulant l'activité caspase-3 (Maeshima et coll., 2000a ; Maeshima et coll., 2001a). En revanche, aucun effet n'est observé sur la prolifération des cellules tumorales (Maeshima et coll., 2000b).

Tum-5 est capable d'inhiber l'angiogenèse à la fois *in vitro*, dans un modèle de formation de pseudotubes sur Matrigel®, et *in vivo*, dans un modèle d'éponges de Matrigel® (Maeshima et coll., 2001b). Chez la souris nude, l'administration de ce peptide entraîne un ralentissement considérable de la croissance tumorale, corrélé à la diminution du nombre de vaisseaux présents dans la tumeur. L'apoptose des cellules endothéliales est également

observée *in vivo*, sur des coupes de tumeurs provenant de souris ayant reçu le même type de traitement, (Maeshima et coll., 2000a). Ces effets sont médiés par l'interaction de tum-5 avec l'intégrine $\alpha v \beta 3$, indépendamment de la séquence RGD (Sudhakar et coll., 2003).

L'activité anti-angiogénique de tum-5 est plus importante que l'activité de la molécule dans son intégralité.

Une activité anti-angiogénique a également été décrite pour les séquences 185-203 et 179-208 de la chaîne $\alpha 3(IV)$, toutes deux désignées par le terme d'oncothanine. Ces molécules inhibent effectivement la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro* (Shahan et coll., 2004).

❖ Activité anti-tumorale

La séquence 185-203 du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(IV)$ est capable d'empêcher l'activation des polynucléaires neutrophiles. Cette propriété requiert la présence du triplet SNS au niveau des résidus 189-191 (Monboisse et coll., 1994 ; Fawzi et coll., 2000).

Cette séquence a été largement étudiée au sein de notre laboratoire pour son activité anti-tumorale. Elle inhibe la prolifération de diverses lignées de cellules cancéreuses, comme les cellules de mélanome, de fibrosarcome, de prostate ou de poumon, mais n'a aucun effet sur la prolifération de cellules fibroblastiques saines (Han et coll., 1997 ; Martinella-Catusse, 2001). Les propriétés invasives des cellules de mélanome, humaines et murines, sont également inhibées, via la modulation des cascades protéolytiques. En effet, l'activation de la pro MMP-2 associée à la membrane plasmique est considérablement réduite, ce qui s'explique par une nette diminution de l'expression de la MT1-MMP et de l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Cette inhibition s'exerce aussi sur le système d'activation du plasminogène, avec la diminution d'activité de l'activateur tissulaire tPA, et l'augmentation d'expression de l'inhibiteur PAI-1 (Figure 18) (Pasco et coll., 2000a ; Martinella-Catusse, 2001 ; Pasco et coll., 2003).

Cette séquence 185-203 se fixe sur les cellules de mélanome via l'intégrine $\alpha v \beta 3$, pour ensuite exercer son action anti-tumorale (Shahan et coll., 1999a ; Pasco et coll., 2000b). Plus précisément, cette interaction induit un changement de conformation de l'intégrine, entraînant l'activation et la phosphorylation précoce des protéines FAK (Focal Adhesion Kinase) et PI3-kinase, ainsi qu'une augmentation des concentrations en calcium intracellulaire et en AMP cyclique dans le cytosol (Shahan et coll., 1999b ; Pasco et coll., 2000b).

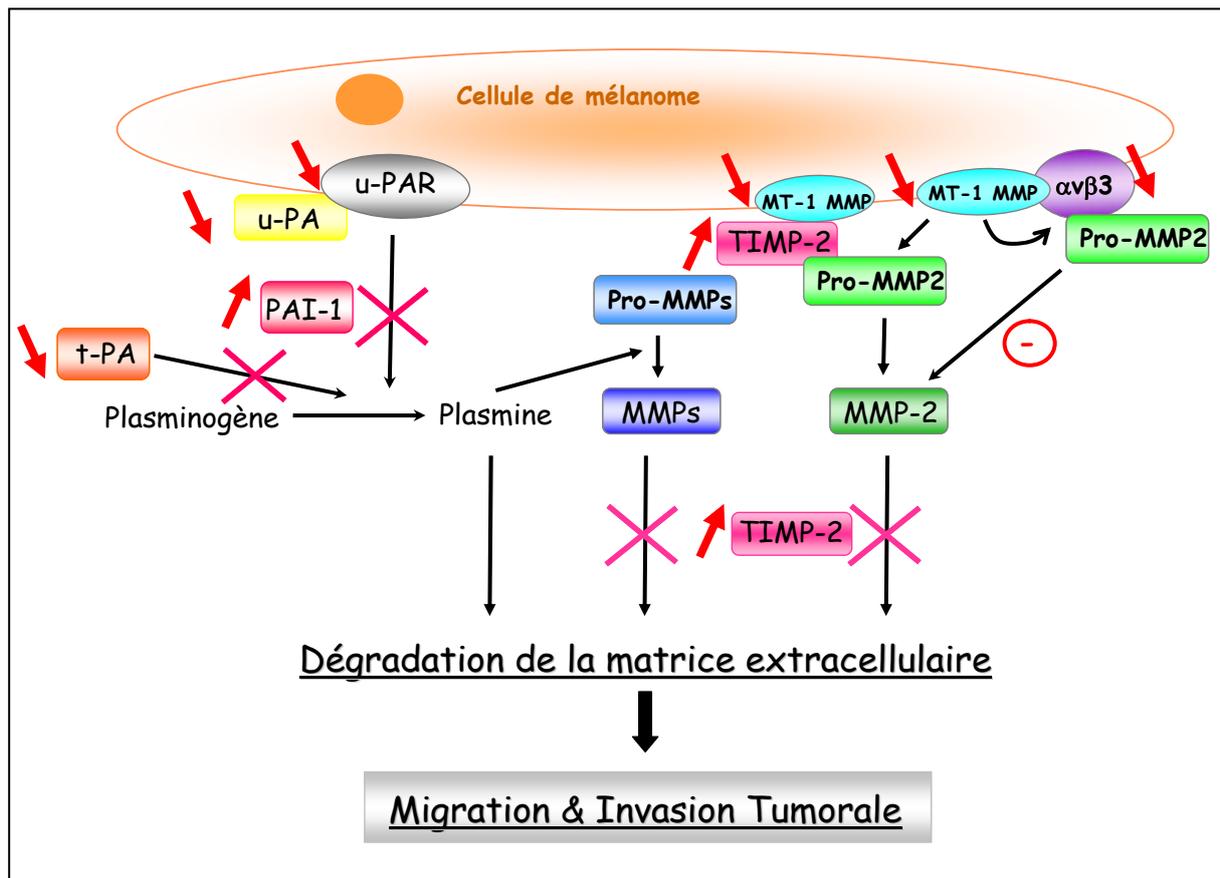


Figure 18 : Inhibition des cascades protéolytiques impliquées dans l'invasion tumorale par le peptide NC1[α3(IV)]

Les effets du peptide NC1[α3(IV)185-203] sont indiqués par les flèches rouges (Adapté de Pasco et coll., 2003)

In vivo le peptide synthétique [α3(IV)185-203] inhibe la progression tumorale du mélanome chez la souris. La surexpression de la tumstatine dans son intégralité, ou du fragment C-terminal 181-229, par des cellules de mélanome murin B16F1 injectées chez la souris, entraîne une diminution de la croissance tumorale et de la formation de métastases pulmonaires. Cette inhibition s'explique par plusieurs mécanismes. Le peptide induit une inhibition de la prolifération cellulaire, en diminuant l'expression de la cycline D1, et en bloquant le cycle cellulaire. Il agit aussi sur les cascades protéolytiques, en inhibant l'activation de la pro MMP-2 et de la MT1-MMP, ainsi que l'expression de la pro MMP-9 et de la MMP-13. Le système d'activation du plasminogène est également inhibé (Pasco et coll., 2004b).

L'inhibition de croissance tumorale exercée *in vivo* par la tumstatine, est reproduite par le peptide CNYYSNS, correspondant à la séquence 185-191 de cette molécule. Il a été

démontré que cette séquence forme un coude β , au niveau des résidus YSNS, indispensable à l'activité biologique (Figure 19) (Floquet et coll., 2004).

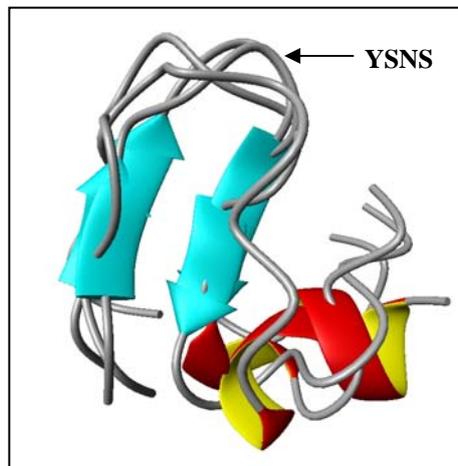


Figure 19 : Représentation structurale du peptide NC1[α 3(IV)185-203] d'après simulations Monte Carlo

Les feuillets β sont symbolisés par les flèches bleues et la conformation en hélice α par l'hélice rouge et jaune. (D'après Floquet et coll., 2004)

e) La chaîne α 6(IV)

Le domaine NC1 de la chaîne α 6(IV) n'a pas reçu de dénomination particulière, et son activité anti-angiogénique a été très peu décrite dans la littérature. Il inhibe l'angiogenèse *in vivo*, ainsi que la croissance tumorale dans un modèle de mélanome (Petitclerc et coll., 2000).

Les chaînes α 4(IV) et α 5(IV) ne semblent posséder aucune activité anti-angiogénique ou anti-tumorale (Petitclerc et coll., 2000).

CONCLUSION GENERALE

Les cascades protéolytiques mises en jeu au cours de la progression du mélanome sont des cibles privilégiées pour le contrôle de la progression tumorale. Cette inhibition peut se faire au niveau de l'expression ou de l'activation des pro-enzymes ou bien de l'activité enzymatique des protéases actives. Les inhibiteurs des MMPs ont montré leurs limites en raison de leur absence de spécificité ou de leur toxicité importante. Les matrikines, et plus particulièrement celles dérivées des domaines NC des collagènes de membrane basale, ainsi que leurs analogues structuraux, paraissent constituer des agents anti-cancéreux potentiels.

C- Matériel & Méthodes

I. MATERIEL & REACTIFS

L'ensemble du matériel et des réactifs utilisés lors des différentes expériences ainsi que leur provenance est répertorié dans les tableaux ci-dessous (liste alphabétique).

<u>Matériel</u>	<u>Utilisation</u>	<u>Fournisseurs</u>
Appareil d'analyse d'images	Acquisition d'images	Vilber Lourmat
Appareil photo	Acquisition d'images	Canon
Aiguilles	Injections souris	Sherwood
Capillaires LightCycler® (20 µl)	PCR en temps réel	Roche
Cellulose DE52 - papier absorbant	Transfert	Whatman
Centrifugeuse	Centrifugation	Eppendorf
Centrifugeuse	Centrifugation	Beckman
Chambre de Boyden modifiée - ThinCert®	Culture cellulaire	Greiner Bio-one
Cliniporateur	Electroporation	Inst. G. Roussy
Colonnes Nanosep® 10 K	Culture cellulaire	PALL
Cuve Mighty Small SE 250	Electrophorèse	Hoeffler
Filtres à usage unique 0,2 µm	Filtration	D. Dutscher
Hémacytomètre de Neubauer	Comptage de cellules	D. Dutscher
Hotte à flux laminaire MS12	Culture cellulaire	Jouan
Hyperfilm ECL	Révélotion photographique	Amersham
Incubateur	Culture cellulaire	Jouan
Lamelles de verre rondes - 12 mm diamètre	Culture cellulaire	CML
Lames de verre ®- Superfrost	Culture cellulaire	CML
Lecteur de microplaques Multiskan Plus	Spectrophotométrie	Titertek
Logiciel d'analyse densitométrique Bioprofil	Traitement des données	Vilber Lourmat
Logiciel d'analyse densitométrique ImageJ	Traitement des données	Wayne Rasband
Logiciel d'analyse RelQuant	Traitement des données	Roche
Membrane Immobilon-PTM	Transfert humide	Millipore
Microscope inversé à fluorescence	Microscopie	Zeiss
Microscope confocal	Microscopie	Leica
Milieu de montage Vectastain®	Microscopie	Abcys
pH-mètre	Préparation de solutions	Radiometer

Plaques de cultures Nunclon delta	Culture cellulaire	D. Dutscher
Plaques Nunc-Immuno™	Culture cellulaire - ELISA	D. Dutscher
Spectrophotomètre		Beckman
Thermocycleur	PCR semi-quantitative	Eppendorf
Thermocycleur LightCycler®	PCR temps réel	Roche
Transblot	Transfert humide	Biorad
Transblot	Transfert semi-sec	Biorad

<u>Réactifs</u>	<u>Fournisseurs</u>
Acétone	Prolabo
Acide acétique	Prolabo
Acide chlorhydrique	Prolabo
Acrylamide	Euromedex
Agarose	Euromedex
Amorces PCR	MWG-Biotech
Anesthésiques souris (Kétamine, Romprun)	Centravet
AC anti- α v β 3	Chemicon
AC anti- α 3(IV)	Covalab
AC anti-actine	BD Biosciences
AC anti- β 1	Chemicon
AC anti-CD31 (PECAM-1)	BD Biosciences
AC anti-Flag monoclonal	Sigma-Aldrich
AC anti-MT1-MMP	Chemicon
AC anti-MT1-MMP	Santa Cruz Biotechnology
AC anti-PAI-1	American Diagnostica
AC anti-PARP-1	Calbiochem
AC anti-phospho-pRb	Calbiochem
AC anti-phospho-p125 ^{FAK}	Santa Cruz Biotechnology
AC anti-p21 ^{WAF-1}	Calbiochem
AC anti-uPAR	Santa Cruz Biotechnology
AC anti-TIMP-3	Chemicon
AC anti-VEGF	Santa Cruz Biotechnology
AC monoclonal anti-IgG de chèvre/mouton lié à la peroxydase	Sigma-Aldrich
AC monoclonal anti-IgG de lapin lié à la peroxydase	Amersham

AC monoclonal anti-IgG de souris lié à la peroxydase	Amersham
AC anti-IgG de rat biotinylé	Abcys
AC anti-IgG de souris Alexa 488	Molecular Probes
AC anti-IgG de lapin Alexa 488	Molecular Probes
Aprotinine	Sigma-Aldrich
APS (persulfate d'ammonium)	Euromedex
BET (bromure d'ethidium)	Euromedex
Béta-mercaptoéthanol	Sigma-Aldrich
b-FGF	R&D Systems
Bleu de Coomassie G250 et R250	Sigma-Aldrich
Bleu Trypan	Sigma-Aldrich
Biorad Protein Assay Kit	Biorad
Colorant violet cristal	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
Désoxyribonucléase I, Amplification Grade	Invitrogen
Désoxyribonucléotides triphosphates	Roche
DTT (dithiothréitol)	Merck
DMSO	Sigma-Aldrich
ECM gel (Matrigel®)	Sigma-Aldrich
EDTA (Acide éthylène-diamino-tétraacétique)	Sigma-Aldrich
EGTA (Ethylène glycol-bis(béta-aminoéthyl éther)-tétraacétate)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Prolabo
Fibronectine	BD Biosciences
Formaldéhyde 37 %	Prolabo
Galardine (GM 6001)	Calbiochem
Gélatine	Sigma-Aldrich
Généticine (G-418)	Invitrogen
Glycérol	Sigma-Aldrich
Glycine	Euromedex
Glutaraldéhyde	Sigma-Aldrich
HEPES	Euromedex
Hexanucléotides	Invitrogen
Hoechst 33342	Invitrogen
Isopropanol	Prolabo
KCl	Merck

Kit ECL de détection par chimioluminescence	Amersham
Kit Biotrak ELISA – activité TIMP-2	Amersham
Lait écrémé non délipidé Blotto	Santa Cruz Biotechnology
Méthanol	Prolabo
MgCl ₂	Merck
Milieux de culture cellules tumorales : McCoy 5A, DMEM 4,5 g glucose, RPMI 1640	Invitrogen
Milieux de culture cellules endothéliales	Promocell
NaCl	Euromedex
NaOH	Prolabo
Na ₃ VO ₄ (orthovanadate de sodium)	Sigma-Aldrich
NEM (N-Ethyl-Maléimide)	Sigma-Aldrich
Nonidet NP40	Euromedex
Phalloïdine couplé à l'Alexa fluor 568	Invitrogen
Plasmide p3XFlag-CMV™-9 (vecteur d'expression)	Sigma-Aldrich
Plasmide pVAX1	Invitrogen
Plasminogène	Calbiochem
PMSF (Phenylméthylsulfonylfluorure)	Sigma- Aldrich
Pro MMP-2 (activité spécifique > 600 mU/mg)	Calbiochem
Pro MMP-9 (activité spécifique > 1000 mU/mg)	Calbiochem
Réactif de Bradford	Biorad
Réactif WST-1	Roche
RNasine	Proméga
S-2251 (substrat de la plasmine)	Chromogénix
SAB (sérum albumine bovine)	Euromedex
SAB (sérum albumine bovine) fraction V purifiée	Sigma-Aldrich
SDS (Sodium Dodécyl sulfate)	Euromedex
Sérum de veau foetal	Invitrogen
Solution de révélation de l'activité peroxydase	PAA
Souris C57/Bl6	Harlan
Standard de masse moléculaire d'ADN	Sigma- Aldrich
Standard de masse moléculaire de protéines	Invitrogen
SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) Sample	Takara Bio Inc.
Taq Polymérase (de <i>Thermus aquaticus</i> YT1)	Invitrogen
TEMED (tétraméthyl-éthylène-diamine)	Sigma- Aldrich

Transcriptase inverse	Invitrogen
Tri-reagent	Euromedex
Tris (tris-(hydroxyméthyl))-aminométhane	Euromedex
Triton X-100	Sigma- Aldrich
Triton X-114	Sigma- Aldrich
Trypsine	Invitrogen
Trypsine-EDTA	Invitrogen
Tween-20	Sigma- Aldrich
VEGF recombinant humain	R&D Systems
W-1	Invitrogen

II. METHODES

II. 1. CULTURE CELLULAIRE

II.1.1. Souches cellulaires utilisées

Cellules UACC-903 : cellules de mélanome humain, hautement métastatiques, adhérentes

(Dr. J. Trent, Phoenix, Arizona)

Cellules B16F1 : cellules de mélanome murin, faiblement métastatiques, adhérentes

(Dr M. Grégoire, INSERM U419, Nantes, France)

Cellules HUVEC : cellules endothéliales humaines de veine ombilicale, adhérentes

(Promocell, France)

Cellules HMEC-1 : cellules endothéliales humaines de microvasculature dermique,

adhérentes (ADES, Atlanta)

Les cellules endothéliales sont utilisées entre le deuxième et le cinquième passage lors des différentes expérimentations.

II.1.2. Culture de cellules tumorales

Les cellules sont conservées congelées dans de l'azote liquide (-196°C) dans le milieu de culture correspondant, contenant 20 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) et 10 % (v/v)

de glycérol. Après décongélation rapide par passage 1 minute à 37°C, les cellules sont mises en suspension dans 10 mL de milieu avec 20 % de SVF ; elles sont cultivées en flacons de 25 cm² à 37°C, sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. Après 24 heures, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant 10 % de SVF. Quand les cellules atteignent l'état de confluence, elles sont trypsinisées pour être réensemencées : elles subissent un "passage". Pour les flacons d'entretien, le milieu est changé 2 fois par semaine.

II.1.3. Culture de cellules endothéliales

Les cellules endothéliales HUVEC sont des cultures primaires (protéolyse de veines ombilicales humaines), elles sont donc utilisées avant le 5^{ème} passage. Elles sont conservées dans l'azote liquide dans un milieu de congélation adéquat (Promocell). La décongélation rapide est suivie de la mise en suspension des cellules dans 10 mL de milieu de croissance de cellules endothéliales (ECGM Low Serum - Promocell) additionné de 0,4 % (m/v) de ECGS (Endothelial Cell Growth Serum), 0,2 % (v/v) de SVF, 0,1 ng/mL de facteur de croissance épidermique (EGF), 1 ng/mL bFGF, 1 µg/mL d'hydrocortisone, 50 ng/mL d'amphotéricine B et 50 µg/mL de gentamicine. Après 24 heures, le milieu est remplacé par du milieu frais. Quand les cellules atteignent l'état de confluence, les cellules sont trypsinisées pour être réensemencées.

Les cellules HMEC-1 sont immortalisées par transfection avec un plasmide PBR-322 contenant la région codant le produit du gène A du virus SV40 et l'antigène T, elles constituent donc une lignée. Elles sont cultivées dans du milieu de croissance de cellules endothéliales (Endothelial Cell Basal Medium MV – Promocell) additionné de 0,4 % (m/v) de ECGS/H (Endothelial Growth Serum / Heparin), 5 % (v/v) de SVF, 10 ng/mL d'EGF, 1 µg/mL d'hydrocortisone, 50 ng/mL d'amphotéricine B et 50 µg/mL de gentamicine, de la même manière que les cellules HUVEC.

II.2. PEPTIDES UTILISES

Le peptide $\alpha 3(\text{IV})185\text{-}203$ (CNYYSNSYSFWLASLNPER) est synthétisé par la société Ansynth Service BV (Pays-Bas) ; le peptide $\alpha 3(\text{IV})185\text{-}191$ (CNYYSNS), appelé L7, est synthétisé et purifié dans l'unité CNRS FRE 2715 (UFR Pharmacie, Reims) sous la responsabilité du Professeur J. Sapi. La synthèse est effectuée sur support solide par stratégie

Fmoc en flux continu. Ils sont solubilisés dans du DMSO et dilués dans le milieu aux concentrations voulues. La concentration finale en DMSO n'excède pas 0,1 %.

Le cyclopentapeptide, de séquence YSNSG (peptide C5), est solubilisé directement dans le milieu de culture à la concentration requise. Il est synthétisé par la société Ansynth Service B.V.

Le peptide $\alpha 1$ (XIX) de séquence NPEDCLYPVSHAHQRTGGN, et le peptide scrambled correspondant (AGNEQPNYHSDPGTHLCRV) sont également synthétisés et purifiés dans l'unité CNRS FRE 2715 (UFR Pharmacie, Reims), comme décrit précédemment. Ils sont solubles dans le milieu.

Tous les peptides sont purifiés par HPLC avec un gradient d'acétonitrile / eau, puis lyophilisés. La pureté des peptides est vérifiée par spectroscopie de masse en électrospray.

II. 3. CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES

II.3.1. Plasmides utilisés

Le plasmide p3XFlag-CMVTM-9 (Figure 20 A) est un vecteur d'expression de 6400 paires de bases qui permet l'expression de protéines de fusion 3XFlag N-terminal dans les cellules de mammifères. Le vecteur code trois épitopes FLAG adjacents (Asp-Tyr-Lys-Xaa-Xaa-Asp) en amont du site de multi-clonage (MCS), ce qui entraîne une augmentation de la sensibilité de détection lors de l'utilisation de l'anticorps Anti-Flag.

Les bactéries transformées par ce plasmide sont sélectionnées grâce au gène de résistance à l'ampicilline (amp^r). Le gène neo^r confère au plasmide la résistance aux aminoglycosides comme la généticine (G-418) qui sera utilisée pour la sélection des cellules positives à la transfection.

Le plasmide pVAX1 (Figure 20 B) est un vecteur de 3000 paires de bases, utilisé dans le cadre des vaccins à ADN. Il contient le gène de résistance à la kanamycine, ce qui permet la sélection des bactéries transformées par ce plasmide (Figure 20 B).

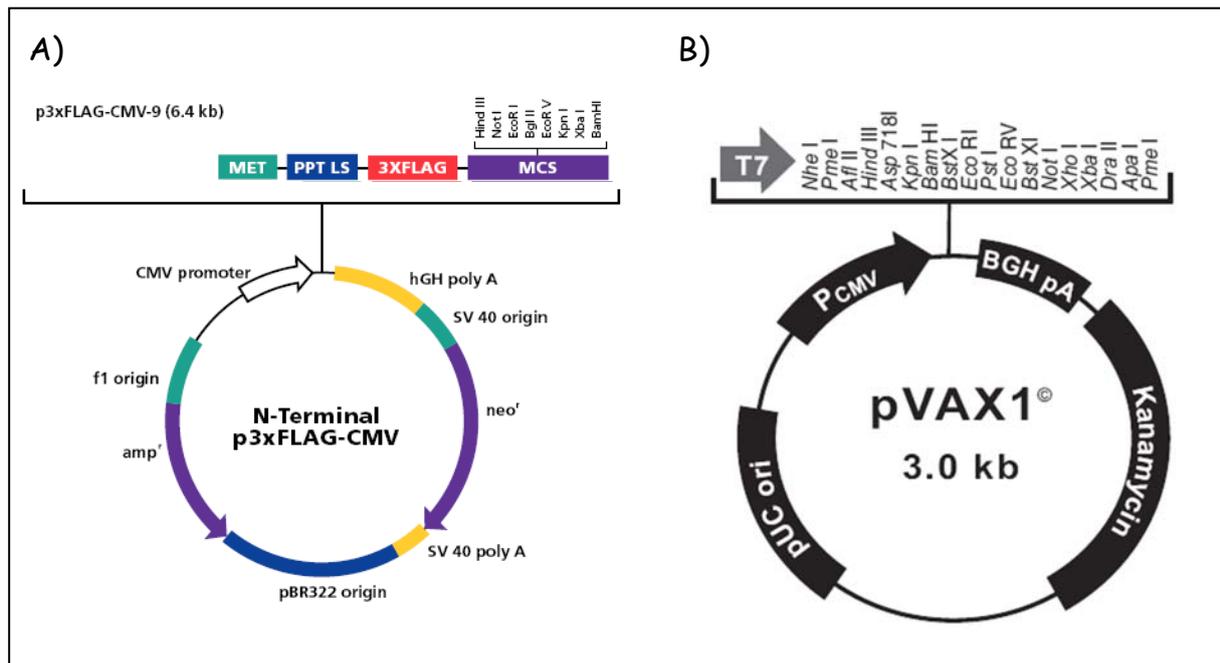


Figure 20 : Cartes des plasmides p3XFlag-CMVTM-9 et pVAX1

II.3.2. Constructions plasmidiques

Les ADNc humains des domaines NC1[α 3(IV)1-229], NC1[α 3(IV)181-229], NC1[α 4(IV)1-229], NC1[α 4(IV)181-229], NC1[α 5(IV)1-229], NC1[α 5(IV)181-229] sont insérés dans le plasmide p3XFlag-CMVTM-9 (Figure 21), entre les sites de restriction adéquats. Les ADNc murins correspondants sont insérés dans le plasmide pVAX1 (Figure 21). Dans chaque expérience, le plasmide vide correspondant servira de témoin.

Les bactéries α DH5 sont alors transformées par ces constructions. Après sélection des colonies bactériennes positives (résistantes à l'ampicilline ou à la kanamycine), celles-ci sont amplifiées et l'ADN plasmidique est purifié. La présence des inserts est vérifiée par digestion enzymatique. Le cadre de lecture de l'insert est vérifié par séquençage (Genome Express, Meylan, France).

Les différentes constructions plasmidiques ont été réalisées au sein du laboratoire, par le Docteur Sylvie Brassart-Pasco.

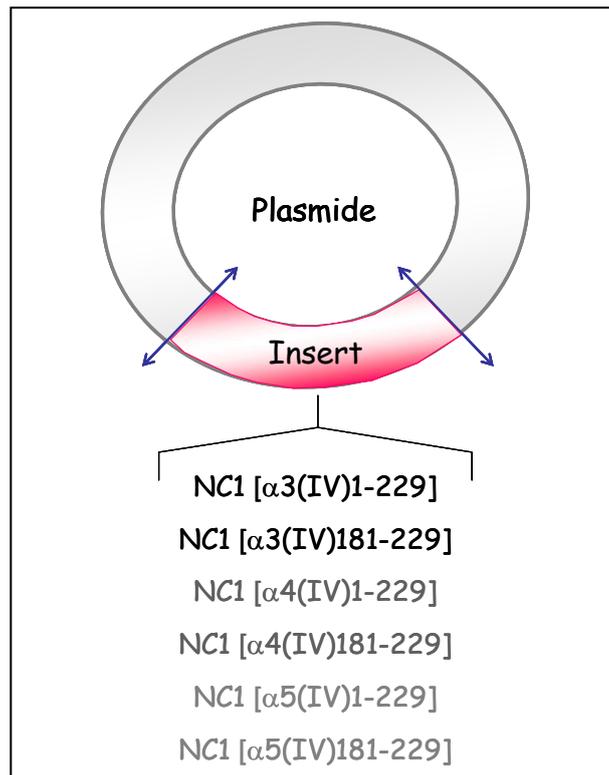


Figure 21 : Schéma des constructions plasmidiques

II. 4. TRANSFECTION STABLE DE CELLULES DE MELANOME HUMAIN

II.4.1. Mise au point : transfection transitoire

Pour permettre de déterminer les quantités optimales d'ADN et de lipofectamine pour la transfection, nous avons réalisé des transfusions transitoires avec un plasmide contenant l'ADNc codant le gène de la GFP, en testant différents rapports ADN/lipofectamine. Les cellules positives à la transfection sont fluorescentes sous UV. Ainsi un taux optimal d'efficacité de transfection de 40 % a été obtenu avec 5 μ g d'ADN dans 400 μ L de milieu et une quantité de lipofectamine de 10 μ L dans le même volume de milieu. Ces conditions seront retenues pour la suite des expériences.

II.4.2. Transfection stable de cellules de mélanome humain

La technique utilisée est celle de la lipofection. Elle a été optimisée pour les cellules UACC-903 et s'est révélée efficace. Le réactif utilisé est la Lipofectamine™ 2000. 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.

La formation des complexes ADN-lipofectamine se déroule de la manière suivante : en plaques 6 puits (5.10^5 cellules/puits), 400 μ L de DMEM sont ajoutés à 10 μ L de lipofectamine™ 2000 et le même volume de DMEM est ajouté à 5 μ g de plasmide (constructions plasmidiques p3XFlag-CMV™-9 décrites au chapitre II.3.2). Après incubation pendant 4 min 30 à température ambiante, les tubes d'ADN et de lipofectamine sont mélangés. Après 20 min d'incubation, les complexes ADN-lipofectamine formés sont placés sur les cellules à un taux de confluence d'environ 70 %. Après 6 heures d'incubation, 2,5 mL de DMEM contenant 12,5 % de SVF sont ajoutés sur les cellules UACC-903. Après 16 heures, les cellules sont trypsinisées et réensemencées dans des boîtes de Pétri 100 mm dans 10 mL de milieu contenant 10 % de SVF.

II.4.3. Sélection des clones positifs

48 heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu contenant 10 % de SVF et 700 μ g/mL de G-418 (généticine). Le G-418 permet la sélection des cellules ayant intégré le plasmide qui contient le gène néo^r. Après 15 jours de traitement, les cellules non transfectées, sensibles à cet antibiotique, sont toutes mortes et seules les cellules ayant intégré le plasmide persistent. Les clones sont alors trypsinisés individuellement à l'aide d'un cylindre de clonage et réensemencés en plaques 96 puits.

II.5. ETUDE DE VIABILITE CELLULAIRE – TEST AU BLEU TRYPAN

Le test d'exclusion au bleu trypan est basé sur la capacité des cellules vivantes à exclure les colorants de haute masse moléculaire, ainsi les cellules mortes sont colorées spécifiquement. Les suspensions cellulaires sont incubées en présence d'un quart de volume de bleu trypan 0,4 % (m/v). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, le

nombre de cellules colorées ou non est estimé par comptage à l'aide d'un hémacytomètre de Neubauer, ce qui permet de calculer le pourcentage de cellules viables.

II. 6. ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE

II.6.1. Test WST-1

La prolifération cellulaire a été déterminée en utilisant le réactif WST-1 selon les instructions du fabricant (Roche). Ce réactif contient un sel de tétrazolium qui est réduit par les oxydo-réductases mitochondriales et permet ainsi d'évaluer la viabilité des cellules. Sa réduction donne naissance à un dérivé formazan soluble, de coloration jaune (Figure 22).

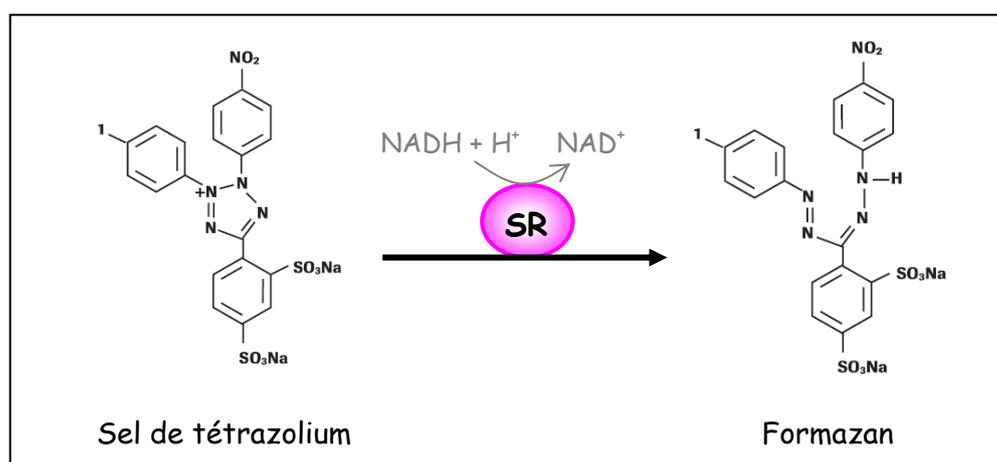


Figure 22 : Principe du test WST-1

Clivage du sel de tétrazolium WST-1 (4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène disulfonate) en formazan. (SR = système mitochondrial tétrazolium-succinate réductase).

Les cellules, ensemencées la veille en plaque 24 puits à raison de $2 \cdot 10^4$ cellules par puits, sont rincées deux fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (phosphate buffered saline ; PBS) et incubées 24, 48, 72 et 96 heures dans 1 mL de milieu adéquat additionné de 2 % de SVF, en présence ou en absence d'effecteur. A la fin de la période d'incubation, 50 μ L de WST-1 sont ajoutés au milieu. Après 20 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Cette mesure est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans le puits.

II.6.2. Coloration des noyaux au violet cristal

A la fin de la période d'incubation, les cellules sont rincées avec de la PBS, fixées par addition de 1 mL de glutaraldéhyde 1,1 % (v/v) dans la solution de PBS pendant 20 minutes puis abondamment rincées à l'eau distillée. Les noyaux des cellules sont alors colorés par addition de 1 mL d'une solution de violet cristal 0,1 % (m/v) en tampon HEPES 0,2 M pH 6,0 (Kueng et coll., 1989) durant 20 minutes. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages en eau distillée et les plaques sont séchées à l'air. Après addition de 1 mL d'acide acétique 10 % (v/v) qui solubilise le colorant, l'absorbance de la solution est lue à l'aide d'un lecteur de microplaques à la longueur d'onde de 560 nm.

II. 7. ETUDE DE L'ADHESION CELLULAIRE

Cent μL de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 contenant les peptides sont ajoutés dans une plaque 96 puits (plaques polystyrène non traitées pour la culture cellulaire), à raison de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Après 16 heures d'incubation à température ambiante, la solution est enlevée et les puits sont rincés 3 fois avec une solution de PBS.

Pour les essais d'adhésion cellulaire, les cellules à 80 % de confluence sont détachées avec une solution de PBS contenant de l'EDTA 5 mM, puis une solution de CaCl_2 10 mM est ajoutée pour neutraliser l'effet de l'EDTA. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée (300 g - 5 minutes - 22°C) et le culot est repris dans le milieu correspondant additionné de 1 % de SVF à raison de 3.10^5 cellules/mL.

Les cellules sontensemencées dans les puits à raison de 3.10^4 cellules par puits dans 100 μL de milieu minimum, en présence ou en absence des peptides synthétiques. Après deux heures d'adhésion, les cellules n'ayant pas adhéré sont éliminées par deux lavages successifs de solution de PBS. Les cellules adhérentes sont fixées par 100 μL de glutaraldéhyde 1,1 % (v/v) dans de la PBS pendant 20 minutes, puis abondamment rincées à l'eau distillée. Les noyaux des cellules sont alors colorés par addition de 100 μL d'une solution de violet cristal 0,1 % (m/v), comme décrit pour la prolifération cellulaire (II.6.2).

II. 8. ETUDE DE L'INVASION CELLULAIRE

Ces études sont réalisées dans des chambres de Boyden modifiées (ThinCert®, diamètre intérieur de 8,36 mm, pore de 8 µm). Les membranes PET (PolyEthylene Terephthalate) sont tapissées de 10 µg de Matrigel® extrait de la tumeur d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de souris, riche en protéines de la matrice extracellulaire. Il est essentiellement constitué de laminine, de collagène IV, de protéoglycannes à héparanne sulfate et d'entactine et permet de reconstituer une pseudo-membrane basale. Le Matrigel® est dilué à la concentration de 50 µg/mL dans une solution de PBS, puis solubilisé une nuit à 4°C. 200 µL de cette solution sont déposés sur chaque membrane, les cupules sont ensuite séchées 24 heures, puis réhydratées par 100 µL de milieu.

Les cellules sontensemencées dans le compartiment supérieur à raison de 5.10^4 cellules par cupule dans 200 µl de milieu contenant 0,2 % de SAB (m/v), en présence ou non de l'effecteur. 800 µL de milieu contenant 2 % de SAB (m/v) et 10 % de SVF (v/v) sont ajoutés dans le compartiment inférieur, le gradient de SAB et de SVF entre les deux compartiments jouant le rôle de chimioattractant pour les cellules (Figure 23).

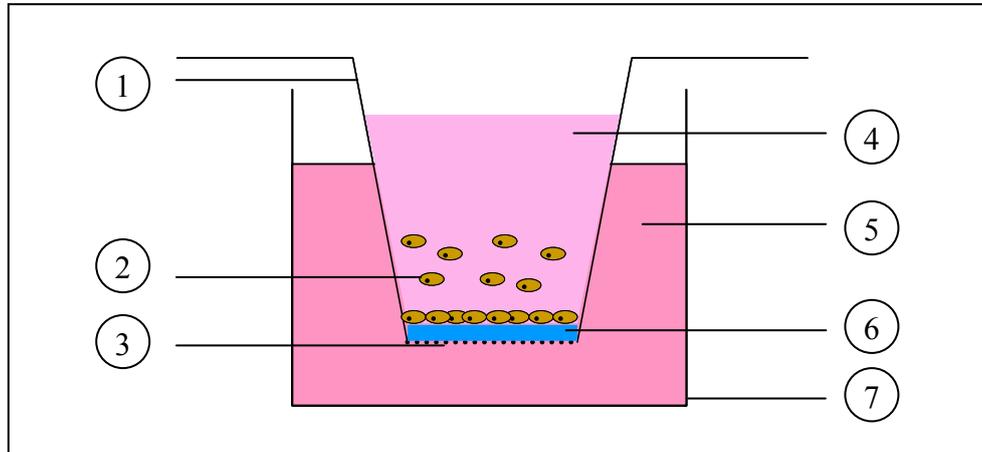


Figure 23 : Schéma d'une chambre de Boyden modifiée

1 : cupule, 2 : cellules tumorales, 3 : membrane de polyéthylène téréphthalate, 4 : milieu additionné de 0,2 % de BSA contenant ou non l'effecteur, 5 : milieu additionné de 2 % de BSA et de 10 % de SVF, 6 : tapis de matrigel, 7 : puits.

Après 48 heures d'incubation à 37°C en présence de 5 % de CO₂, les cellules sont rincées deux fois par de la PBS, fixées au méthanol pendant 20 minutes, puis rincées abondamment à l'eau distillée. Elles sont ensuite colorées au violet cristal pendant 20 minutes, comme décrit pour la mesure de la prolifération cellulaire (II.6.2). Les cellules de la

face supérieure, qui n'ont pas traversé la membrane, sont éliminées par grattage à l'aide d'un coton tige. Les cellules restant sur la face inférieure des membranes sont comptées en utilisant un microscope inversé (Pasco et coll., 2000). Les cellules comptées correspondent aux cellules qui ont traversé le tapis de Matrigel®, puis la membrane poreuse de la chambre de Boyden ; elles sont donc le reflet des capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales au travers d'une matrice extracellulaire ou d'une membrane basale, ici reproduite par le Matrigel®. En parallèle, les membranes sont découpées au scalpel puis la coloration des noyaux est extraite par de l'acide acétique 10 %, l'absorbance est mesurée à 560 nm.

II. 9. ETUDE DE L'EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE

II.9.1. Formation de pseudotubes sur Matrigel®

Les cellules endothéliales, cultivées sur un gel de Matrigel® équivalent à une membrane basale, forment spontanément des structures en pseudotubes (Vailhe B., 2001). Ces structures sont comparables à des vaisseaux sanguins mais non fonctionnels. Cette propriété est utilisée pour étudier les phénomènes de formation de néo-vaisseaux ou angiogenèse.

Une solution de Matrigel® (ECM gel : 10 mg/mL) est déposée stérilement dans des plaques 24 puits, à raison de 250 µL par puits, sur de la glace pilée. La polymérisation du gel est obtenue par incubation de la plaque à 37°C pendant 30 minutes. Des cellules HUVEC (1.10^5), ou des cellules HMEC-1 (5.10^4), sont ensuite déposées à la surface du gel et incubées dans le milieu ECGM additionné de 1 % de SVF, 0,4 % (m/v) de ECGS, 1 µg/mL d'hydrocortisone (milieu EGGM minimum qui permet la survie mais pas la prolifération cellulaire) et stimulées par 30 ng/mL de bFGF ou de VEGF, en présence ou en absence des peptides synthétiques. La formation de pseudotubes est observée sous microscope et photographiée après 24 ou 48 heures d'incubation. La quantification est réalisée avec le logiciel d'analyse d'images (ImageJ).

II.9.2. Technique de blessure cicatricielle

1.10^5 cellules sont ensemencées en plaques 24 puits et incubées 24 heures dans le milieu ECGM complet pour former un tapis cellulaire homogène. Une blessure est alors

réalisée dans la couche cellulaire, au centre du puits, à l'aide d'une pointe de cône de pipette. Les cellules sont rincées avec de la PBS pour éliminer les débris cellulaires, puis incubées dans du milieu minimum, en présence ou non de 30 ng/mL de bFGF ou de VEGF, en présence ou non d'effecteurs. La fermeture de la blessure, témoignant des propriétés migratoires des cellules, est observée en microscopie et photographiée après 48 heures d'incubation.

II. 10. COLORATION CYTOCHIMIQUE AU HOECHST-33342

Le Hoechst-33342 est un fluorochrome utilisé pour le marquage de l'ADN, des chromosomes et des noyaux. Les membranes sont perméables à ce fluorochrome faiblement cytotoxique qui s'intercale entre les bases de l'ADN, ce qui permet d'obtenir un marquage fluorescent de l'ADN. Cette fluorescence des noyaux permet notamment de mettre en évidence les phénomènes d'apoptose en observant l'aspect de la chromatine.

Les cellules sont cultivées en plaques 24 puits, en présence ou non de l'effecteur. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont rincées deux fois avec une solution de PBS. A cette étape, on ajoute sur les cellules du Hoechst-33342 (50 µg/mL) dilué dans de la PBS. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, 5 % de CO₂, les noyaux des cellules sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence (λ excitation = 346 nm ; λ émission = 460 nm), puis photographiés.

II.11. TECHNIQUE DE RT-PCR

II.11.1. Extraction des ARN totaux

a) Protocole expérimental

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987) utilisant le réactif d'extraction Tri Reagent™.

Les cellules sont rincées trois fois par de la PBS. Des volumes de 1 mL de solution dénaturante sont ajoutés dans chaque flacon de 75 cm². Cette solution, contenant de l'

isothiocyanate de guanidinium et du phénol, permet la dénaturation des acides nucléiques, la dissociation des protéines qui leur sont associées et possède également une activité inhibitrice sur les ribonucléases endogènes. L'extrait cellulaire est obtenu par grattage de la couche cellulaire et transféré dans un tube en polypropylène. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 200 μ L de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités énergiquement, incubés durant 10 minutes à température ambiante et centrifugés (12000 g – 10 min - 4°C). Le chloroforme permet d'obtenir une dissociation entre les phases aqueuse et phénolique ; cette étape permet la séparation des acides nucléiques par solubilisation différentielle. La phase aqueuse, contenant les ARN, est prélevée et précipitée par 500 μ L d'isopropanol, pendant 15 minutes à température ambiante, avant d'être centrifugée (12000 g - 10 min - 4°C). Après élimination du surnageant, le culot d'ARN est lavé par 1 mL d'éthanol 75 % (v/v), séché à l'air et dissous dans 20 μ L d'eau distillée préalablement traitée au DEPC (0,1 % v/v).

b) Analyses quantitative et qualitative des ARN

La concentration en ARN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm ; une unité d'absorbance correspondant à 40 μ g d'ARN/mL. L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 1 % (m/v) contenant 0,04 % de BET (Bromure d'Ethidium) (v/v) dans du tampon TAE (Tris Acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8), pendant 30 minutes sous une tension de 110 V. Les ARN sont alors visualisés par exposition aux UV.

c) Traitement des échantillons d'ARN à la DNase I

La désoxyribonucléase I digère les ADN simple-brin et double-brin (oligodésoxyribonucléotide contenant une extrémité 5'-phosphate). Son utilisation est recommandée pour éliminer toute trace d'ADN laissée lors de l'extraction.

1 μ L de tampon de réaction 10 X DNase I est ajouté à 1 μ g d'ARN dans un volume de 10 μ L d'eau DEPC. Après 15 minutes de digestion à température ambiante, on ajoute 1 μ L d'EDTA 25 mM et l'échantillon est chauffé à 65°C pendant 10 minutes pour stopper la réaction. L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (II.10.1.b). L'échantillon d'ARN est prêt pour la transcription inverse.

II.11.2. RT-PCR semi-quantitative

a) Principe

La RT-PCR comporte 2 étapes clés : une étape de transcription inverse (RT) qui permet de synthétiser les ADNc à partir des ARNm (Figure 24 A), et une étape d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques encadrant la région cible de ces ADNc (Figure 24 B). Cette technique permet d'étudier l'expression des gènes ainsi que leurs variations relatives, en les comparant à celles de la GAPDH, gène domestique dont l'expression est considérée comme constante.

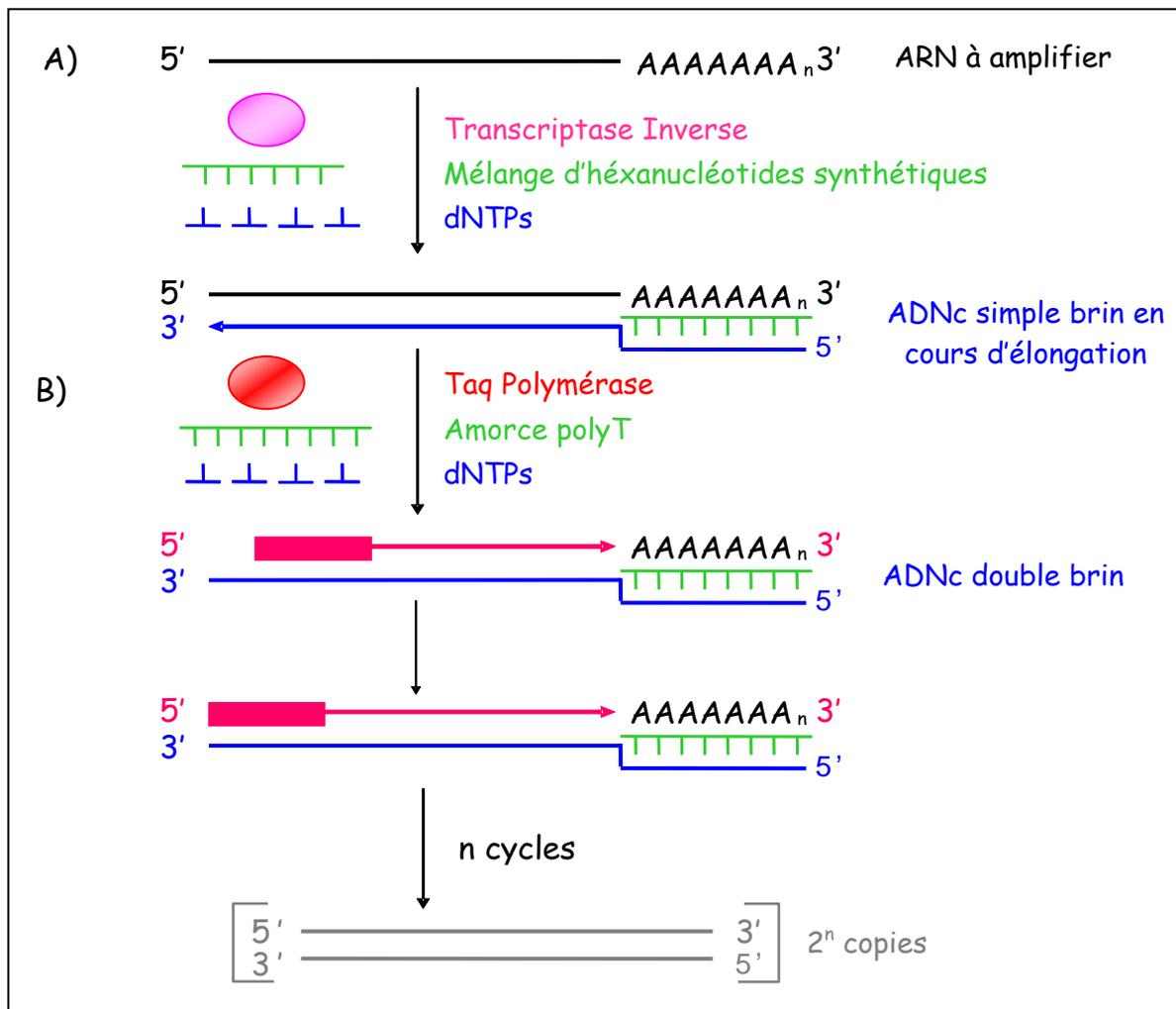


Figure 24 : Principe de la réaction de RT-PCR

A) Schéma simplifié du principe de la réaction de transcription inverse en présence d'un mélange d'hexanucléotides synthétiques. B) La synthèse du second brin d'ADNc ainsi que la PCR sont effectuées, dans un deuxième temps, par la Taq polymérase.

b) Protocole expérimental

Dans un premier temps, on réalise la transcription inverse. Pour cela, dans un tube stérile de 0,5 mL, on ajoute successivement :

- 2 μ L de tampon 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,3)
- 1 μ L d'une solution de MgCl₂ 50 mM
- 8 μ L d'un mélange contenant dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2,5 mM
- 1 μ L d'inhibiteurs de ribonucléase (RNAsine 10 U)
- 2 μ L de dithiothréitol (DTT) 0,1 M
- 1 μ L de transcriptase inverse du virus de leucémie murine de Moloney (200 U) (MMLV-RT)
- 1 μ L d'un mélange d'hexanucléotides synthétiques (random hexamers) correspondant à toutes les séquences possibles (certains s'hybrident avec l'ARNm à étudier, servant ainsi d'amorce pour la transcriptase inverse en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphate du milieu).
- 4 μ L d'une solution (1 μ g) d'ARN total extrait et dénaturé à 95°C pendant 3 minutes puis refroidi brutalement dans la glace.

Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur pour une incubation de 45 minutes à 42°C, puis placé dans la glace.

On procède ensuite à une amplification de certains ADNc en utilisant des amorces spécifiques du gène à étudier. Parallèlement, on amplifie un gène de contrôle, d'expression constante : la GAPDH. Les séquences des amorces pour le gène de la GAPDH sont les suivantes :

- amorce sens : 5' -ACC ACA GTC CAT GCC ATC A- 3'
(température de fusion : 56,7°C)
- amorce anti-sens : 5' -TCC ACC ACC CTG TTG CTG T- 3'
(température de fusion : 58,8°C)

La taille des amplicons est de 452 paires de bases.

Pour cette étape d'amplification, on ajoute successivement dans un tube stérile de 0,5 mL :

- 2,25 μ L de tampon 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,3)
- 0,75 μ L d'une solution de MgCl₂ 50 mM

- 1 μL d'un mélange contenant dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2,5 mM
- 0,2 μL de Taq Polymérase (*Thermus aquaticus* YT1) (5 U/ μL)
- 1,25 μL de DMSO
- 5 μL d'un mélange d'amorces, sens et anti-sens, à 1 μM chacune
- 2,5 μL du milieu de transcription inverse contenant les ADNc à amplifier
- 1,15 μL d'un tampon contenant 1 % (v/v) de W1 (détergent permettant d'améliorer la stabilité de la Taq polymérase)
- 10,925 μL d'eau stérile traitée au DEPC

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur pour subir les incubations suivantes :

- * Etape 1 : 2 minutes à 95°C pour dénaturer l'ADNc
- * Etape 2 : 30 secondes à 55°C pour permettre l'hybridation des amorces avec leurs séquences complémentaires au niveau des ADNc ; 30 secondes à 72°C pour permettre l'élongation des amorces grâce à l'activité ADN polymérase de la Taq polymérase ; 20 secondes à 92°C pour dénaturer les ADNc.
Cette deuxième étape est renouvelée 32 fois.
- * Etape 3 : 30 secondes à 55°C ; 10 minutes à 72°C.
Cette troisième étape a pour but d'assurer l'élongation complète des amorces.

c) Analyses quantitative et qualitative des ADN

Une aliquote de 4 μL des produits de RT-PCR est prélevée et soumise à une électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans du tampon TAE, pendant 30 minutes sous une tension de 110 V.

La quantification des produits de PCR est réalisée en mesurant la fluorescence du bromure d'éthidium à l'aide d'un analyseur d'images Vilber Lourmat fonctionnant avec le logiciel "Bioprofil". Les résultats de quantification sont rapportés à ceux obtenus pour le gène de la GAPDH.

L'identification des produits obtenus par RT-PCR est réalisée par visualisation de la fluorescence au bromure d'éthidium ($\lambda_{\text{exc}}=313 \text{ nm}$). On calcule la taille des fragments obtenus par RT-PCR grâce aux standards de masse moléculaire d'ADN de bactériophage ϕX 174 digéré par Hae III.

II.11.3. PCR temps réel

a) Principe

La réaction d'amplification de la séquence d'ADN cible suit les mêmes étapes que la PCR classique, c'est-à-dire dénaturation, hybridation, élongation (II.10.3.a)). A la différence d'une PCR classique, la PCR temps réel permet de quantifier et de caractériser l'amplicon formé en temps réel. Cette technique permet une quantification relative du gène d'intérêt par rapport à un gène de référence non régulé. Le rapport cible/référence pour chaque échantillon est alors rapporté à celui d'un calibrateur qui correspond à une solution d'acides nucléiques servant de référence et contenant les gènes cibles appropriés.

La technologie de la PCR temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un "reporter" fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons formés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il est donc possible de suivre la réaction de PCR durant sa phase exponentielle, où la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale d'ARNm.

b) Appareil Lightcycler

La PCR temps réel est réalisée grâce au LightCycler®. Il s'agit d'un thermocycleur à air pulsé qui assure une répartition plus homogène de la température d'un échantillon à un autre, l'homogénéité de la température est un critère très important conditionnant la précision et la reproductibilité des mesures effectuées. Ce LightCycler possède un carrousel piloté par un moteur pas à pas, portant 32 capillaires en verre dans lesquelles les réactions ont lieu. Les capillaires étant en verre, les transferts thermiques sont extrêmement rapides.

c) Protocole

Les ARN extraits comme décrit précédemment sont traités à la DNase et soumis à l'étape de transcription inverse. On procède ensuite à une amplification de certains ADNc en utilisant des amorces spécifiques du gène à étudier. Parallèlement, on amplifie un gène de contrôle d'expression constante : la GAPDH. Pour cette étape d'amplification, on ajoute successivement dans un capillaire en verre :

- 4 µL d'une solution contenant 1 µg d'ARN extrait
- 10 µL de SYBR GREEN (contient le fluorophore, les désoxynucléotides libres, la Taq polymérase et les tampons)
- 0,4 µL de chaque amorce, sens et anti-sens, à 10 µM chacune
- 5,2 µL d'eau DEPC

Les capillaires sont ensuite placés dans le lightcycler où ils sont soumis à 50 cycles de PCR. Chaque cycle est constitué de trois étapes : une étape de dénaturation de 10 secondes à 95°C, une étape d'hybridation des amorces de 15 secondes à 60°C et enfin une étape d'élongation de 10 secondes à 72°C. La durée de la phase d'élongation varie selon la taille des amorces utilisées (environ 1 seconde pour 25 paires de bases). A chaque cycle, à la fin de l'étape d'élongation, le capillaire passe devant le système optique et la fluorescence est mesurée. En parallèle, un calibrateur correspondant au pool des milieux RT avec différentes dilutions est mis au point. Un témoin négatif dans lequel l'ADNc est remplacé par de l'eau est également réalisé.

d) Couples d'amorces utilisés

<u>Gène étudié</u>	<u>Séquence des amorces</u> <u>(sens puis anti-sens)</u>	<u>Température de fusion</u>
GAPDH	5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3'	57,3°C
	5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3'	57,3°C
MT1-MMP	5'-CGG GTG AGG AAT AAC CAA GT-3'	57,3°C
	5'-CCA GAA GAG AGC AGC ATC AA-3'	57,3°C

II.12. ANALYSE PROTEIQUE

II.12.1. Préparation des échantillons

a) Obtention des milieux conditionnés

Les cellules sontensemencées dans des flacons de 25 cm² et incubées dans du milieu contenant 10 % de SVF. Lorsque les cellules atteignent 70 % de confluence, le milieu de culture est éliminé et les couches cellulaires sont rincées 3 fois avec une solution de PBS. Les cellules sont alors incubées dans du milieu sans sérum, en présence ou non de l'effecteur. Après 24 ou 48 heures d'incubation, les milieux de culture, appelés milieux conditionnés, sont centrifugés (800 g - 5 min) pour permettre l'élimination des débris cellulaires.

b) Concentration des échantillons

Les échantillons protéiques sont concentrés sur colonne Nanosep® 10K. Toutes les protéines dont la masse moléculaire est supérieure à 10 kDa (uPAR, PAI-1) ne traversent pas le filtre de la colonne et sont retenues dans le réservoir. Ainsi les protéines d'intérêt sont concentrées et les peptides de faible masse moléculaire ainsi que les sels minéraux sont éliminés de l'échantillon (Figure 25).

Cinq cents µL d'échantillon sont déposés dans le réservoir de la colonne Nanosep™ 10K et centrifugés à 14000 g pendant 5 minutes à 4°C. Cette étape est renouvelée 3 fois. Au final, 20 à 30 µL d'échantillon sont recueillis et soumis à un dosage protéique.

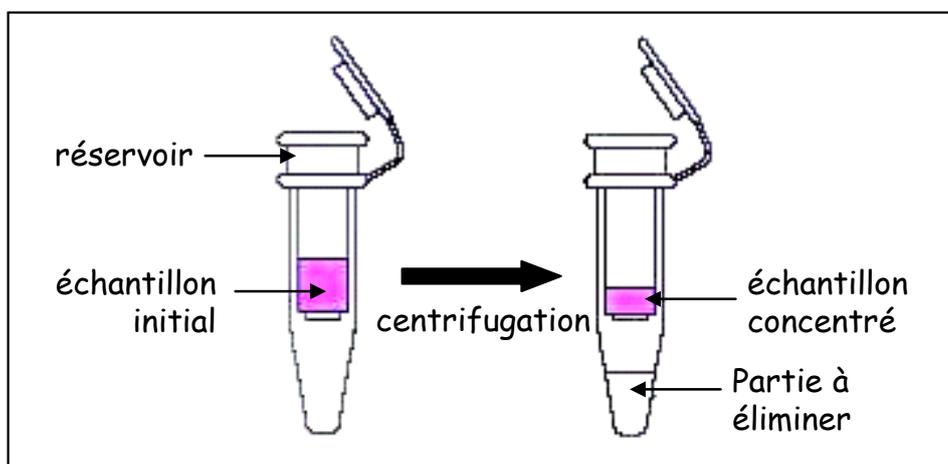


Figure 25 : Schéma d'une colonne Nanosep

c) Obtention des extraits membranaires

Les cellules, incubées 48 heures dans un milieu sans sérum, en présence ou non de l'effecteur, sont rincées 3 fois avec une solution de PBS. Les cellules sont décollées de leur support par grattage dans 200 µL de tampon de lyse (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 % (v/v) et PMSF 5 mM). Après incubation 30 minutes à 4°C, en vortexant toutes les 5 minutes afin d'augmenter l'efficacité d'extraction, le matériel insoluble est éliminé par centrifugation 10000 g / 10 min / 4°C. Le surnageant est ensuite transféré dans un tube neuf et additionné de NEM 6 mM et de SDS 2 %.

d) Obtention des extraits nucléaires

Les cellules incubées 48 heures en milieu sans sérum, en présence ou non de l'effecteur, sont rincées 3 fois avec une solution de PBS. Les cellules sont décollées de leur support par grattage dans 2 ml de tampon de lyse A (HEPES 10 mM pH 7,9, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, dithiothréitol 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 0,05 M, PMSF 1 mM). Après 15 minutes d'incubation à 4°C, le lysat est centrifugé à 2000 g / 5 min / 4°C et le culot est resuspendu dans 200 µL de tampon de lyse B (HEPES 20 mM pH 7,9, NaCl 0,4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, dithiothréitol 1 mM, Nonidet NP40 0,6 % (v/v), glycérol 10 % (v/v), Na₃VO₄ 1 mM, NaF 50 mM, PMSF 1 mM). Après 20 minutes d'incubation à 4°C sous agitation douce, le matériel insoluble est éliminé par centrifugation 10000 g / 10 min / 4°C. Le surnageant, qui contient les protéines nucléaires, est conservé à -80°C.

e) Dosage protéique et préparation des échantillons

Les échantillons ainsi obtenus sont soumis à un dosage de protéines selon la technique de Bradford (Bradford, 1976). Cette technique est un dosage colorimétrique basé sur le changement de couleur du bleu de Coomassie après liaison avec l'arginine et les groupements hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines.

On mélange l'échantillon, dilué dans 800 µL d'eau distillée, à 200 µL de réactif Bio-Rad Protein Assay. On réalise en parallèle une gamme d'albumine bovine, qui permettra de déterminer la concentration protéique des échantillons. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est lue à 595 nm.

Les échantillons sont alors dilués dans du tampon échantillon (Tris HCl 500 mM pH 6,8, bleu de bromophénol 0,001 %, SDS 4 %, glycérol 20 %), pour être déposés à quantité de protéines égale dans chaque piste.

II.12.2. Caractérisation des protéinases par zymographie

Cette technique d'électrophorèse permet de mettre en évidence l'activité gélatinolytique des cellules en incorporant le substrat des gélatinases dans le gel de séparation avant sa polymérisation (Heussen et Dowdle, 1980). La séparation électrophorétique des protéinases se fait en fonction de leur masse moléculaire apparente. La dégradation du substrat est ensuite mise en évidence, après coloration des gels au bleu de Coomassie G250, par l'apparition de bandes blanches sur fond bleu. L'intensité de la dégradation est corrélée à la surface de la plage de lyse et donc proportionnelle à la quantité de protéinases présentes (dans une certaine zone de linéarité). La masse moléculaire de l'enzyme responsable de cette dégradation est évaluée par comparaison avec des protéines témoins, ce qui permet son identification.

a) Obtention des gélatinases associées aux membranes

Les cellules sont rincées 3 fois avec 1 mL de tampon TBS⁺⁺ froid (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM pH 7,6). Les cellules sont récupérées à l'aide d'un grattoir dans 200 µl de TBS⁺⁺ froid contenant 1,5 % de triton X-114, incubées à 4°C sous agitation puis centrifugées à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant récupéré est chauffé à 37°C pendant 5 minutes (il y a apparition de deux phases) puis centrifugé à 5000 g. 50 µL de gélatine-agarose sont ajoutés à la phase inférieure diluée dans 50 µL de TBS⁺⁺ froid. Après 30 minutes d'incubation sous agitation à 4°C, la solution est centrifugée à 400 g et le culot de gélatine-agarose est rincé 3 fois avec 1 mL de TBS⁺⁺ froid. Les gélatinases fixées sur le gel de gélatine-agarose sont éluées avec le tampon échantillon (Bordier, 1980 ; Monsky et coll., 1993).

b) Zymographie en gel de gélatine

Les différents échantillons sont soumis à une électrophorèse (100 V) en gel de polyacrylamide 10 %, SDS 0,1 %, contenant de la gélatine 0,1 %. Après la migration, le gel

est lavé dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (m/v) (2 lavages de 30 minutes) pour éliminer le SDS et ainsi renaturer les protéinases. Le gel est ensuite incubé 24 heures à 37°C dans un tampon permettant le développement de l'activité enzymatique (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, Brij-35 0,02 % (m/v), pH 7,6) qui correspond à la dégradation de la gélatine par les enzymes protéolytiques. Le gel est ensuite coloré dans une solution contenant du bleu de Coomassie G-250 0,1 %, de l'acide acétique 10 %, du méthanol 40 %, pendant 30 minutes, puis décoloré par une solution contenant de l'acide acétique 10 %, du méthanol 20 %, jusqu'à l'apparition de bandes blanches correspondant aux zones de digestion par les gélatinases. Les gels sont ensuite photographiés, et quantifiés par analyse d'image (Vilber Lourmat), à l'aide du logiciel Bio1D.

c) Zymographie en gel de gélatine/plasminogène

Le principe est identique à la technique précédente. Du plasminogène (0,25 U/gel) est ajouté au gel d'acrylamide et de gélatine. Cette technique permet de mettre en évidence les activateurs du plasminogène (activateur de type tissulaire : tPA et urokinase : uPA). La période d'incubation de 24 heures à 37°C se fait dans un tampon à pH 8 contenant de la glycine 100 mM et de l'EDTA 5 mM.

d) Zymographie inversée

Cette technique permet de mettre en évidence les TIMPs. Le principe est identique aux techniques de zymographie précédemment décrites. Dans ce type de zymogramme, 200 ng de pro MMP-2 purifiée sont incorporés au gel d'acrylamide et de gélatine. Pendant l'incubation, la pro MMP-2 dégrade la gélatine, excepté au niveau des zones protégées par les TIMPs qui se colorent au bleu de Coomassie (DeClerck, 1988).

II.12.3. Immunodétection des protéines : Western-blot

a) Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

Cette technique permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les échantillons, repris dans du tampon échantillon contenant 3 % de β-mercaptoéthanol (v/v), sont chauffés 3 minutes à 90°C pour permettre la dénaturation des

protéines. La migration s'effectue 30 minutes à 100 V puis 45 minutes à 200 V dans du tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,3, SDS 0,1 % (m/v), glycine 192 mM). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane d'immunorévéléation.

b) Transfert

Dans un premier temps, le gel est équilibré 20 minutes dans le tampon de transfert (Tris 48 mM pH 8,2, glycine 39 mM, méthanol 20 % (v/v)). Les protéines sont ensuite transférées du gel vers une membrane Immobilon-P, préalablement activée par du méthanol et équilibrée 5 minutes dans le tampon de transfert, à l'aide d'un appareil de transfert. L'électrotransfert est effectué dans le tampon de transfert pendant 45 minutes, sous une tension constante de 100 V. La membrane est ensuite incubée pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de saturation composée de 5 % (m/v) de lait écrémé non délipidé dilué dans du TBS-T (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % (v/v)).

c) Incubations et révélation

La membrane est incubée avec l'anticorps primaire, une nuit à 4°C sous agitation douce, dans une solution de saturation composée de lait écrémé non délipidé 1 % (m/v) dilué dans du TBS-T. Le lendemain, après 3 lavages de 10 minutes au TBS-T, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dirigé contre l'anticorps primaire et dilué dans du TBS-T contenant du lait écrémé non délipidé 1 % (m/v). Après 3 lavages de 10 minutes au TBS-T suivis d'un lavage de 10 minutes au TBS (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), les protéines sont révélées par chimioluminescence (kit ECL™).

Lorsque cela est nécessaire, les anticorps sont dénaturés et découplés de la membrane par incubation à 55°C pendant 30 minutes dans une solution composée de Tris HCl 62,5 mM pH 6,7, SDS 2 % (m/v) et β -mercaptoéthanol 100 mM. Cinq lavages de 1 heure avec du NaN_3 0,02 % (m/v) permettent l'élimination du β -mercaptoéthanol. La membrane est alors saturée à nouveau avec la solution de saturation et incubée avec les anticorps selon le protocole décrit précédemment.

II.12.4. Dosage de l'Activité Plasmine

a) Principe

L'activité plasmine se mesure en utilisant un substrat chromogène spécifique de l'enzyme. La séquence peptidique clivée par l'enzyme est couplée à la para-nitroaniline (pNA). Le taux de pNA libéré, évalué par une mesure de l'absorbance à 405 nm, est proportionnel à l'activité de l'enzyme plasmine (Figure 26).

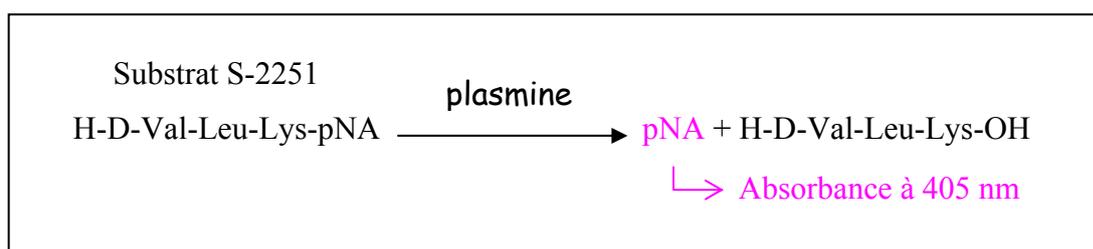


Figure 26 : Principe du dosage de l'activité plasmine

b) Protocole expérimental

Après incubation, les milieux de culture sont prélevés, centrifugés puis concentrés, comme décrit précédemment (II.12.1. a et b). Dans une plaque 96 puits, on dépose dans chaque puits : 145 μL de tampon Tris HCl 100 mM pH 7,8, 20 μL de substrat S-2251 (2,5 mg/mL), 20 μL de plasminogène (40 $\mu\text{g/mL}$) et 15 μL d'échantillon. Le plasminogène étant converti en plasmine par les activateurs du plasminogène uPA et tPA, le dosage de l'activité plasmine correspond à un dosage indirect des activités uPA et tPA. La plaque est incubée à 37°C à l'abri de la lumière. L'absorbance à 405 nm est lue au temps initial, puis après un temps d'incubation donné.

II.12.5. Dosage de l'Activité TIMP-2

L'activité TIMP-2 est dosée à l'aide du kit Biotrak TIMP-2. Ce test permet de détecter des quantités de TIMP-2 inférieures à 32 ng/mL.

Après incubation, les milieux de culture sont prélevés, centrifugés comme décrit précédemment (II.11.1.a). Dans des microtubes, 100 μL d'échantillons dilués dans du tampon test (tampon phosphate 30 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, SAB 0,3 % (m/v), EDTA 10 mM)

ainsi que 100 μL d'anticorps anti-TIMP-2 (fragment Fab') conjugué à la peroxydase sont mélangés. Les échantillons contiennent la même quantité de protéines. Une gamme de TIMP-2 est réalisée en parallèle. Le mélange, déposé dans les puits tapissés d'anticorps anti-TIMP-2, est alors incubé 2 heures à température ambiante. Quatre lavages sont effectués avec le tampon de lavage (tampon phosphate 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, tween™ 20 0,05 %). L'activité peroxydase est alors déterminée par addition de 100 μL de substrat TMB (tétraméthylbenzidine) pendant 30 minutes, à température ambiante, et à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par ajout d'acide sulfurique 0,5 M. L'absorbance est alors lue à 450 nm (Figure 27). La concentration en TIMP-2 des échantillons est déterminée par rapport à la courbe standard.

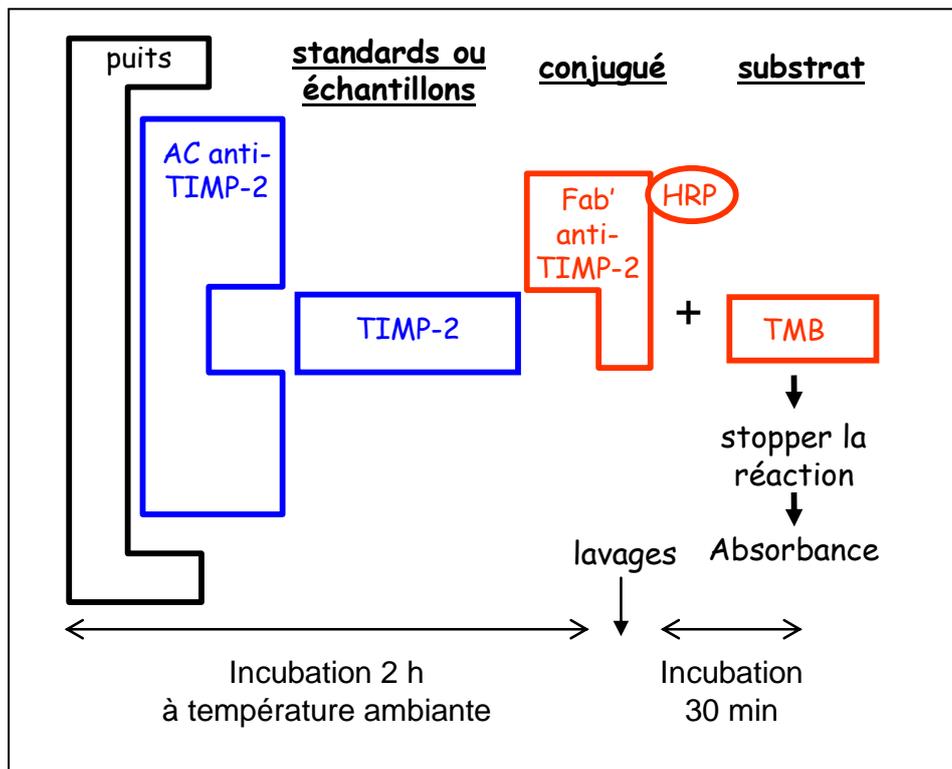


Figure 27 : Principe du Test ELISA TIMP-2

II. 13. ANALYSE EN MICROSCOPIE CONFOCALE

II.13.1. Marquages fluorescents

a) Marquage de l'actine F

Les cellules sont ensemencées sur lamelles de verre stériles placées en plaque 24 puits, dans le milieu adéquat contenant 5 % de SVF, en présence ou non de l'effecteur, à raison de 2.10^4 cellules/ puits. Après 24 et 48 heures d'incubation, les cellules sont fixées au formaldéhyde 3,7 % pendant 10 minutes à température ambiante et perméabilisées 3 minutes avec une solution d'acétone à -20°C . 3 lavages de 5 minutes dans de la PBS sont effectués, puis les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de saturation (PBS contenant 1 % de SAB). Les cellules sont alors incubées 1 heure avec la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor® 568 (diluée au 1/40 dans de la PBS contenant 1 % de SAB) puis lavées 3 fois 5 minutes avec de la PBS.

b) Immunomarquages

Les cellules sont ensemencées sur lamelles de verre stériles placées en plaque 24 puits, dans le milieu adéquat contenant 5 % de SVF, en présence ou non de l'effecteur, à raison de 2.10^4 cellules/ puits. Pour les marquages de la protéine phospho-p125^{FAK} et des intégrines $\beta 1$, les cellules sont fixées 15 minutes dans du méthanol, après 24 et 48 heures d'incubation. Trois lavages de 5 minutes dans du TBS-T sont effectués, puis les cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante dans une solution de saturation (TBS-T contenant 3 % de SAB). Les cellules sont alors incubées 2 heures à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire dilué au 1/100 dans du TBS-T contenant 3 % de SAB. Après 5 lavages de 5 minutes en TBS-T, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à l'Alexa Fluor® 488, dilué au 1/1000 dans du TBS-T contenant 3 % de SAB. Les cellules sont alors lavées 3 fois 5 minutes avec du TBS-T. Pour les marquages réalisés avec l'anticorps anti-Flag, les cellules sont fixées 10 minutes avec du formaldéhyde 3,7 %. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites précédemment. L'anticorps anti-Flag est dilué au 1/200 dans du TBS contenant 1 % de BSA.

Pour chaque immunomarquage, une lame contrôle correspondant à l'incubation des cellules sans l'anticorps primaire est réalisée ; ceci permet de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé.

c) Contre marquage nucléaire

Les lamelles préparées en II.13.a) et b) sont lavées 3 fois avec une solution de PBS et les cellules sont incubées 15 minutes avec du Hoechst-33342 (1 µg/mL) dans de la PBS.

Après les lavages, les lamelles sont montées dans du milieu de montage et observées à l'aide d'un microscope confocal.

II.13.2. Le microscope confocal

a) Principe

Dans un microscope confocal, l'illumination de l'échantillon se fait par le balayage d'un laser concentré en un point par un système de lentilles. Un diaphragme, appelé " trou d'aiguille ", placé devant le détecteur, permet de ne récupérer que les photons provenant du plan focal observé (Figure 28). Cette propriété permet d'augmenter le rendement signal/bruit.

L'intensité lumineuse est mesurée et numérisée à chaque position du laser dans l'échantillon : on obtient directement des images numériques. L'emploi d'une source lumineuse cohérente (laser) ainsi que la taille réduite du champ éclairé permettent d'obtenir une meilleure résolution que celle attendue pour un microscope optique conventionnel.

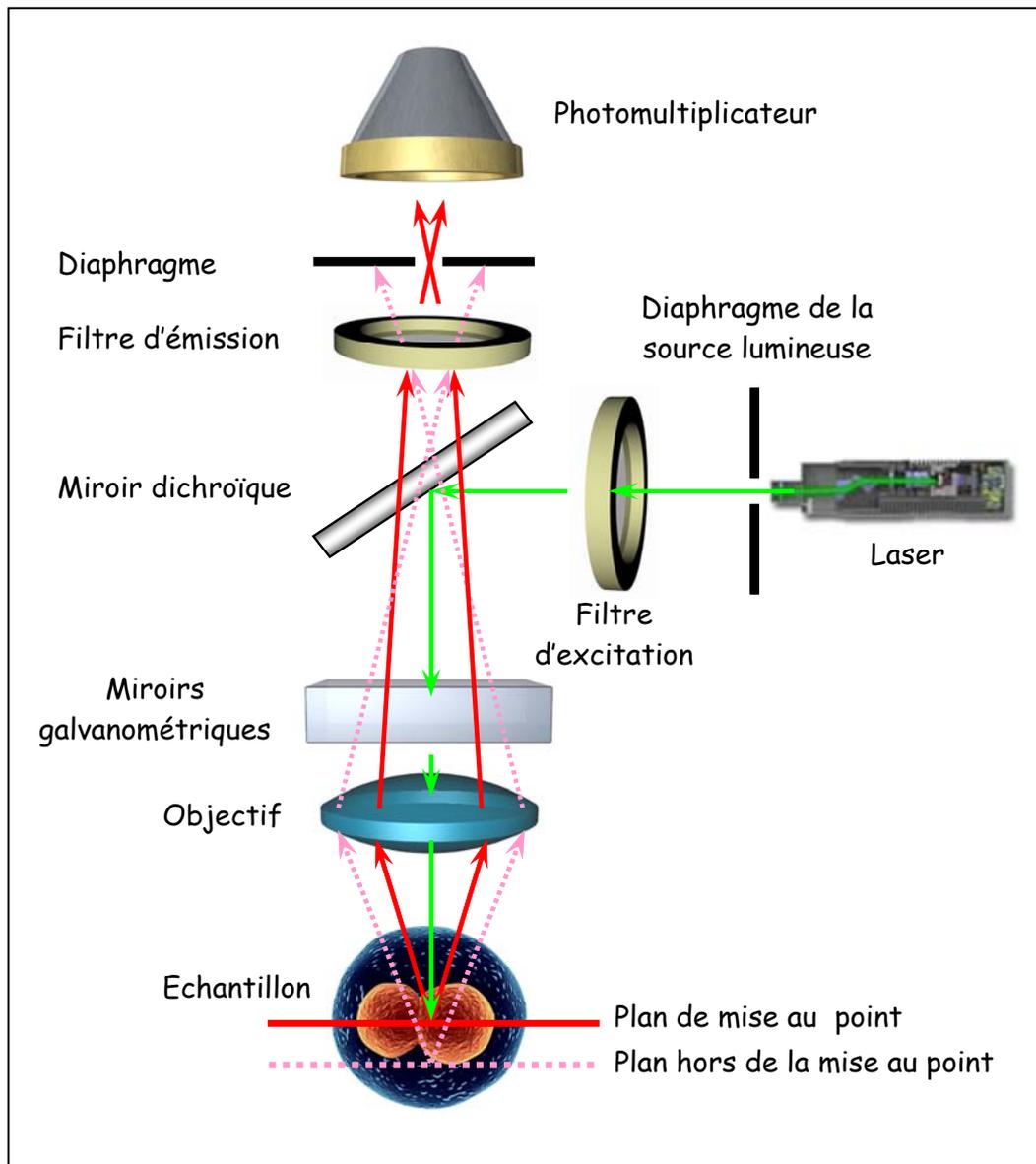


Figure 28 : Schéma d'un microscope confocal

b) Réglages et observations

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence inversé (Leica DMIRE2) couplé à un système confocal (Leica TCS SP2). Trois lasers ont été utilisés pour exciter les différents fluorochromes :

- la ligne à 351 nm d'un laser Argon-UV pour l'excitation du Hoechst 33342
- la ligne à 488 nm d'un laser Argon pour l'excitation de l'Alexa 488
- la ligne à 543 nm d'un laser Helium-Néon pour l'excitation de l'Alexa 568.

La détection de fluorescence a été réalisée en réglant l'AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter) de façon adéquate.

Les réglages, les acquisitions et les traitements d'image (logiciel Image J) ont été réalisés au sein du laboratoire par le Docteur Jérôme Devy.

II.14. METHODES D'ETUDE *IN VIVO*

II.14.1. Modèle animal de mélanome murin

Nous avons utilisé des souris C57/B16 provenant du centre d'élevage Harlan (Gannat, France). Ce sont des souris noires à croissance rapide qui possèdent une bonne homogénéité génétique. La masse moyenne des souris lors des expérimentations est de 18 à 20 g, avec un âge moyen de 6 à 8 semaines. Les animaux sont hébergés à l'animalerie de la Faculté de Médecine de Reims, dans une pièce à ventilation et température constantes. La boisson et l'alimentation leur sont fournies *ad libitum* pendant toute la durée des expériences. L'hébergement ainsi que toutes les manipulations sont effectuées en respectant les réglementations et l'éthique pour l'expérimentation animale selon les recommandations du Centre National de la Recherche Scientifique. Les souris ne sont utilisées qu'après une période d'acclimatation de deux semaines.

II.14.2. Modèle expérimental de tumeurs sous-cutanées

a) Induction tumorale et traitement péri-tumoral

Les cellules B16F1, pré-incubées ou non avec les peptides synthétiques (50 µg dans 100 µL), sont injectées par voie sous-cutanée (s.c.) sur le flan gauche de l'animal, préalablement anesthésié et rasé, à raison de $2,5 \cdot 10^5$ cellules dans 100 µL de PBS. La présence d'une tuméfaction visible à la suite de l'injection atteste du caractère sous-cutané de la tumeur. Aux jours 7 et 14 suivant l'induction tumorale, les souris reçoivent, ou non, une injection péri-tumorale de peptides (2,5 mg/kg). Les souris sont sacrifiées entre 18 et 21 jours, par inhalation de CO₂, après anesthésie (Figure 29 A).

L'anesthésie se fait par injection intra-péritonéale de 150 µL d'un mélange de kétamine (5 % v/v) et de xylazine (10 % v/v).

b) Induction tumorale et traitement intra-péritonéal (i.p.)

Les cellules B16F1 sont injectées par voie sous-cutanée (s.c.) sur le flan gauche de l'animal, préalablement anesthésié et rasé, à raison de $2,5 \cdot 10^5$ cellules dans 100 μL de PBS. La présence d'une tuméfaction visible à la suite de l'injection atteste du caractère sous-cutané de la tumeur. Aux jours 7, 9 et 11 suivant l'injection initiale, les souris reçoivent une injection de peptides (10 mg/kg) par voie intra-péritonéale. Elles sont sacrifiées entre 14 et 18 jours, par inhalation de CO_2 , après anesthésie par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine (Figure 29 B).

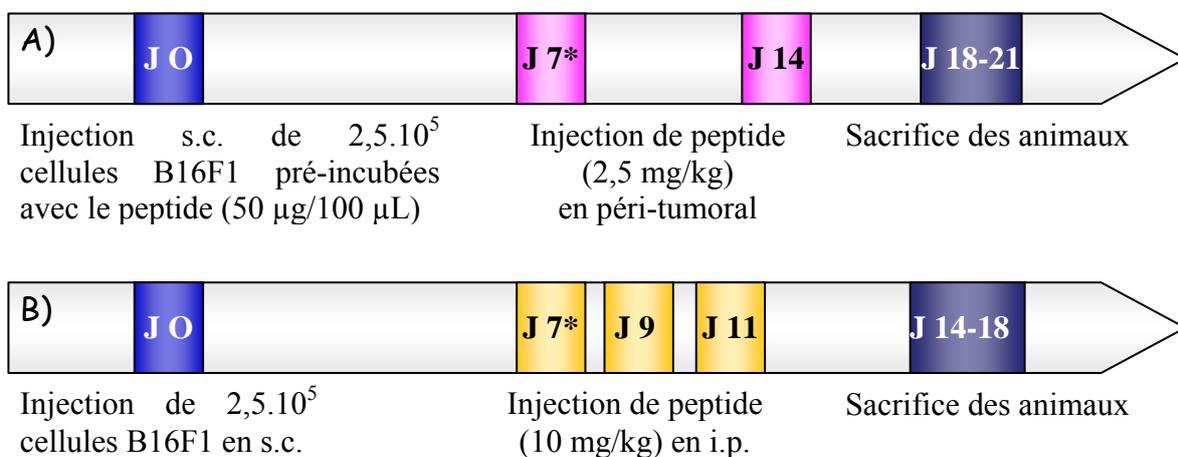


Figure 29 : Schéma des modèles expérimentaux *in vivo*

A) Induction tumorale par injection de $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 pré-incubées ou non avec les peptides effecteurs, et traitement en péri-tumoral avec 2,5 mg/kg de peptides B) Induction tumorale par injection de $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1, et traitement intra-péritonéal avec les peptides effecteurs (10 mg/kg) (* : jour de l'apparition de la tumeur).

II.14.3. Modèle d'électroporation *in vivo*

a) Principe

Le principe de l'électroporation, ou électroperméabilisation, a été décrit par Neumann au début des années 1980 (Neuman et coll., 1982). L'électroporation correspond à l'exposition des cellules à des impulsions électriques courtes et intenses, provoquant ainsi des changements de différence de potentiel transmembranaire. Pour une différence de potentiel transmembranaire située entre 0,2 et 0,4 V, il y a apparition de pores dans les membranes cellulaires, de manière transitoire.

Cette technique permet ainsi l'accès d'eau, d'ions, et de molécules à l'intérieur des cellules ; elle est notamment utilisée pour le transfert de molécules d'ADN avec une haute efficacité. L'électrotransfert peut être réalisé sur à peu près tous les types de tissus de l'animal vivant. Le muscle squelettique se révèle être une bonne cible pour cette méthode : c'est un large volume facilement accessible, un organe endocrine capable d'exprimer un taux circulant élevé de la protéine, et ce à long terme, puisque les cellules musculaires ne se divisent pas.

L'électrogénethérapie, ou thérapie génique non virale par électrotransfert d'ADN, comporte plusieurs étapes. La première étape consiste à injecter l'ADN nu dans les tissus (muscle, foie, tumeur...). Ensuite intervient l'étape d'électroporation, c'est-à-dire la formation transitoire de "micropores" dans les membranes des cellules présentes au sein du tissu. Pour cela, une électrode, directement appliquée au contact du tissu, délivre une impulsion électrique brève et de voltage élevé. La dernière étape, qui correspond à la migration électrophorétique de l'ADN à l'intérieur des cellules perméabilisées, est provoquée par une seconde impulsion électrique, plus longue mais d'intensité moindre par rapport à la précédente. Enfin, les pores membranaires se referment, et les cellules vont progressivement produire la protéine d'intérêt, qui va diffuser dans l'organisme (Figure 30) (Mir, 2001 ; Mir et coll., 2005).

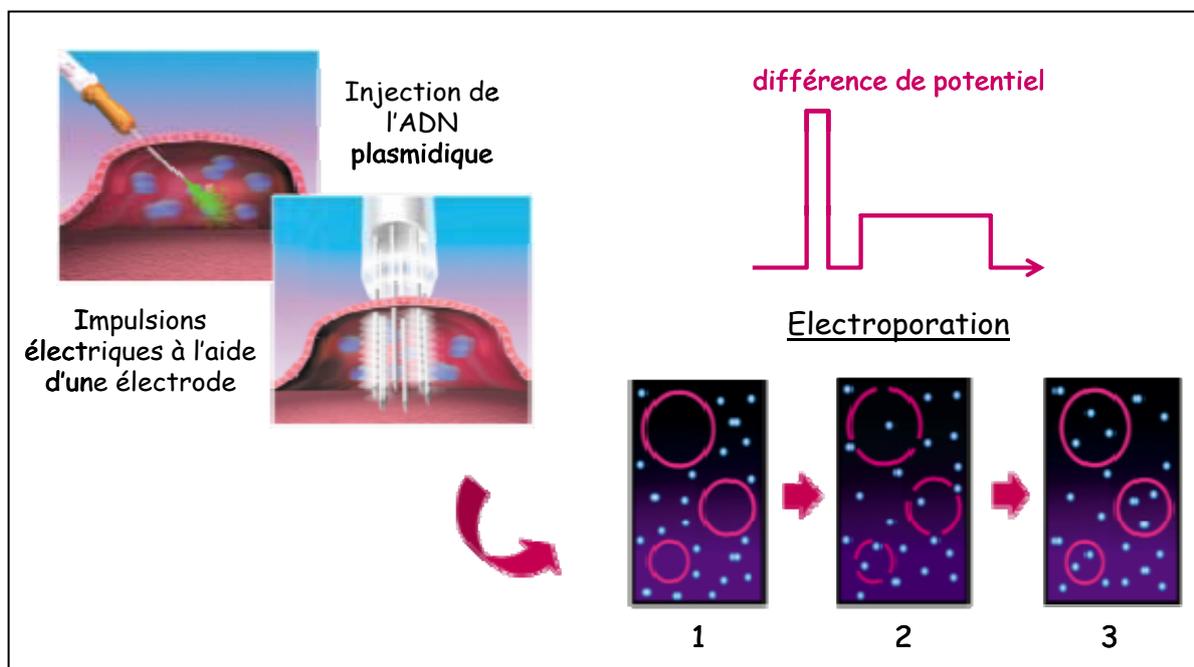


Figure 30 : Principe de l'électroporation

L'ADN plasmidique, injecté dans le tissu et présent dans le milieu extracellulaire (1), pénètre dans les cellules transitoirement perméabilisées du fait de l'électroporation (2). Les pores membranaires sont refermés et l'ADN plasmidique est incorporé dans les cellules (3).

b) Protocole expérimental

Après anesthésie des souris C57/Bl6 par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine, 30 µg de plasmide (constructions plasmidiques pVAX1 décrites au chapitre II.3.2) dilué dans 30 µL de NaCl 0,9 % sont injectés dans chaque muscle ischio-jambier postérieur.

Les électrodes, appliquées de part et d'autre du muscle recouvert d'un gel conducteur, délivrent une première impulsion électrique de 700 V/cm durant 100 microsecondes, puis une deuxième impulsion de 100 V/cm durant 400 millisecondes, 1 seconde plus tard.

Sept jours après l'électrotransfert d'ADN, $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées par voie sous-cutanée sur le flanc gauche de l'animal, préalablement anesthésié et rasé. Dès l'apparition de la tumeur, son volume est mesuré tous les jours. Les souris sont sacrifiées lorsque la tumeur atteint 1 cm³. Le sang et les muscles ischio-jambiers postérieurs sont prélevés.

II.14.4. Méthodes de mesure

Après sacrifice des souris, les tumeurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume tumoral est alors déterminé par la relation $V = \frac{1}{2} A \times B^2$ dans laquelle A et B représentent respectivement la plus grande dimension et la plus petite dimension de la tumeur (Wald et coll., 2001).

II.14.5. Dosage du peptide $\alpha 3(IV)$ dans les sérums de souris par la technique ELISA

Après sacrifice des souris et prélèvement du sang par ponction intracardiaque, les échantillons sanguins sont centrifugés 10 minutes à 500 g. Dans une plaque 96 puits, 50 µL de sérum et 50 µL de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6 sont ajoutés par puits, et incubés pendant 16 heures à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés avec du TBS, et les sites aspécifiques sont bloqués avec une solution composée de TBS/SAB 1% (m/v), pendant 1 heure, à 37°C. Après rinçage des puits avec du TBS-T, 100 µL d'anticorps anti- $\alpha 3(IV)$ sont ajoutés pendant 2 heures, à température ambiante. Trois lavages au TBS-T sont effectués, puis 100 µL d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dirigé contre l'anticorps primaire et dilué dans du TBS-T contenant de la SAB 1 % (m/v), sont incubés pendant 1 heure, à température ambiante. L'activité peroxydase est alors déterminée par addition de 100 µL de

substrat TMB (tétraméthylbenzidine) pendant 30 minutes, à température ambiante, et à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée par ajout d'acide sulfurique 0,5 M. L'absorbance est alors lue à 450 nm (Figure 27). La concentration en peptide $\alpha 3(\text{IV})$ dans les sérums est déterminée par rapport à la gamme étalon de peptide synthétique $\alpha 3(\text{IV})[185-203]$ (de 0,3 ng à 300 ng/puits).

II.14.6. Etudes morphologiques des tumeurs

Après mesure macroscopique de la taille des tumeurs, ces dernières sont extraites par dissection et conservées dans du formaldéhyde 10 %. Elles sont ensuite incluses en paraffine. A l'aide d'un microtome, des sections du bloc de paraffine de 5 μm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur lames de verre. Ces lames sont ensuite colorées ; une coloration standard (Hématéine - Erythrosine - Safran) est réalisée pour évaluer l'angiogenèse.

Des analyses immunohistochimiques pour VEGF et MT1-MMP sont réalisées sur des coupes de tumeurs de 3 μm . Les sections sont déparaffinées, réhydratées et traitées dans un tampon citrate (pH 6,0) pour démasquer les antigènes. Les lames sont incubées 10 minutes avec une solution d'eau oxygénée afin de neutraliser l'activité peroxydasique endogène. Pour les marquages CD31, les tumeurs sont conservées dans l'azote (-196°C) et les sections de 5 μm , réalisées à l'aide d'un cryomicrotome, sont déposées sur lame de verre et fixées à l'acétone. Les échantillons sont alors incubés avec un sérum normal non immun de même espèce que l'anticorps secondaire pendant 20 minutes, pour bloquer les sites non spécifiques. L'incubation avec l'anticorps primaire, une nuit à 4°C , est suivie d'une incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé pendant 20 minutes. L'incubation avec le réactif avidine-biotine couplé à la peroxydase pendant 30 minutes est suivie par la révélation avec le kit AEC (3 amino-9-éthylcarbazole) et l'eau oxygénée, donnant une coloration rouge foncé. Un contre marquage des noyaux à l'hématoxyline est effectué. Pour chaque immunomarquage, un contrôle correspondant à l'incubation des cellules sans l'anticorps primaire est réalisé, ce qui permet de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé. Les lames sont ensuite observées au microscope et photographiées.

Lors de ces expériences, au moins 3 coupes de 7 tumeurs différentes ont été analysées pour chaque groupe.

Les quantifications sont réalisées par 2 pathologistes différents. La quantification des marquages CD31 se fait par comptage des vaisseaux. Concernant les marquages VEGF et

MT1-MMP, les quantifications sont semi-quantitatives : des niveaux d'expression sont attribués selon l'intensité du marquage (0 = négatif, + = faible, ++ = fort, +++ = intense).

II.14.7. Préparation des extraits tumoraux

Les tumeurs, prélevées de manière chirurgicale 21 jours après l'injection des cellules tumorales, sont congelées dans l'azote liquide. Les tumeurs encore congelées sont coupées en petits fragments de tissus à l'aide d'un scalpel. Ces fragments sont transférés dans des tubes et homogénéisés dans un tampon de lyse (Tris HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 500 mM, SDS 0,1 % (v/v), NaN₃ 0,02 % (m/v), PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, iodoacétamide 1 mM) à l'aide d'un piston. Les lysats récupérés sont soumis aux ultrasons (12000 Hz) pendant 10 secondes dans la glace, et incubés 1 nuit à 4°C. Les tubes sont alors centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes. Un dosage de protéines, selon la méthode de Bradford, est effectué sur les surnageants.

II.15. ETUDES STATISTIQUES

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata et les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± écart-type. Les tests suivants ont été utilisés pour l'analyse statistique :

- Test paramétrique de Student avec séries appariées (méthode des couples)
- Test non paramétrique de Mann et Whitney pour les résultats obtenus *in vivo*
- Test du χ^2 pour les analyses immunohistochimiques

Les niveaux de probabilité sont schématisés de la manière suivante :

NS = non significatif

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

D- Résultats

I. EFFET DU COLLAGÈNE DE TYPE XIX SUR LA CROISSANCE TUMORALE

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux activités biologiques du collagène de type XIX, encore non décrites à ce jour. Nous avons étudié les effets du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type XIX (NC1(XIX)) sur la progression tumorale. Pour cela nous avons utilisé un peptide synthétique reproduisant la séquence du domaine NC1(XIX), soit NPEDCLYPVSHAHQRTGGN. Le peptide “scrambled” (AGNEQPNYHSDPGTHLCR V) sert de témoin négatif.

I.1. EFFET DU COLLAGÈNE XIX SUR LA CROISSANCE TUMORALE *IN VIVO*

Nous avons étudié la croissance tumorale des cellules de mélanome B16F1, *in vivo*, chez la souris. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de souris C57/Bl6 syngéniques des cellules B16F1. L’injection, par voie sous-cutanée, de $2,5 \cdot 10^5$ cellules au jour J0 entraîne l’apparition d’une tumeur localisée dès le 7^{ème} jour suivant l’injection. La taille de la tumeur est alors mesurée tous les 2 jours. Les animaux sont euthanasiés entre le 14^{ème} et le 21^{ème} jour suivant l’induction tumorale. Chaque groupe est composé de 7 souris. Dans ce modèle, différents traitements sont testés.

La pré-incubation seule des cellules tumorales, avec le peptide NC1(XIX) (30 μ M), ou de peptide scrambled à la concentration de 30 μ M, n’a aucun effet significatif sur la croissance tumorale des souris (Figure 31 A).

En revanche, lorsque les souris sont traitées au jour 7, jour de l’apparition tumorale, et au jour 14, par une injection péri-tumorale de peptide NC1(XIX) (2,5 mg/kg), une forte inhibition de la croissance tumorale est observée par rapport aux groupes traités avec une solution saline, ou le peptide scrambled. Cette inhibition est très forte dès J12, puisque la réduction du volume tumoral d’environ 70 % est maintenue jusqu’à J18, jour de sacrifice des animaux. (Figure 31B).

Nous avons voulu savoir si l’effet anti-tumoral du traitement péri-tumoral serait potentialisé par la pré-incubation des cellules avec le peptide. La figure 31C indique une réduction de la croissance tumorale de 70 %, identique à celle observée lorsque les souris

reçoivent uniquement des injections péri-tumorales de peptide aux J7 et 14. Le peptide scrambled n'exerce pas d'action sur la croissance tumorale.

Lorsque le peptide NC1(XIX) est injecté par voie intra-péritonéale, aux jours 10 et 15 suivant l'induction tumorale, les volumes tumoraux à J14, J16 et J18 sont diminués respectivement de 83 %, 65 % et 71 %, en comparaison avec les souris traitées par une solution saline ou le peptide scrambled (Figure 31D).

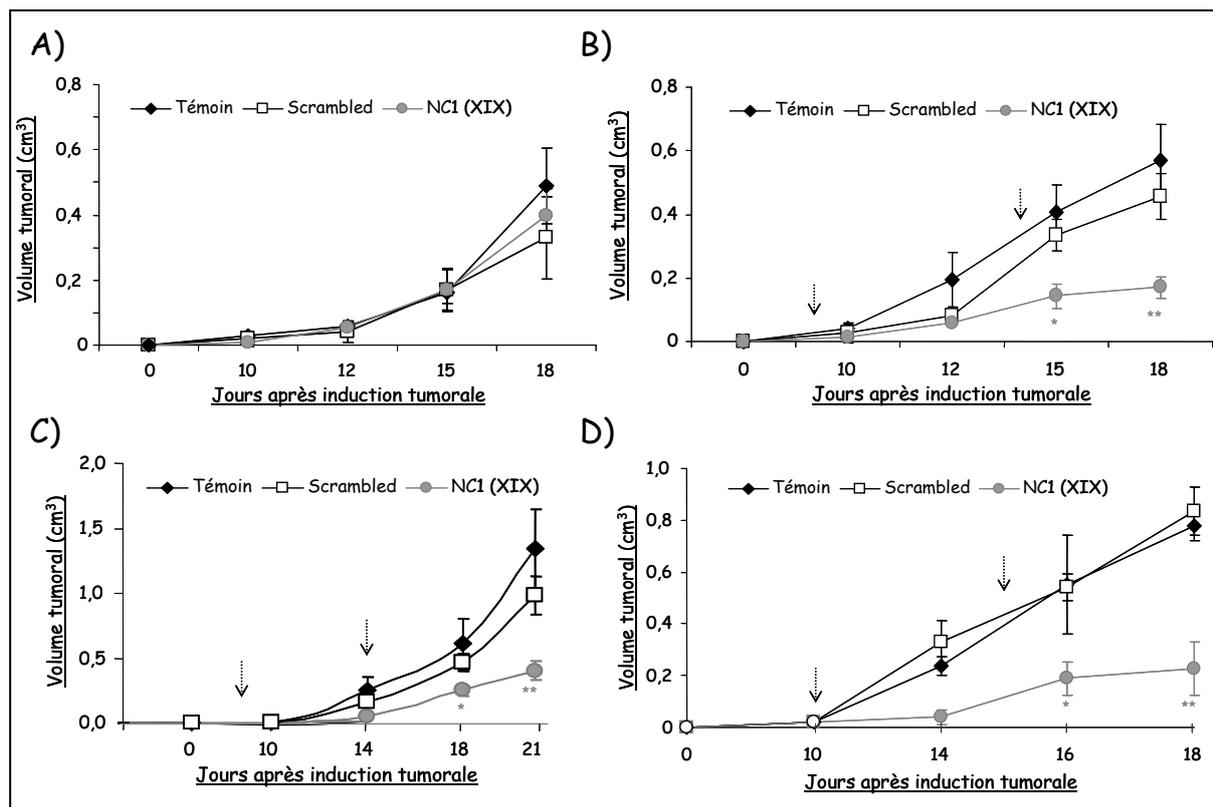


Figure 31 : Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la croissance tumorale *in vivo*

2,5.10⁵ cellules B16F1 sont injectées au jour J0 aux souris C57/Bl6, par voie sous-cutanée. (A) Les cellules injectées sont pré-incubées 15 minutes, soit dans une solution saline, soit avec le peptide NC1(XIX) (30 µM), soit avec le peptide scrambled (30 µM) (B) Une solution saline, le peptide NC1(XIX) (2,5 mg/kg), ou le peptide scrambled (2,5 mg/kg) sont injectés aux souris en péri-tumoral aux jours 7 et 14 (∇). Aucune pré-incubation des cellules n'est réalisée. (C) Les cellules injectées sont pré-incubées 15 minutes, soit dans une solution saline, soit avec le peptide NC1(XIX) (30 µM), soit avec le peptide scrambled (30 µM) ; puis, aux jours 7 et 14, une solution saline, le peptide NC1(XIX) (2,5 mg/kg), ou le peptide scrambled (2,5 mg/kg) sont réinjectés en péri-tumoral (∇) (D) Des injections de solution saline, de peptide NC1(XIX) (10 mg/kg), ou de peptide scrambled (10 mg/kg) sont effectuées aux jours 7 et 14 (∇) par voie intra-péritonéale.

I.2. EFFET DU COLLAGÈNE XIX SUR LA PROLIFÉRATION DES CELLULES TUMORALES *IN VITRO*

L'effet du collagène de type XIX sur la prolifération cellulaire est déterminé soit par coloration des noyaux au violet cristal, soit par réduction du WST-1. Nous avons vérifié que ces 2 méthodes de mesure donnaient des résultats similaires. La prolifération des cellules de mélanome B16F1 est mesurée après 24, 48, 72 et 96 heures d'incubation des cellules dans le milieu contenant du SVF (5 %).

La figure 32 représente les courbes de prolifération des cellules B16F1 incubées avec le peptide NC1(XIX), ou le peptide scrambled (15 et 30 μM). Dans ces conditions expérimentales, les peptides n'exercent aucun effet significatif sur la prolifération cellulaire.

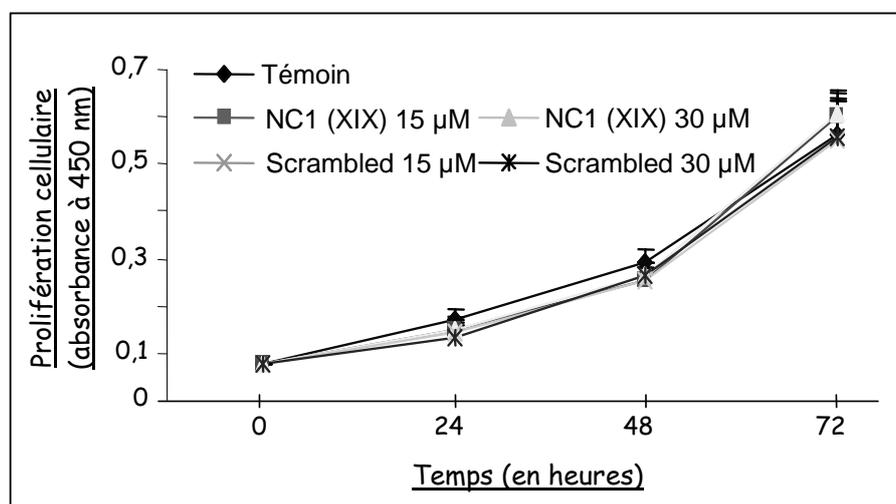


Figure 32: Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la prolifération des cellules tumorales B16F1 *in vitro*

10^4 cellules B16F1 sontensemencées en plaque 96 puits, dans du milieu contenant du SVF (5 %), en présence ou non de peptide NC1(XIX) (15 et 30 μM), ou de peptide scrambled (15 et 30 μM). Le nombre de cellules est estimé à T0 puis après 24, 48, 72 et 96 heures d'incubation, par test WST-1.

I.3. EFFET DU COLLAGÈNE XIX SUR L'INVASION DES CELLULES TUMORALES *IN VITRO*

Les capacités invasives des cellules B16F1 *in vitro* sont testées dans le modèle de chambre de Boyden modifiée, en présence de Matrigel® (30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Après 48 heures d'incubation à 37°C, avec ou sans peptide NC1(XIX), les cellules ayant migré sont fixées au

méthanol, colorées au violet cristal, puis comptées par observation au microscope, sur 4 champs différents.

Comme le montre la figure 33, les cellules incubées avec le peptide NC1(XIX) (30 μ M) présentent une inhibition de 48 % de leurs propriétés invasives sur Matrigel®, hautement significative ($p < 0,01$), comparativement aux cellules non incubées ou incubées avec le peptide scrambled à la même concentration.

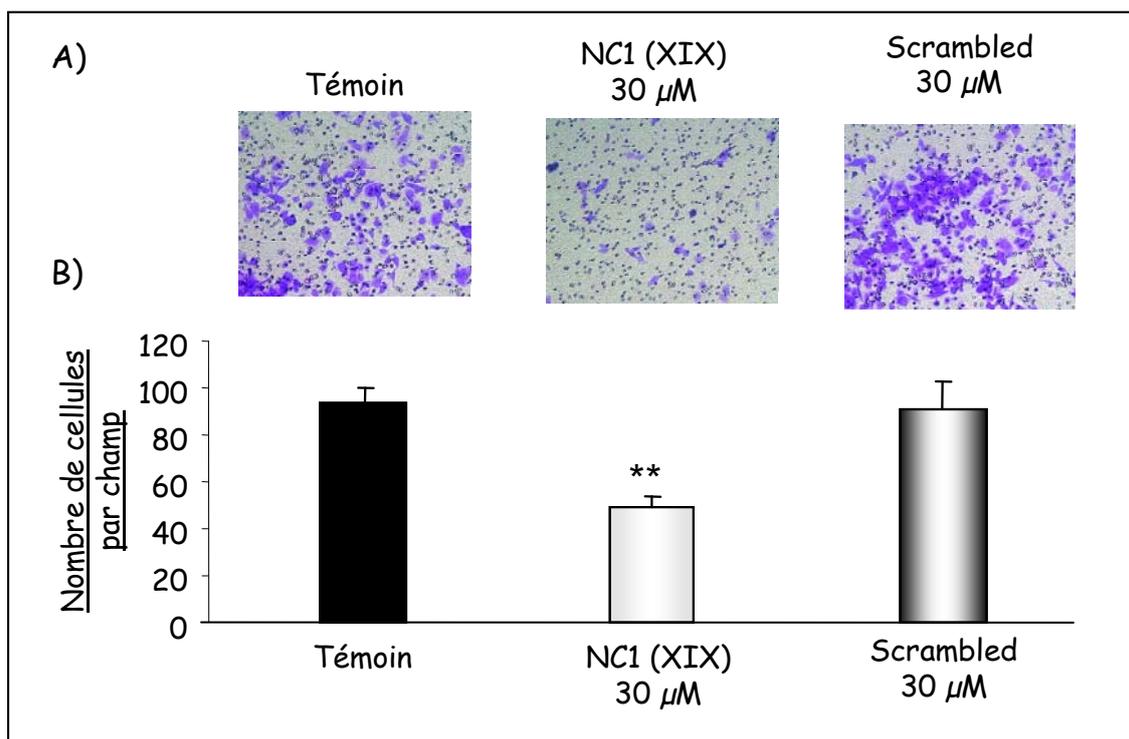


Figure 33 : Inhibition de l'invasion des cellules tumorales *in vitro* par le domaine NC1 du collagène XIX

4.10⁴ cellules B16F1 sont ensemencées sur la face supérieure de la membrane poreuse de la chambre de Boyden modifiée, préalablement recouverte de Matrigel® (30 μ g/cm²), dans du milieu contenant de la SAB (0,2 %), en présence ou non de peptide NC1(XIX) (30 μ M), ou de peptide scrambled (30 μ M). Après 48h d'incubation, les cellules sont fixées au méthanol, colorées au violet cristal (A), et comptées sur 4 champs à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 200). Chaque histogramme représente la moyenne du nombre de cellules comptées sur 4 champs, dans 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (B).

Nous avons également démontré que l'incubation des cellules tumorales avec le domaine NC1(XIX), *in vitro*, n'exerce aucun effet sur la sécrétion de la MMP-2 ainsi que sur l'expression de la MT1-MMP ; ces protéases sont notamment impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire lors de la progression tumorale.

I.4. EFFET DU COLLAGENE XIX SUR L'ANGIOGENESE

I.4.1. Effets sur la vascularisation de la tumeur *in vivo*

Pour étudier la vascularisation *in vivo*, des marquages immunohistochimiques sont réalisés sur des coupes de tumeurs de 5 μm d'épaisseur, provenant de souris traitées ou non par les peptides. Les tumeurs prélevées à J21 sont fixées dans du formaldéhyde 10 % pour les marquages VEGF, ou dans l'azote liquide pour les marquages CD31, afin de conserver les tissus dans un état le plus proche possible du vivant. Lors de ces expériences, 3 coupes de 7 tumeurs différentes sont analysées pour chaque groupe (une seule coupe est représentée).

Morphologiquement, les tumeurs des souris ayant reçu un traitement placebo (témoin), ou le peptide scrambled, présentent de nombreuses structures vasculaires de diamètre important, contrairement aux vaisseaux intra-tumoraux des animaux traités par le peptide NC1(XIX) qui sont beaucoup plus petits. Quantitativement, le nombre de vaisseaux comptés par champ est de : 12 ± 1 pour les tumeurs témoins, de 13 ± 3 pour les tumeurs traitées avec le peptide scrambled, et de seulement 8 ± 2 pour les tumeurs traitées par le peptide NC1(XIX). Le peptide NC1(XIX) induit une réduction importante de la vascularisation intra-tumorale ($p < 0,001$) (Figure 34A).

Les facteurs de croissance angiogéniques sont des paramètres importants dans le processus d'angiogenèse tumorale. C'est pour cette raison que nous avons étudié l'expression de VEGF dans ce modèle expérimental. Dans 13 des 21 coupes de tumeurs témoins, et dans 12 des 21 coupes des tumeurs traitées par le peptide scrambled, une expression intense de VEGF est décelée. En revanche, l'expression de VEGF est faible, voire absente, dans 17 des 21 coupes de tumeurs traitées par le peptide NC1(XIX). Ces résultats indiquent une inhibition significative de l'expression de VEGF *in vivo* (Figure 34B). Nous avons confirmé ces résultats par la technique de Western-blot sur des extraits de tumeurs, en utilisant un anticorps anti-VEGF. La figure 34C montre une très forte diminution de l'expression de VEGF dans les extraits tumoraux issus des souris traitées par le peptide NC1(XIX), en comparaison avec les extraits tumoraux des animaux témoins ou traités par le peptide scrambled. La bande correspondant à l'actine atteste du dépôt identique, en terme de quantité de protéines.

En résumé, le peptide NC1(XIX) inhibe efficacement la vascularisation *in vivo*.

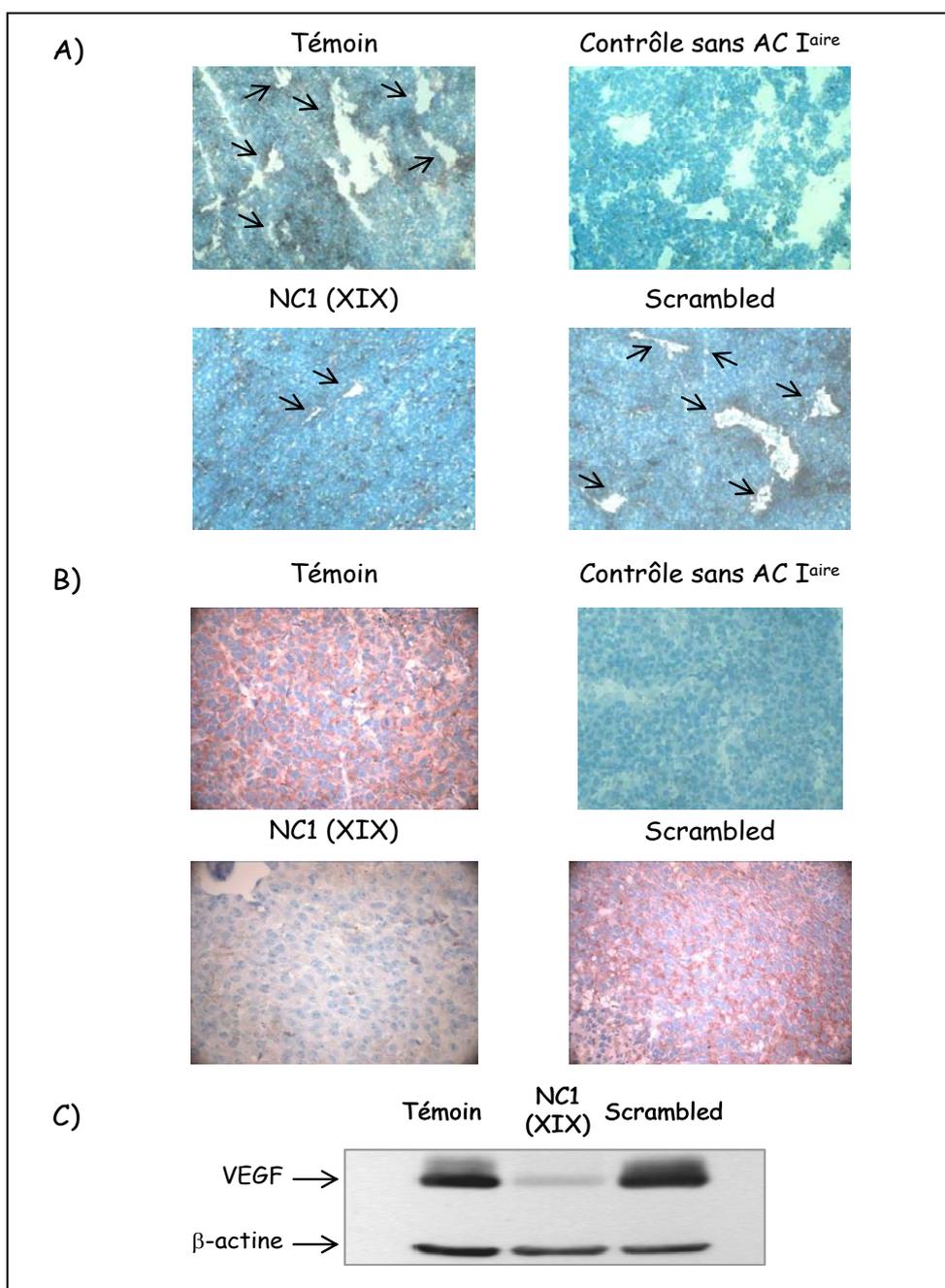


Figure 34 : Effets du domaine NC1 du collagène XIX sur la vascularisation tumorale *in vivo*

Les tumeurs des souris traitées ou non avec le peptide NC1(XIX), ou le peptide scrambled (30 μ M) sont récupérées à J21 et sont soumises à des études morphologiques. Pour tous les marquages, un contrôle négatif sans anticorps primaire est réalisé, afin de vérifier la spécificité de l'anticorps utilisé. (A) Des immunomarquages anti-CD31 sont réalisés sur des coupes de tumeurs de 5 μ m d'épaisseur. Les vaisseaux sont désignés par les flèches (ψ) (B) Des immunomarquages avec un anticorps anti-VEGF sont réalisés sur des coupes de tumeurs de 5 μ m d'épaisseur. Les marquages VEGF apparaissent en rouge sombre. Un contre marquage nucléaire à l'hématoxyline est effectué en parallèle (grossissement x 200). (C) Un Western-blot avec un anticorps anti-VEGF est réalisé sur les extraits tumoraux. L'incubation de la membrane avec un anticorps anti- β -actine est effectuée sur la même membrane.

I.4.2. Effets sur la formation de pseudotubes *in vitro*

Après avoir démontré l'activité anti-angiogénique du peptide NC1(XIX) *in vivo*, nous avons étudié ses effets sur l'angiogenèse *in vitro*.

Les cellules endothélialesensemencées sur Matrigel® ont la capacité de former spontanément des pseudotubes qui miment les structures vasculaires. Cette propriété est utilisée pour étudier l'angiogenèse *in vitro*.

Les cellules HMEC-1,ensemencées sur Matrigel®, sont incubées ou non en présence de peptide NC1(XIX) ou de peptide scrambled (30 µM). Après 24 heures d'incubation dans un milieu sans SVF, les cellules témoins, ainsi que celles incubées avec le peptide scrambled, s'organisent en pseudotubes. Cette capacité est nettement altérée lorsque le peptide NC1(XIX) est ajouté au milieu d'incubation (Figure 35A) : quantitativement, la mesure de la longueur des pseudotubes permet de mettre en évidence une réduction de 85 % de la formation des pseudotubes (Figure 35B).

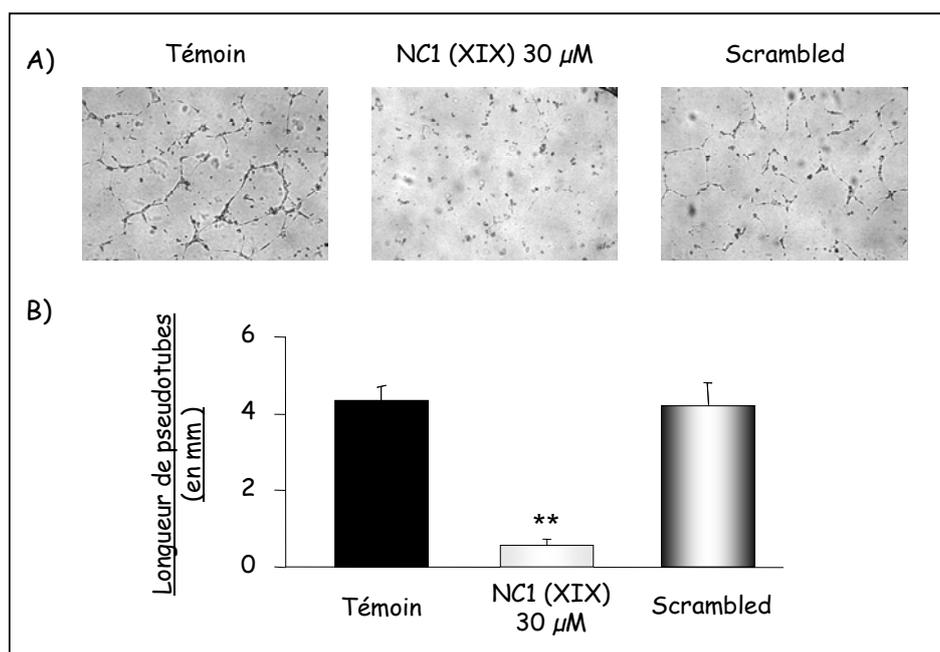


Figure 35 : Inhibition de la formation de pseudotubes sur Matrigel® par le domaine NC1 du collagène XIX

5.10⁴ cellules HMEC-1 sontensemencées sur Matrigel® en plaque 24 puits, en présence ou non des peptides NC1(XIX) ou scrambled, dans du milieu sans SVF. Après 48 heures d'incubation, les pseudotubes sont observés à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 100) (A). Les histogrammes représentent la moyenne de la longueur des pseudotubes, mesurée sur 4 champs, dans 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (quantification avec le logiciel d'analyse d'images Image J) (B).

I.4.3. Effets sur la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro*

Nous avons vérifié si l'inhibition de formation de pseudotubes pouvait être imputable à une inhibition de la prolifération cellulaire. 10^4 cellules HMEC-1 sontensemencées en plaque 96 puits, dans du milieu contenant ou non les peptides à la concentration de $30 \mu\text{M}$. La figure 36 démontre que les peptides NC1(XIX) et scrambled n'ont aucun effet sur la prolifération de ces cellules.

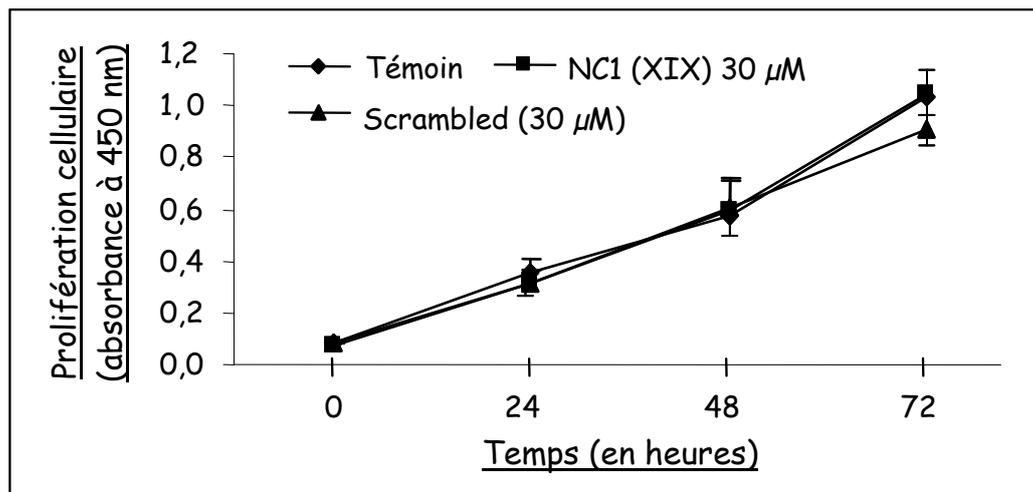


Figure 36 : Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la prolifération des cellules endothéliales HMEC-1 *in vitro*

10^4 cellules HMEC-1 sontensemencées en plaque 96 puits, dans du milieu contenant du SVF (5 %), en présence ou non des peptides NC1(XIX) ($30 \mu\text{M}$), scrambled ($30 \mu\text{M}$). La prolifération cellulaire est déterminée par test WST-1, après 24, 48, 72 et 96 heures d'incubation.

Pour étudier l'incidence de ces peptides sur les processus apoptotiques, nous avons effectué une coloration cytochimique, au Hoechst-33342, des cellules endothélialesensemencées sur Matrigel®. L'incubation des cellules endothéliales avec les peptides NC1(XIX) et scrambled n'induit aucune modification morphologique typique de l'apoptose, comme la condensation de la chromatine, ou la fragmentation nucléaire. (Figure 37).

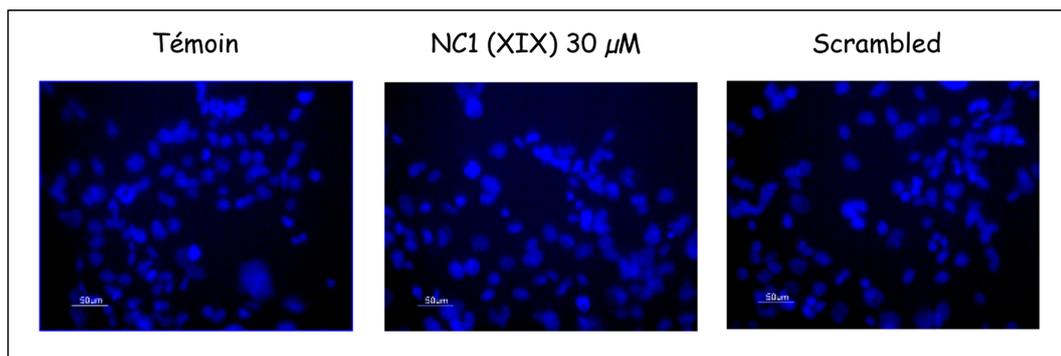


Figure 37 : Le domaine NC1 du collagène XIX n'induit pas l'apoptose des cellules endothéliales HMEC-1

$5 \cdot 10^4$ cellules HMEC-1 sont ensemencées sur Matrigel® en plaque 24 puits, dans du milieu sans SVF, en présence ou non des peptides NC1(XIX) ou scrambled, pendant 24 heures. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes avec du Hoechst-33342 et les noyaux sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence (λ excitation = 346 nm ; λ émission = 460 nm), puis photographiés (grossissement x 400).

I.5. EFFET DU COLLAGÈNE XIX SUR L'EXPRESSION DE LA MT1-MMP

La MT1-MMP est impliquée dans le contrôle de la migration des cellules endothéliales, et elle favorise l'angiogenèse lors du développement de la tumeur. De plus, la surexpression de cette protéase est corrélée à une augmentation de la croissance tumorale, et de la vascularisation *in vivo* dans le cas des mélanomes. Nous avons étudié les effets du peptide NC1(XIX) sur l'expression de la MT1-MMP, *in vivo* et *in vitro*.

I.5.1. Effets inhibiteurs *in vivo*

Des immunomarquages avec un anticorps anti-MT1-MMP sont effectués sur les coupes de tumeurs provenant de souris traitées ou non par les peptides. Lors de ces expériences, 3 coupes de 7 tumeurs différentes ont été analysées pour chaque groupe ; une seule coupe est représentée sur la figure 38.

L'analyse immunohistochimique des tumeurs montre un marquage fort à intense sur 14 des 21 tumeurs provenant des souris du lot témoin. Le même profil est observé sur 10 des 18 coupes issues des souris traitées par le peptide scrambled. Au contraire, sur 20 des 21 coupes provenant des souris traitées par le peptide NC1(XIX), le marquage est faible ou

absent (Figure 38). Ces observations démontrent un effet inhibiteur significatif ($p < 0,001$) du peptide NC1(XIX) sur l'expression de la MT1-MMP *in vivo*.

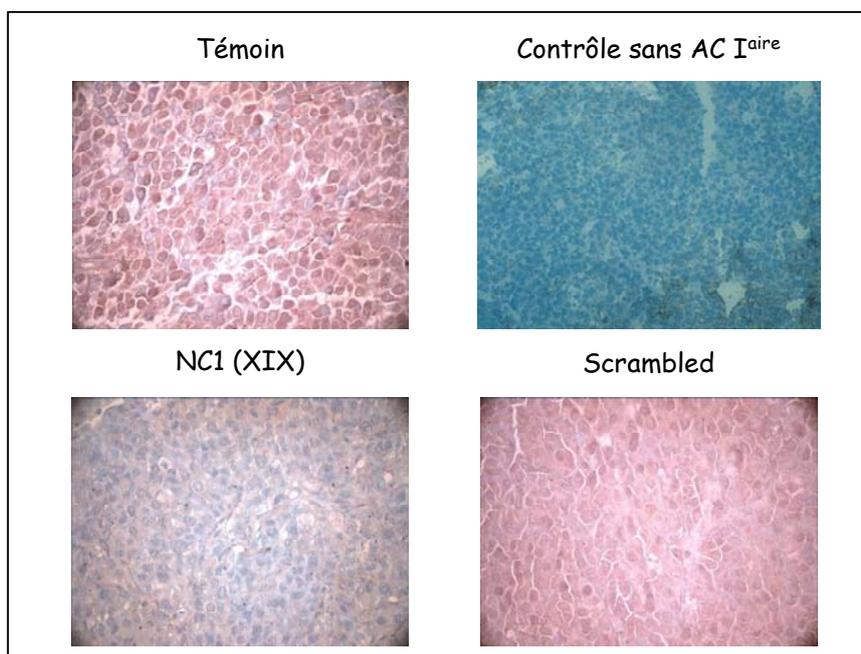


Figure 38 : Effet inhibiteur du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression de la MT1-MMP *in vivo*

Les tumeurs des souris traitées ou non avec les peptides NC1(XIX), ou scrambled (30 μ M) sont récupérées à J21, puis fixées dans du formaldéhyde 10 %. Des immunomarquages avec un anticorps anti-MT1-MMP sont réalisés sur des coupes de tumeurs de 5 μ m d'épaisseur. Le marquage apparaît en rouge sombre. Un contre marquage à l'hématoxyline est également effectué. Un contrôle négatif sans anticorps primaire atteste de la spécificité de l'anticorps utilisé. Les lames sont ensuite observées à l'aide d'un microscope inversé, et photographiées (grossissement x 200).

I.5.2. Effets inhibiteurs *in vitro* sur les cellules endothéliales

Dans les cellules HMEC-1, l'analyse de la quantité d'ARNm, par PCR en temps réel, permet de mettre en évidence une très forte réduction (90 % ; $p < 0,01$) du taux d'ARNm de la MT1-MMP dans les cellules traitées par le peptide NC1(XIX), par rapport aux cellules témoins, et traitées avec le peptide scrambled (Figure 39A).

Au niveau protéique, nous avons réalisé un Western-blot sur des extraits membranaires. La figure 39B montre la présence d'une bande à 66 kDa dans tous les extraits membranaires, correspondant à la MT1-MMP. Dans les cellules HMEC-1 cultivées *in vitro*, nous n'avons pas mis en évidence de forme active (58 kDa) avec l'anticorps utilisé. La

quantification densitométrique permet la mise en évidence d'une inhibition de 36 % de l'expression de la MT1-MMP ($p < 0,01$), lorsque les cellules endothéliales sont incubées avec le peptide NC1(XIX), en comparaison avec les cellules non traitées. Le peptide scrambled n'induit pas de modifications de l'expression de cette protéase (Figure 39C).

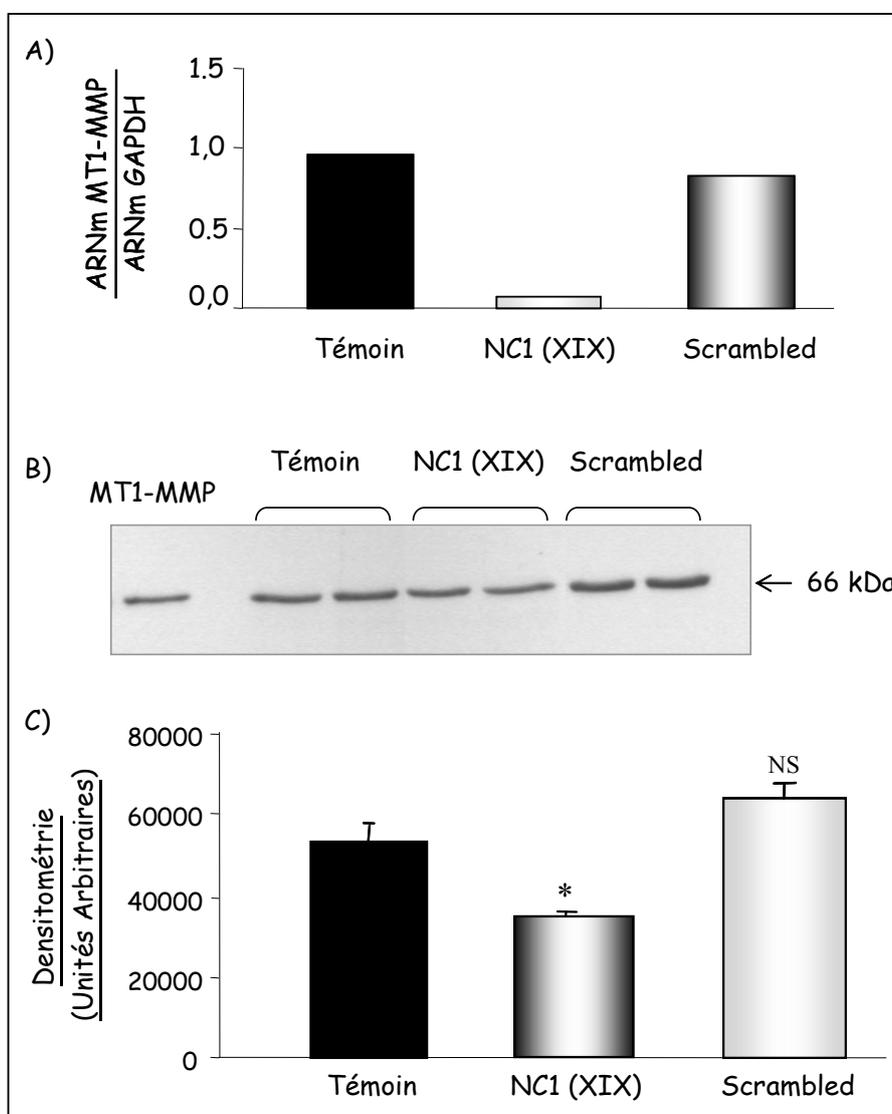


Figure 39 : Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression de la MT1-MMP *in vitro*

Les cellules HMEC-1 sont incubées 24 heures, en présence ou non des peptides NC1(XIX) (30 μM), ou scrambled (30 μM). (A) La couche cellulaire est récupérée et les ARNm sont extraits. Le niveau en ARNm de la MT1-MMP dans les cellules est déterminé par la technique de PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en quantité d'ARNm de MT1-MMP rapportée à la quantité d'ARNm de GAPDH présente dans les cellules. (B) L'étude de l'expression protéique de la MT1-MMP a été réalisée par la technique de Western-blot, sur extraits membranaires (50 μg). Le dépôt de MT1-MMP purifiée (0,3 ng) sert de témoin (C) La quantification densitométrique correspondante a été effectuée à l'aide du logiciel Bio1D. Chaque histogramme représente la moyenne des quantifications pour 2 dépôts protéiques.

Le domaine NC1 du collagène de type XIX possède une activité anti-tumorale, à la fois *in vitro* et *in vivo*, médiée par une forte inhibition des capacités invasives des cellules tumorales, et par un effet anti-angiogénique.

Le domaine NC1 (XIX) peut donc être considéré comme un nouveau membre de la famille des matrikines dérivée des collagènes des membranes basales, exerçant des activités anti-tumorale et anti-angiogénique.

II. EFFETS D'UN CYCLOPEPTIDE DERIVE DE LA TUMSTATINE

Le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(\text{IV})$ du collagène de type IV, encore appelé tumstatine, inhibe la progression tumorale. Il a été démontré que cette inhibition peut être reproduite, *in vitro* et *in vivo*, par la séquence [$\alpha 3(\text{IV})$ 185-203], mais également par le peptide CNYYSNS, correspondant aux résidus 185-191 de la tumstatine (peptide L7). La structure tridimensionnelle de ce peptide, et particulièrement la séquence YSNS 188-191 formant un coude β , est essentielle à son activité biologique (Floquet et coll., 2004).

A partir de ces résultats, et en collaboration avec le Laboratoire de Spectroscopies et Structures BioMoléculaires (UFR Sciences, Reims), dirigé par le Pr. Alix, un cyclopeptide contenant ce coude β contraint dans sa conformation a été conçu. Dans un second temps, nous avons étudié les activités anti-tumorales et anti-angiogéniques de ce cyclopeptide, à la fois *in vitro* et *in vivo*.

II.1. STRUCTURE DU CYCLOPENTAPEPTIDE YSNSG

Le cyclopentapeptide de séquence YSNSG, appelé peptide C5, a une masse moléculaire de 525 Da, et est un analogue peptidique de la séquence 185-191 du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(\text{IV})$. Il possède la séquence YSNS nécessaire à la formation du coude β , indispensable à l'activité biologique, et une glycine qui permet la cyclisation avec la tyrosine. En collaboration avec le Laboratoire d'Isolement, Structure, Transformations et Synthèse de Substances Naturelles (CNRS FRE 2715, Reims), dirigé par le Pr Nuzillard, nous avons démontré, par résonance magnétique nucléaire, que cette structure forme un coude β sur les résidus YSNS, stabilisée par de nombreuses liaisons hydrogène (Figure 40A).

Grâce à des études par simulations de dynamique moléculaire, la stabilité du peptide a été mise en évidence. Le coude β est bloqué dans sa conformation. La figure 40B montre que la flexibilité du peptide est réduite au niveau de la chaîne latérale de la tyrosine (Y_1).

Dans cette partie, nous ne développerons pas les études structurales concernant le cyclopeptide ; seules ses activités biologiques seront détaillées dans la suite de cette étude.

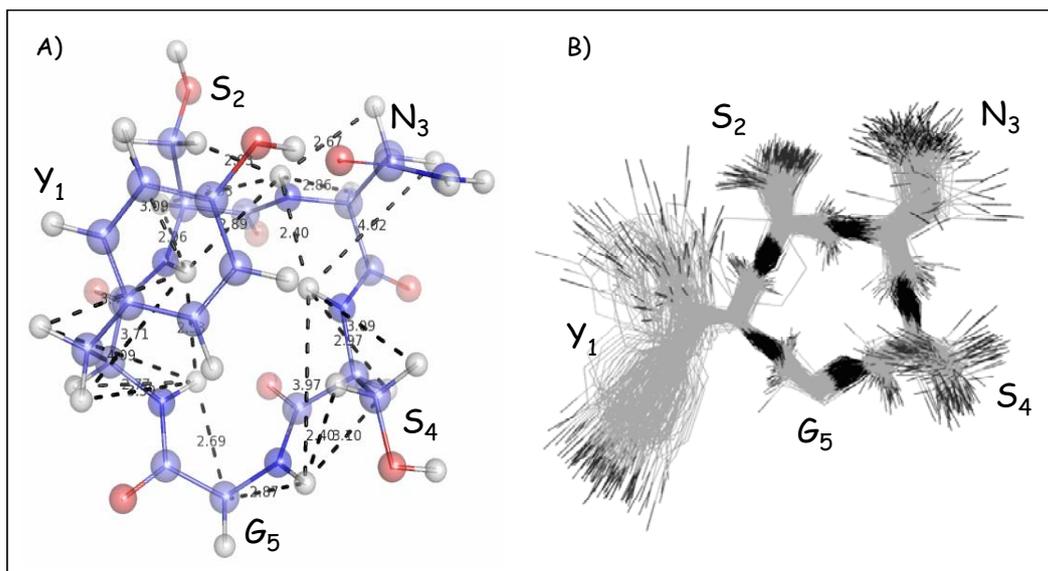


Figure 40 : Structure du peptide YSNSG

(A) Conformation d'énergie minimale du cyclopeptide, établie en accord avec les données obtenues par résonance magnétique nucléaire. (B) Structure stable du cyclopeptide observée durant une trajectoire de dynamique moléculaire de 23 ns. La simulation a été réalisée en boîte d'eau explicite et montre une structure en coude β stable.

II.2. EFFET ANTI-TUMORAL DU PEPTIDE C5

Nous avons étudié les effets du cyclopentapeptide C5 *in vitro*, dans un modèle de mélanome humain (cellules UACC-903). Dans toutes ces expériences, les effets de ce peptide sont comparés à ceux du peptide linéaire natif L7.

II.2.1. Effets du peptide C5 sur l'adhésion cellulaire

La séquence NC1[α 3(IV)185-203] se fixe à la sous unité β 3 de l'intégrine α v β 3 présente à la surface des cellules de mélanome (Pasco et coll., 2000b). Nous avons voulu vérifier, à l'aide de tests d'adhésion cellulaire, si le site de fixation du peptide C5 aux cellules tumorales était identique à celui de la séquence NC1[α 3(185-203)].

L'adhésion des cellules de mélanome est mesurée par coloration des noyaux au violet cristal, 2 heures après le dépôt des cellules pré-incubées ou non avec différents peptides compétiteurs, sur des plaques de culture tapissées de peptides.

La figure 41A représente l'adhésion des cellules de mélanome UACC-903 sur les peptides $\alpha 3(185-203)$, L7 et C5, qui tapissent les plaques de culture. Les peptides L7 et C5 permettent l'adhésion des cellules UACC-903 de manière quasi aussi efficace que le peptide $\alpha 3(185-203)$. L'adhésion cellulaire sur le peptide $\alpha 3(185-203)$ est inhibée de 50 % et 77 %, lorsque les cellules sont pré-incubées avec le peptide $\alpha 3(185-203)$ (100 et 200 μM). Des pré-incubations avec ces mêmes concentrations de peptide $\alpha 3(185-203)$ inhibent l'adhésion des cellules de 13 % et 81 % sur le peptide L7, et de 56 % et 65 % sur le peptide C5.

L'expérience inverse a été réalisée. Les cellules sont pré-incubées avec les différents peptides compétiteurs avant d'être déposées sur le peptide $\alpha 3(185-203)$. L'adhésion sur le peptide $\alpha 3(185-203)$ est inhibée par la pré-incubation des cellules avec les différents peptides compétiteurs. Une pré-incubation avec le peptide C5 (200 μM) induit une inhibition de cette adhésion de 31 % (Figure 41B).

Nous avons également étudié l'effet d'anticorps bloquants, dirigés contre l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (clone LM609), sur l'adhésion cellulaire. Une pré-incubation de 15 minutes des cellules avec l'anticorps anti- $\alpha v\beta 3$ inhibe l'adhésion de 30 % ($p < 0,05$), 37 % ($p < 0,05$) et de 38 % ($p < 0,01$) sur des tapis respectifs de peptides $\alpha 3(185-203)$, L7 et C5. En revanche, la pré-incubation des cellules avec un anticorps anti- $\beta 1$ n'altère pas l'adhésion cellulaire sur les différents tapis peptidiques (Figure 41C).

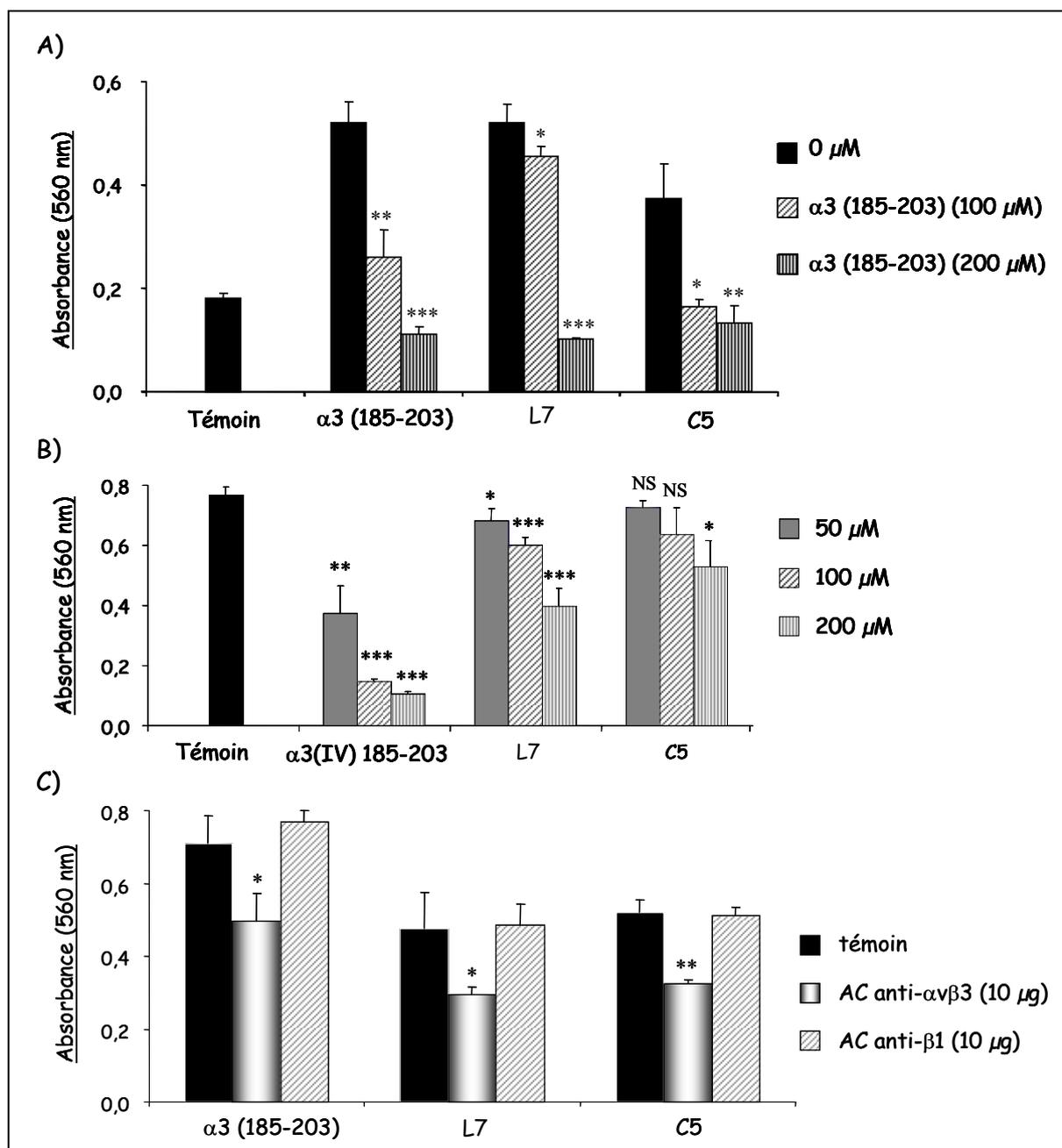


Figure 41 : Effets du peptide C5 sur l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est mesurée en plaques 96 puits tapissées avec 500 ng de peptides, dilués dans du tampon carbonate. 3.10^4 cellules UACC-903, pré-incubées ou non 15 minutes avec différents peptides compétiteurs, sont déposées. Après 2 heures d'incubation à 37°C, les noyaux sont colorés au violet cristal, puis l'absorbance est lue à 560 nm après élution par l'acide acétique 10 %. (A) Les cellules, pré-incubées ou non avec le peptide α3(185-203) (100 et 200 μM), sont déposées sur des tapis de peptides α3(185-203), L7 ou C5. Un témoin correspondant à l'adhésion des cellules sur plastique est réalisé (B) Les cellules sont pré-incubées avec les peptides compétiteurs α3(185-203), L7 ou C5 (50, 100 et 200 μM), puis elles sont déposées sur un tapis de peptide α3(185-203). Un témoin correspondant au dépôt des cellules non pré-incubées est réalisé. (C) Les cellules, pré-incubées ou non avec des AC bloquant anti-αvβ3, ou anti-β1, sont déposées sur des tapis de peptides α3(185-203), L7 ou C5.

II.2.2. Effets inhibiteurs du peptide C5 sur la prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est un paramètre important intervenant dans la progression tumorale. Nous avons donc étudié l'effet du peptide C5 sur la prolifération des cellules de mélanome UACC-903, *in vitro*, soit par coloration des noyaux au violet cristal, soit par test WST-1. Les résultats obtenus avec les 2 techniques sont identiques.

La prolifération des cellules *in vitro* est inhibée de 45 % par le peptide L7, de façon significative. Le peptide C5, à des concentrations de 5, 10 et 20 μM , inhibe également la prolifération des cellules UACC-903 de 27, 29 et 40 % respectivement. Le peptide C5 semble aussi efficace que le peptide L7 (Figure 42).

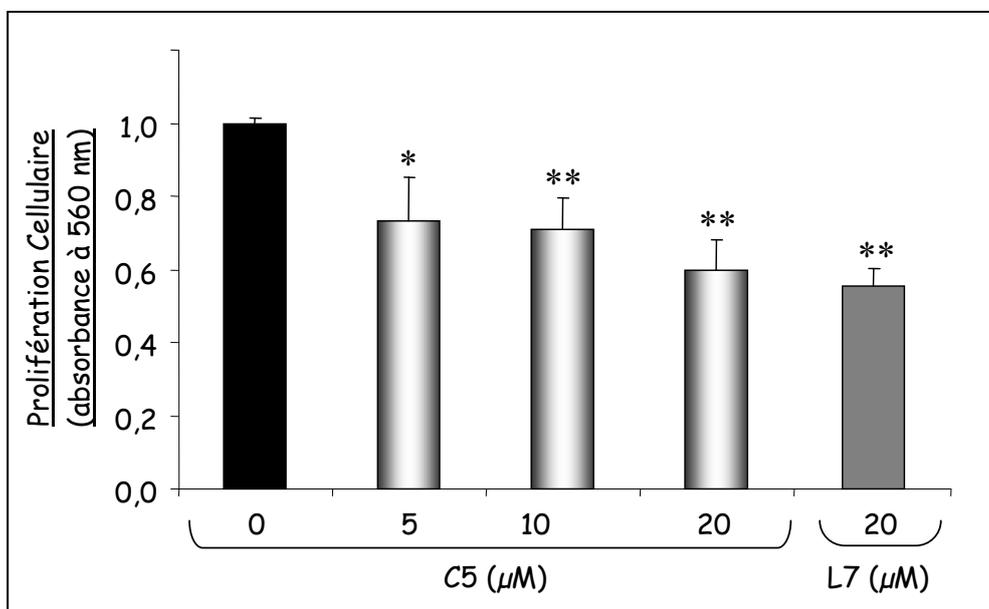


Figure 42 : Effets inhibiteurs du peptide C5 sur la prolifération cellulaire

$2 \cdot 10^4$ cellules UACC-903 sont ensemencées en plaque 24 puits, dans du milieu contenant 5 % de SVF, en présence ou non du peptide C5, à différentes concentrations. Un témoin correspondant à l'incubation des cellules avec le peptide L7 (20 μM) est effectué. La prolifération cellulaire, après 48 heures d'incubation, est estimée par coloration des noyaux au violet cristal.

II.2.3. Effets du peptide C5 sur l'invasion cellulaire

Nous avons analysé l'effet du peptide C5 sur l'invasion des cellules de mélanome, dans un système de chambre de Boyden modifiées, recouvertes de Matrigel®.

Après 72 heures d'incubation, le peptide C5 induit une diminution de 47 % de la migration des cellules UACC-903 au travers d'une membrane basale reconstituée, de façon similaire au peptide L7 (Figure 43).

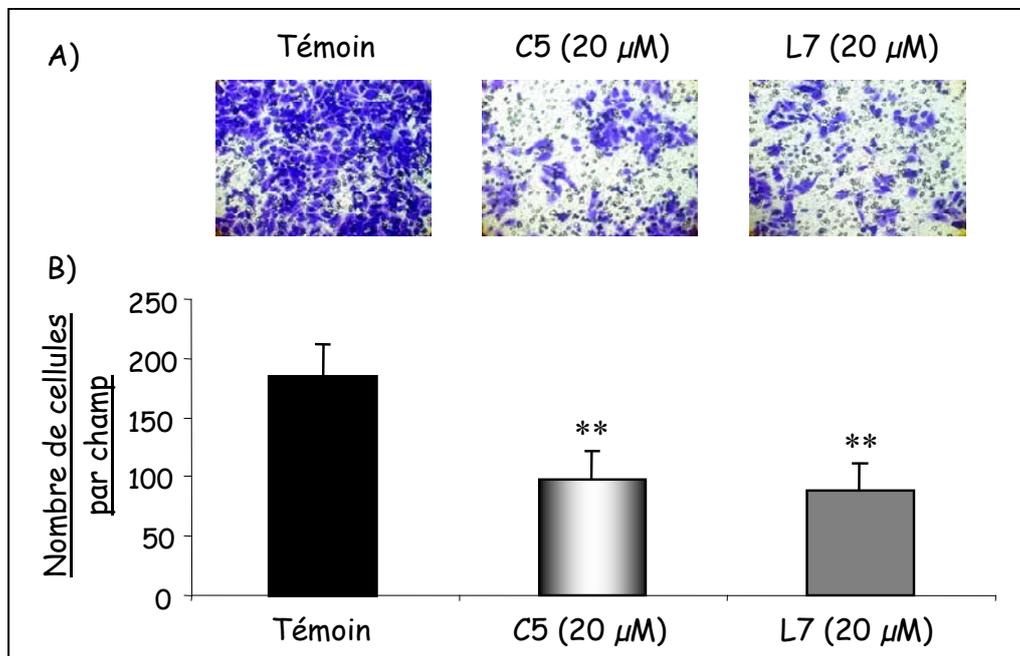


Figure 43 : Inhibition de l'invasion cellulaire par le peptide C5

5.10⁴ cellules UACC-903 sont ensemencées sur la face supérieure de la membrane poreuse de la chambre de Boyden modifiée, recouverte de Matrigel® (30 µg/cm²), dans du milieu contenant de la SAB (0,2 %), en présence ou non de peptide C5 ou L7. Après 72 heures d'incubation, les cellules sont fixées au méthanol, colorées au violet cristallin (A), et comptées sur 4 champs à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 200). Chaque histogramme représente la moyenne du nombre de cellules comptées sur 4 champs, dans 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (B).

II.2.4. Effets du peptide C5 sur les MMPs et les TIMPs

Le peptide C5 inhibe l'invasion des cellules de mélanome *in vitro*. La MMP-2, la MMP-9, et la MT1-MMP étant les principales MMPs impliquées dans la progression du mélanome, nous avons étudié l'influence du peptide C5 sur ces protéases. Nous avons également analysé la sécrétion des inhibiteurs physiologiques de ces enzymes, les TIMPs.

a) Effets sur l'activité gélatinolytique

L'activité gélatinolytique des cellules UACC-903 est étudiée par la technique de zymographie. Après 48 heures d'incubation des cellules en absence de SVF, les milieux de culture et les extraits membranaires sont analysés par zymographie gélatine (la même quantité de protéines est déposée dans chaque piste).

La figure 44 montre les résultats obtenus à partir des milieux de culture. Les cellules UACC-903 sécrètent les MMP-2 et -9 dans les milieux de culture, uniquement sous leur forme latente. Aucune modification significative de sécrétion des pro MMP-9 (92 kDa) et pro MMP-2 (72 kDa) n'est détectée après traitement des cellules par le peptide C5 ou le peptide L7.

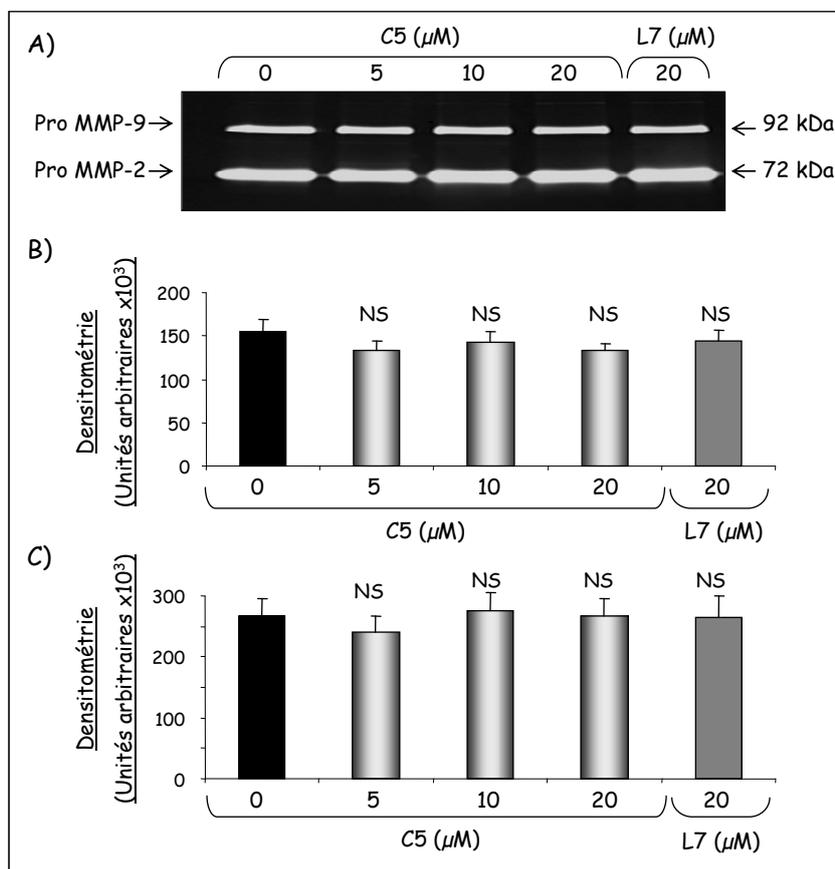


Figure 44 : Effets du peptide C5 sur la sécrétion des gélatinases dans les milieux de culture

Les cellules UACC-903 sont cultivées 48 heures, en présence ou non des peptides C5 et L7, et en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie gélatine (A). Les quantifications densitométriques du zymogramme pour la bande correspondant à la pro MMP-9 (B), et pour la bande correspondant à la pro MMP-2 (C) sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D.

En revanche, dans les extraits membranaires, seule la présence de MMP-2 est détectée, et ce sous 2 formes : une forme active à 66 kDa, et la forme latente à 72 kDa. Le peptide C5 induit une inhibition de 8, 30 et 45 % de l'activation de la pro MMP-2 pour des concentrations respectives de 5, 10 et 20 μM . Le peptide L7 entraîne également une très forte inhibition de l'activation de la pro MMP-2 (Figure 45).

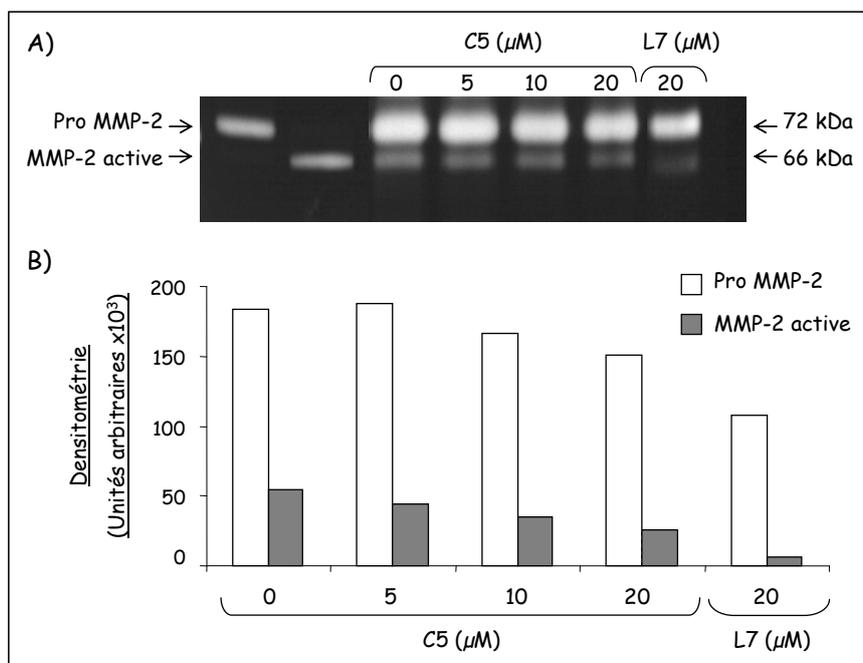


Figure 45 : Effets du peptide C5 sur l'activation de la pro MMP-2 à la surface cellulaire

Les cellules UACC-903 sont cultivées 48 heures, en présence ou non des peptides C5 et L7, et en absence de SVF. Les extraits membranaires, concentrés sur billes de gélatine-agarose, sont ensuite analysés en zymographie gélatine (A). Les quantifications densitométriques du zymogramme sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D.

b) Effets sur l'expression de la MT1-MMP

La MT1-MMP est une protéase qui permet notamment l'activation de la MMP-2 latente (pro MMP-2). L'inhibition de l'activation de la pro MMP-2, observée lors de l'incubation des cellules avec le peptide C5, nous a conduit à étudier l'expression de cette MMP membranaire par Western-blot.

Le peptide C5 inhibe fortement l'expression de pro MT1-MMP, comme le montre l'analyse par Western-blot (Figure 46). L'activation de la pro MT1-MMP est totalement abolie. Les effets inhibiteurs des peptides C5 et L7 ont une intensité comparable.

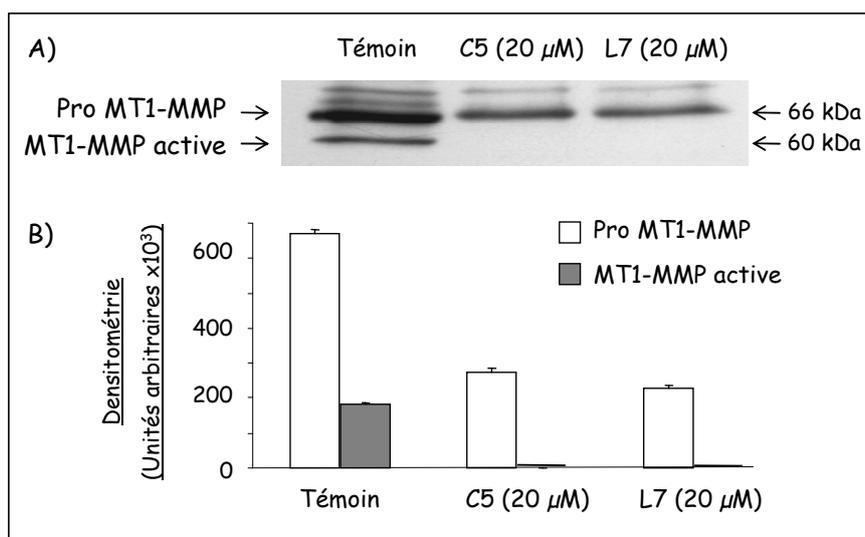


Figure 46 : Inhibition de l'expression et de l'activation de la pro MT1-MMP par le peptide C5

Les cellules UACC-903 sont cultivées 48 heures, en présence ou non des peptides C5 et L7 (20 µM). Les extraits membranaires sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-MT1-MMP (A). Les quantifications densitométriques sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D (B).

c) Effets sur les TIMPs

Nous avons étudié la sécrétion des inhibiteurs physiologiques des MMPs (TIMPs) par analyse des milieux de culture en zymographie inverse. Le zymogramme révèle la présence de 3 protéines de masses moléculaires différentes dans les milieux de culture: une bande à 28,5 kDa, correspondant au TIMP-1 ou au TIMP-3 glycosylé, une bande à 22 kDa, correspondant au TIMP-3 non glycosylé, et une bande à 21 kDa, qui correspond au TIMP-2 (Figure 47A).

La sécrétion des TIMP-1 et -3 n'est pas affectée par l'incubation des cellules avec les peptides C5 et L7. En revanche, une augmentation dose-dépendante de la sécrétion de TIMP-2 est observée dans les cultures incubées avec les peptides C5 et L7 ; cette sécrétion est multipliée par 1,7 lors d'une incubation avec le peptide C5 (20 µM). Une forte augmentation de la sécrétion du TIMP-2 est également obtenue, lors d'une incubation des cellules avec le peptide L7 (20 µM) (Figure 47B).

Comme le montre la figure 47C, ces résultats ont été confirmés par un dosage ELISA avec le coffret Biotrak. En effet, la quantité de TIMP-2 est augmentée dans les mêmes proportions, lorsque les cellules sont incubées avec les peptides C5 et L7.

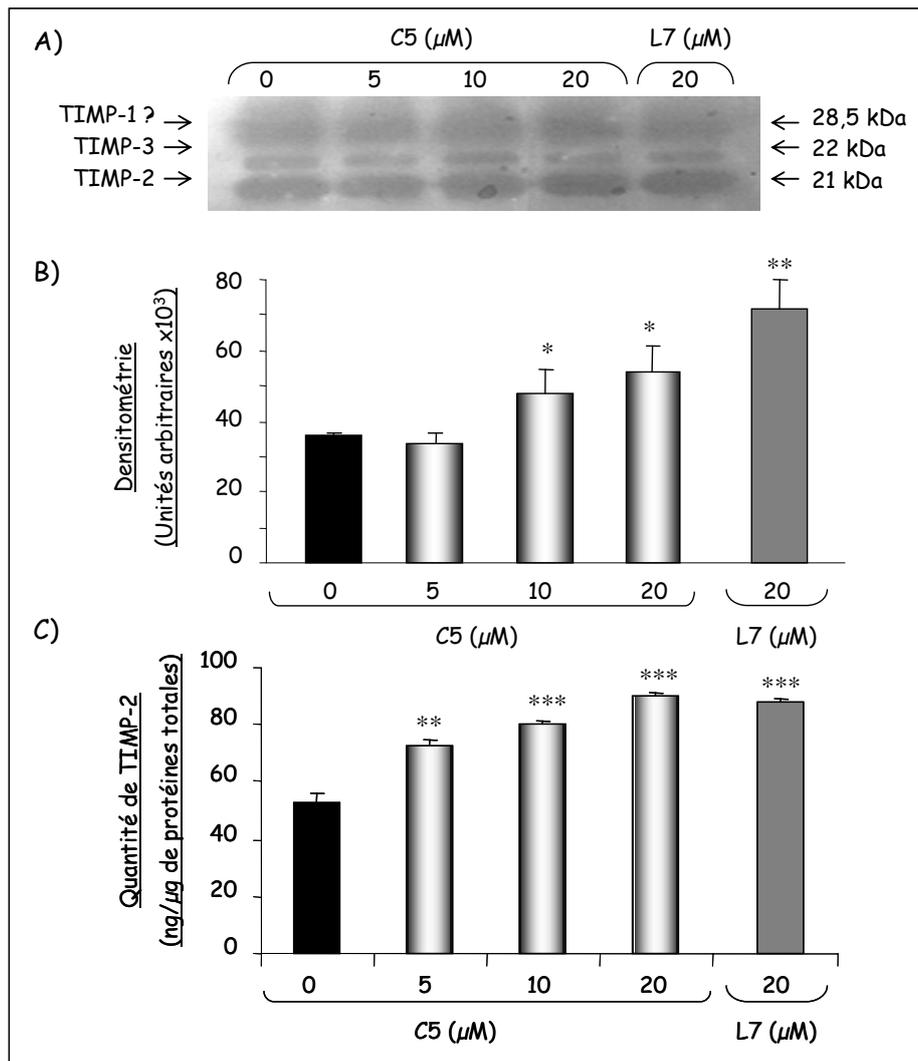


Figure 47 : Effets du peptide C5 sur la sécrétion des TIMPs dans les milieux de culture

Les cellules UACC-903 sont cultivées 48 heures, en présence ou non des peptides C5 et L7, et en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie inverse (A). La quantification densitométrique du zymogramme pour la bande correspondant au TIMP-2 a été effectuée à l'aide du logiciel Bio1D (B). Un dosage ELISA de la quantité de TIMP-2 sur les milieux de culture a été effectué en utilisant un coffret Biotrak (C).

II.2.5. Effets du peptide C5 sur le système d'activation du plasminogène

Nous avons étudié une autre cascade protéolytique impliquée dans la migration des cellules de mélanome : la voie des activateurs du plasminogène.

a) Effets sur les activateurs du plasminogène (uPA et tPA)

Le zymogramme en présence de gélatine et de plasminogène révèle que les cellules de mélanome UACC-903 sécrètent les 2 activateurs du plasminogène uPA et tPA, tPA étant exprimé en plus faible quantité que uPA (Figure 48A). Le traitement des cellules par le peptide C5 induit une diminution dose-dépendante de la sécrétion d'uPA et de tPA. Pour une concentration de 20 μM , le peptide C5 inhibe la sécrétion d'uPA et de tPA respectivement de 56 % et 55 %. Cette inhibition est plus forte que celle observée avec le peptide L7 (40 %, 48 % respectivement) (Figure 48B, 48C).

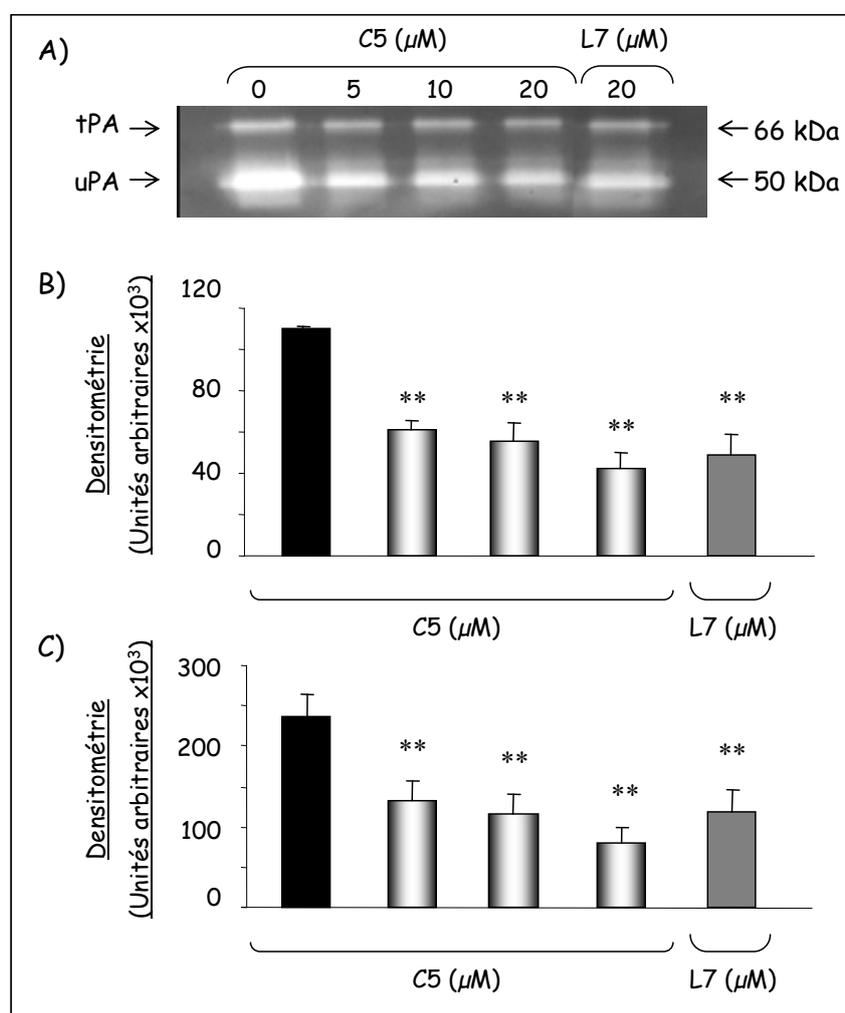


Figure 48 : Effets inhibiteurs du peptide C5 sur la sécrétion des activateurs du plasminogène

Les cellules UACC-903 sont cultivées 48 heures, en présence ou non des peptides C5 et L7, et en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie gélatine-plasminogène (A). Les quantifications densitométriques du zymogramme pour la bande correspondant à tPA (B), et pour la bande correspondant à uPA (C) sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D.

b) Effets sur l'inhibiteur des activateurs du plasminogène PAI-1

PAI-1 est un inhibiteur des activateurs du plasminogène uPA et tPA. Nous avons étudié sa sécrétion dans les milieux de culture, par la technique de Western-blot. Le traitement des cellules par le peptide C5 (20 μM) induit une augmentation de la sécrétion de PAI-1 de 4 fois, contre une augmentation de 3,4 fois avec le peptide L7, à la même concentration (Figure 49).

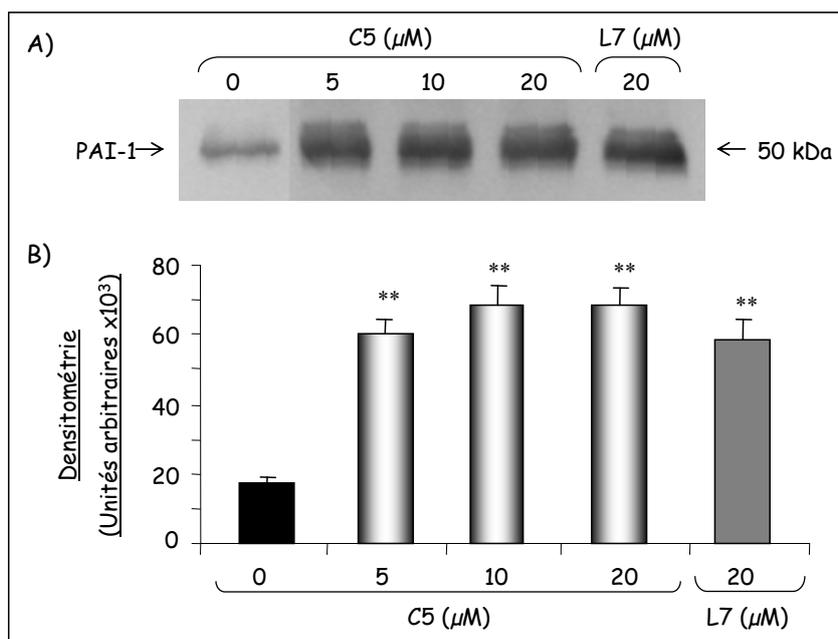


Figure 49 : Stimulation de la sécrétion de PAI-1 par le peptide C5

Les cellules UACC-903 sont cultivées 48 heures, en présence ou non des peptides C5 et L7 (20 μM). Les milieux de culture, concentrés sur colonne Nanosep® 10K, sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-PAI-1 (A). La quantification densitométrique est effectuée à l'aide du logiciel Bio1D (B).

II.2.6. Effets du peptide C5 sur la croissance tumorale *in vivo*

L'ensemble des résultats *in vitro* indique que le peptide C5 inhibe la dégradation de la matrice extracellulaire, ainsi que l'invasion tumorale, de façon aussi efficace que le peptide linéaire L7. Par conséquent, une étude de ses effets *in vivo* a été réalisée.

Les effets du peptide C5 sur la croissance tumorale ont été étudiés dans le modèle de mélanome murin précédemment décrit.

La Figure 50A montre que la pré-incubation seule des cellules tumorales avec le peptide C5 inhibe la croissance tumorale de manière aussi efficace que le peptide L7, 18 jours après l'induction de la tumeur.

Trois injections intra-péritonéales de peptide C5 (10 mg/kg), effectuées au jour 7, jour de l'apparition de la tumeur, ainsi qu'aux jours 9 et 11, induisent une réduction du volume tumoral de 53 % ($p < 0,01$) à J14, versus 42 % avec le peptide linéaire L7 ($p < 0,05$) (Figure 50B). Ces résultats indiquent que le peptide C5, administré de manière systémique, est plus efficace que le peptide linéaire L7.

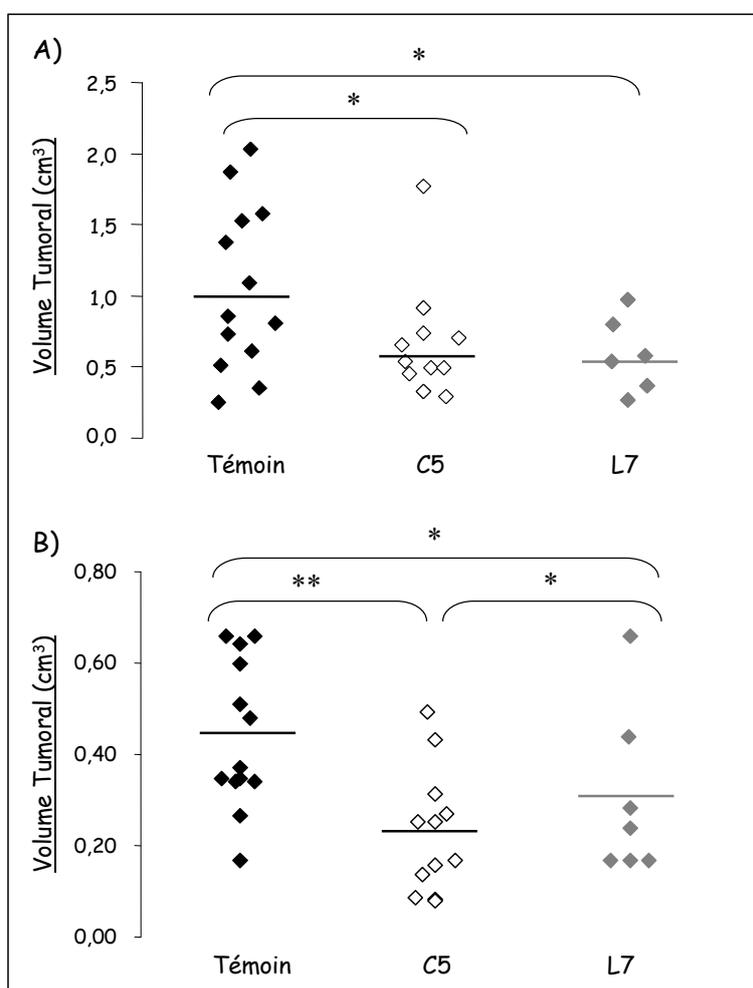


Figure 50 : Inhibition de la croissance tumorale *in vivo* par le peptide C5

$2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées au jour J0 aux souris C57/Bl6, par voie sous-cutanée. (A) Les cellules sont préincubées 15 minutes dans une solution saline (témoin), en présence du peptide C5 (50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), ou du peptide L7 (50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), puis injectées aux souris au jour J0. Les volumes tumoraux sont mesurés à J18. (B) Des injections intra-péritonéales de solution saline (témoin), de peptide C5 (10 mg/kg), ou de peptide L7 (10 mg/kg) sont effectuées aux jours 7, 9 et 11 suivant l'injection des cellules tumorales. Les volumes tumoraux sont mesurés à J14.

II.3. EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE DU PEPTIDE C5

Nous avons démontré que le cyclopeptide C5 inhibe efficacement la progression tumorale *in vivo*, en diminuant les propriétés invasives des cellules cancéreuses. Le développement de la tumeur primaire, ainsi que la dissémination métastatique, impliquent également la mise en place d'une néo-vascularisation au sein de la tumeur. Nous avons étudié les capacités du cyclopeptide C5 à inhiber cette néo-vascularisation par des propriétés anti-angiogéniques, *in vivo* sur des coupes de tumeurs, puis *in vitro* sur des cultures de cellules.

II.3.1. Effets sur la vascularisation de la tumeur *in vivo*

Un marquage immunohistochimique des cellules endothéliales intra-tumorales est réalisé, à l'aide d'un anticorps anti-CD31, sur des coupes de tumeurs provenant de souris traitées ou non par des injections intra-péritonéales de peptide C5 (cf Figure 50). Lors de ces expériences, 3 coupes de 7 tumeurs différentes sont analysées pour chaque groupe (une seule coupe est représentée).

Après immunomarquage avec un anticorps anti-CD31, l'examen histologique des tumeurs met en évidence une diminution importante de la néo-vascularisation, en réponse à un traitement par le peptide C5. En effet, le comptage des vaisseaux, sur l'ensemble des coupes réalisées, permet de montrer une diminution de la vascularisation d'environ 30 %, dans les tumeurs provenant des souris traitées avec le peptide C5, en comparaison avec celles des souris témoin.

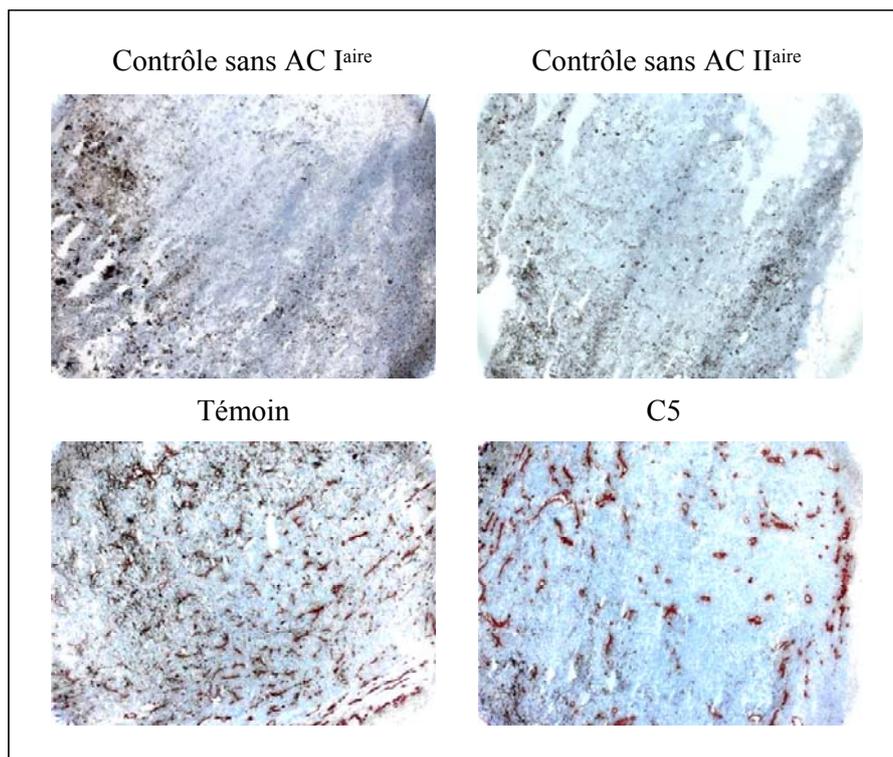


Figure 51 : Inhibition de la néo-angiogenèse *in vivo* par le peptide C5

$2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées au jour J0 aux souris C57/Bl6, par voie sous-cutanée, puis des injections intra-péritonéales de solution saline (Témoin) ou de peptide C5 (10 mg/kg) sont réalisées aux jours 7, 9 et 11 suivant l'injection des cellules tumorales. Les souris sont euthanasiées à J14, et les tumeurs extraites sont soumises à des analyses immunohistochimiques à l'aide d'un anticorps anti-CD31. Des contrôles négatifs sans anticorps primaire, ou sans anticorps secondaire, sont réalisés afin de vérifier la spécificité des anticorps utilisés. Les cellules endothéliales sont marquées en rouge. En parallèle, un contre marquage nucléaire à l'hématoxyline est effectué (grossissement x 100).

II.3.2. Effets sur la formation de pseudotubes par les cellules endothéliales

Après avoir démontré l'activité anti-angiogénique du peptide C5 *in vivo*, nous avons étudié les mécanismes de cette activité sur des cellules endothéliales en culture.

a) Effet inhibiteur du peptide C5

La capacité des cellules endothéliales à former des pseudotubes sur Matrigel® est testée dans diverses conditions. Les cellules HUVEC sontensemencées dans du milieu contrôle (SVF 1 %), contenant ou non un inducteur angiogénique : le VEGF ou le bFGF (30 ng/mL). Après 24 heures d'incubation, les cellules "Témoin" se sont organisées en pseudotubes, dans les 3 milieux. En revanche, lorsque les cellules sont incubées avec le

peptide C5 (20 μ M), leur capacité à s'organiser en pseudotubes est nettement réduite, en présence ou non de VEGF, ou de bFGF (Figure 52A).

La quantification, avec le logiciel Image J, révèle une inhibition de la longueur des pseudotubes, induite par le peptide C5 (20 M), respectivement de 55 %, 53 % et 61 %, dans le milieu contrôle, en présence de VEGF (30 ng/mL), ou de bFGF (30 ng/mL) (Figure 52B).

Le peptide C5 inhibe l'angiogenèse *in vitro*, qu'elle soit ou non induite par les facteurs pro angiogéniques VEGF et bFGF.

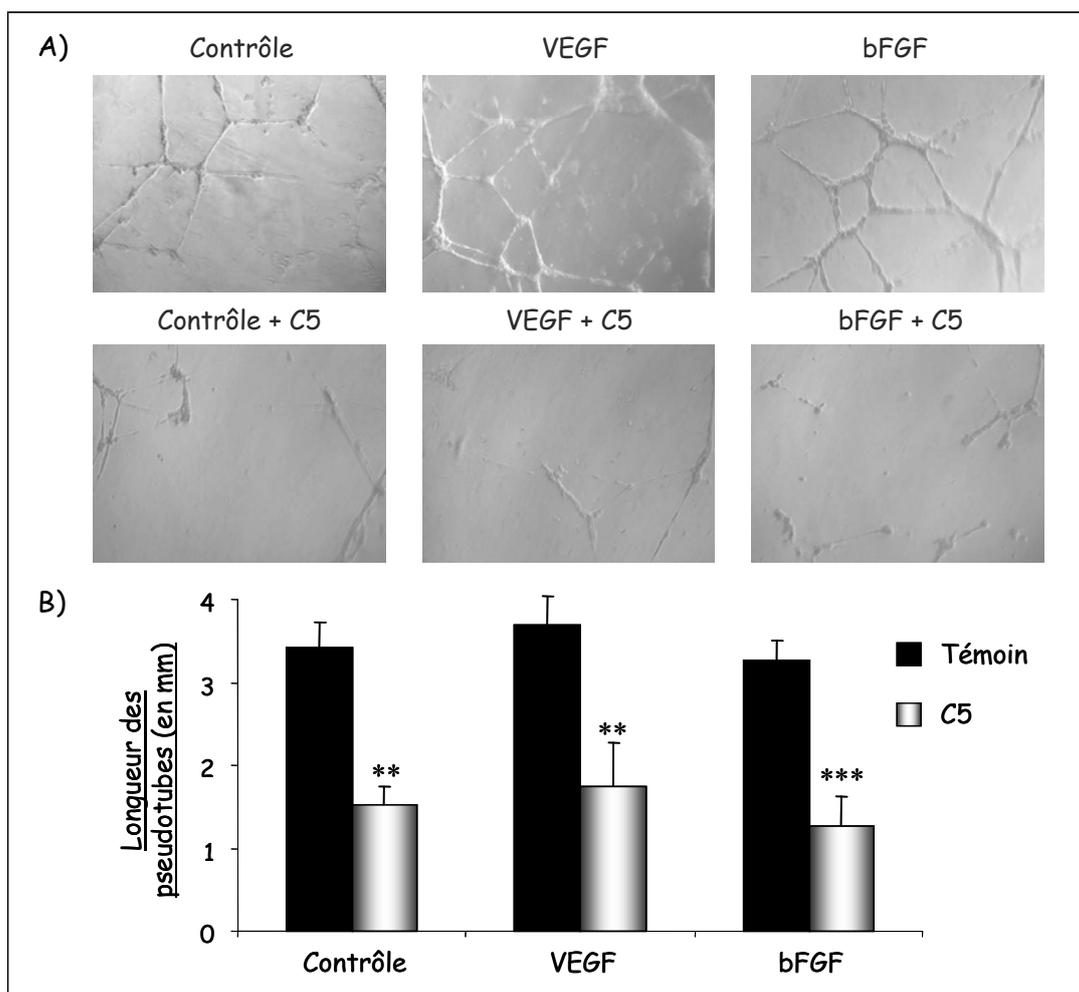


Figure 52 : Inhibition de la formation de pseudotubes *in vitro* par le peptide C5

1.10⁵ cellules HUVEC sontensemencées sur Matrigel® en plaque 24 puits, dans du milieu contrôle (SVF 1 %), contenant ou non du VEGF (30 ng/mL), ou du bFGF (30 ng/mL), en présence du peptide C5 (20 μ M), ou non (Témoin). Après 24 heures d'incubation, les pseudotubes sont observés à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 100) (A). Les histogrammes représentent la moyenne de la longueur des pseudotubes, mesurée sur 4 champs, dans 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (quantification avec le logiciel d'analyse d'images Image J) (B).

b) Effet des inhibiteurs de protéases : aprotinine et galardine

Les MMPs et le système d'activation du plasminogène sont impliqués dans la migration des cellules endothéliales. Afin de déterminer le rôle respectif de ces 2 cascades protéolytiques, nous avons testé l'effet d'inhibiteurs de protéases, spécifiques de chacune d'entre elles, sur la formation de pseudotubes.

L'aprotinine, inhibiteur de sérine protéases, et plus particulièrement du système d'activation du plasminogène, ainsi que la galardine (GM 6001), molécule inhibitrice des MMPs, sont ajoutées au milieu de culture des cellules HUVEC cultivées sur Matrigel®.

L'aprotinine (25 µg/mL) et la galardine (10^{-9} M) induisent une inhibition de la formation de pseudotubes de 43 % et 41 % respectivement (Figure 53). Ces inhibiteurs reproduisent en partie, l'effet du peptide C5 dans ce modèle d'étude.

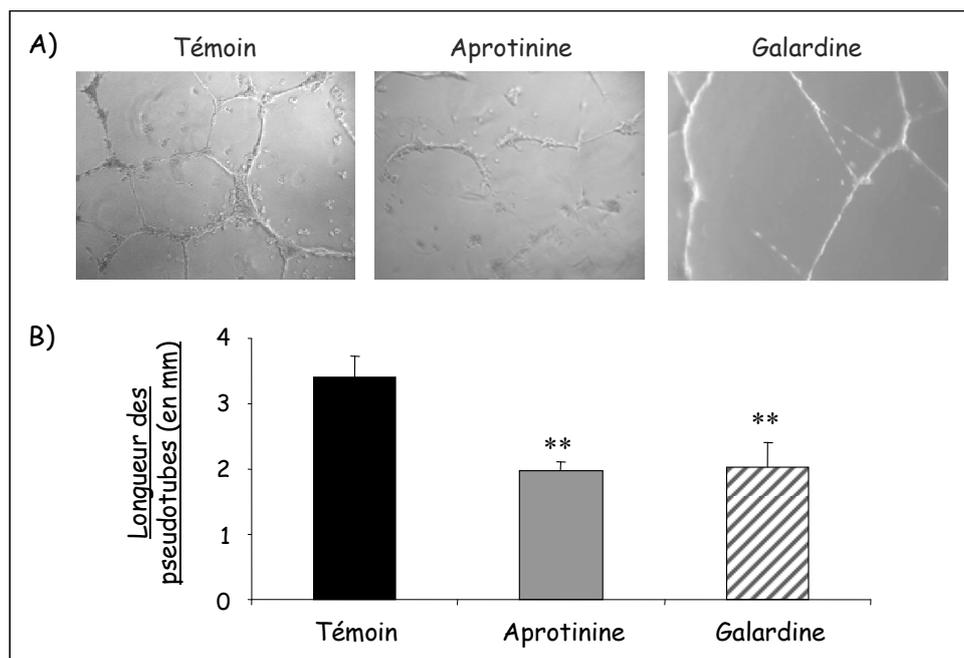


Figure 53 : Inhibition de la formation de pseudotubes *in vitro* par des inhibiteurs de protéases

1.10^5 cellules HUVEC sontensemencées sur Matrigel® en plaque 24 puits, dans du milieu contrôle (SVF 1%), en présence ou non d'aprotinine (25 µg/mL), ou de galardine (10^{-9} M). Après 24 heures d'incubation, les pseudotubes sont observés à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 200) (A). Les histogrammes représentent la moyenne de la longueur des pseudotubes, mesurée sur 4 champs, dans 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (quantification avec le logiciel d'analyse d'images Image J) (B).

II.3.3. Effets du peptide C5 sur la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro*

Nous avons vérifié si l'inhibition d'angiogenèse induite par le peptide C5, *in vitro*, pouvait être imputable à une inhibition de la prolifération des cellules HUVEC, ou bien à un processus apoptotique.

La prolifération des cellules HUVEC dans le milieu contrôle, et dans les milieux contenant un facteur pro angiogénique (VEGF, 30 ng/mL ou bFGF, 30 ng/mL), est estimée après 24 (Figure 54A) et 48 heures (Figure 54B) d'incubation, par réduction du WST-1, ou par coloration des noyaux au violet cristal. La figure 54 montre que le peptide C5, dans les 3 conditions, n'a aucun effet sur la prolifération des cellules HUVEC, après 24 ou 48 heures d'incubation.

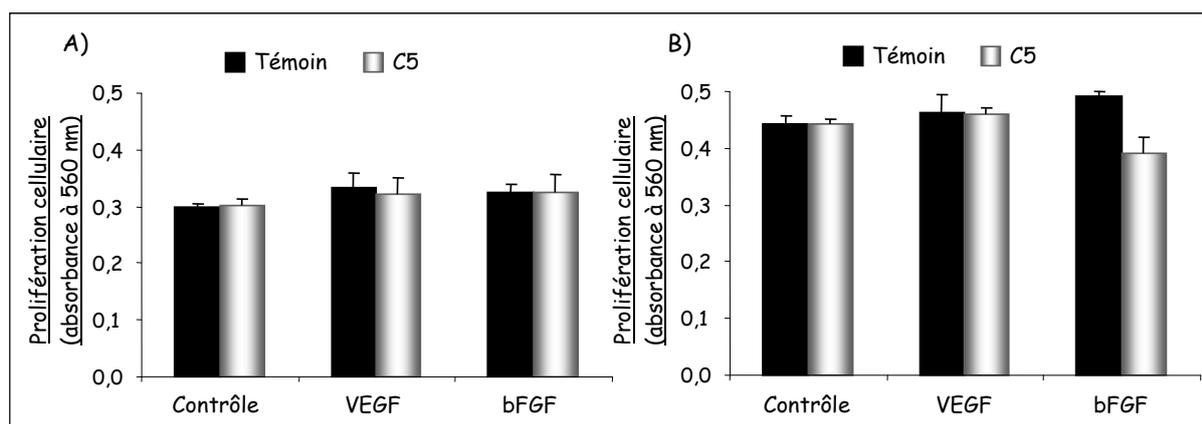


Figure 54 : Absence d'effet du peptide C5 sur la prolifération des cellules endothéliales HUVEC *in vitro*

2.10^4 cellules HUVEC sont ensemencées en plaque 96 puits, dans du milieu contrôle (SVF 1 %), contenant ou non du VEGF (30 ng/mL), ou du bFGF (30 ng/mL), en présence ou non de peptide C5 (20 μ M). La prolifération cellulaire est déterminée par coloration des noyaux au violet cristal après 24 heures (A) et 48 heures d'incubation (B).

Le peptide C5 n'altère pas la synthèse protéique des cellules endothéliales HUVEC. Après 48 heures d'incubation, la synthèse protéique est de 196 μ g de protéines (± 5) par million de cellules, versus 200 μ g de protéines (± 20) par million de cellules traitées avec le peptide C5 (20 μ M).

II.3.4. Effets du peptide C5 sur la migration des cellules endothéliales *in vitro*

Nous avons démontré que le peptide C5, *in vitro*, inhibe l'organisation des cellules HUVEC en pseudotubes sur Matrigel®. En revanche, il n'a aucun effet sur la prolifération et l'apoptose de ces cellules. L'inhibition de formation de pseudotubes pourrait donc être attribuée à une altération des capacités migratoires des cellules endothéliales. Nous avons vérifié cette hypothèse par la technique de blessure cicatricielle, sous différentes conditions.

La figure 55 montre qu'après 48 heures d'incubation dans le milieu contrôle, supplémenté ou non en facteur pro-angiogénique (VEGF ou bFGF, 30 ng/mL), la blessure artificielle, réalisée dans le tapis cellulaire à T0, est totalement refermée. Ces résultats démontrent la capacité migratoire des cellules HUVEC. A l'opposé, lorsque les cellules endothéliales sont incubées avec le peptide C5 (20 µM), la blessure persiste toujours après 48 heures, et ce dans les 3 conditions testées : la migration cellulaire est inhibée. La mesure de la taille de la blessure permet de déterminer une inhibition de la migration cellulaire, induite par le peptide C5, de l'ordre de 80 %, en présence ou non d'inducteurs angiogéniques.

L'effet d'inhibiteurs de protéases sur la migration cellulaire a également été étudié dans ce même modèle. Le traitement des cellules HUVEC par l'aprotinine et la galardine ralentit la migration des cellules de 50 % et 62 % dans le milieu contrôle (Figure 55G, I). Ces inhibiteurs reproduisent partiellement l'effet du peptide C5.

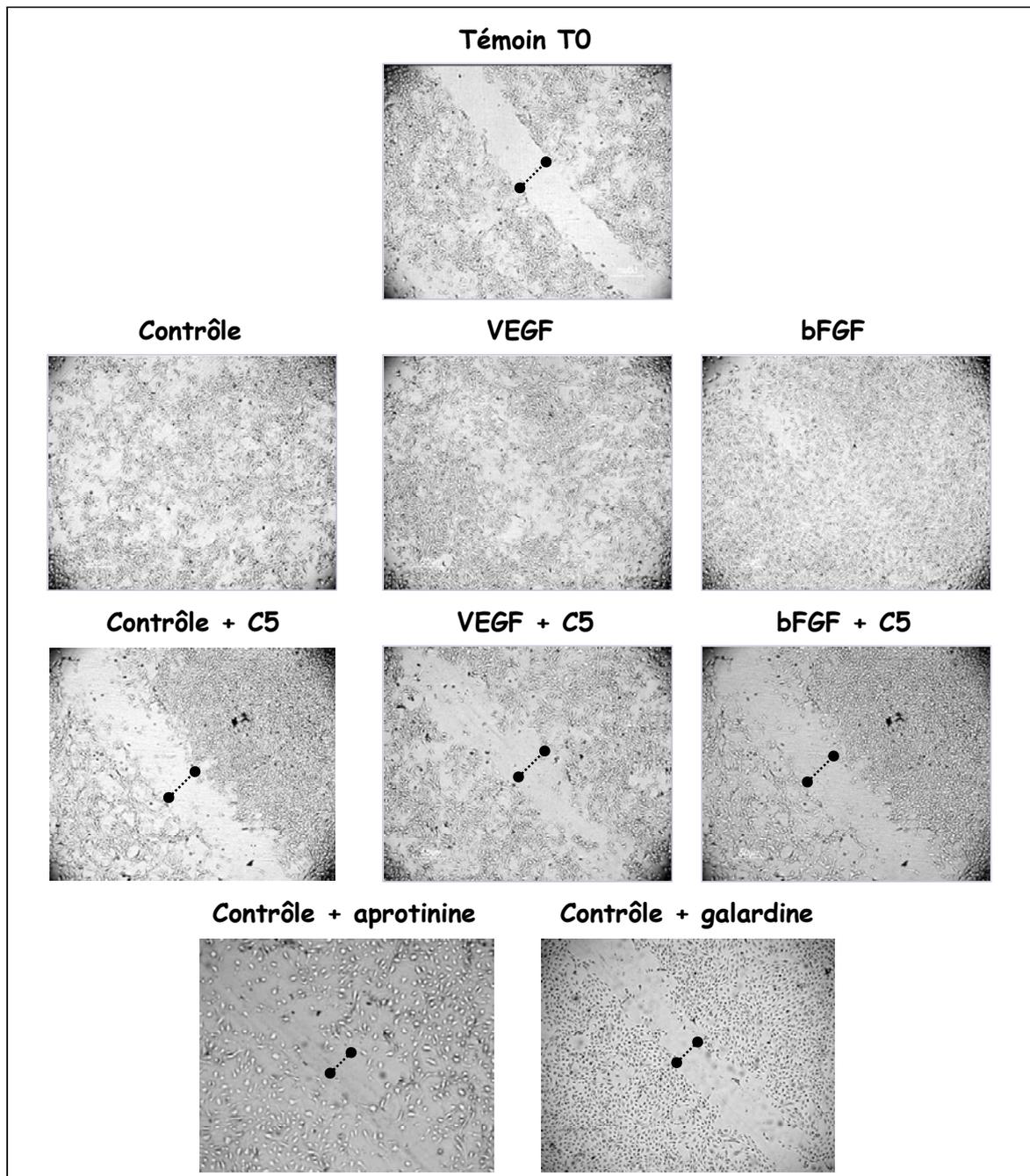


Figure 55 : Inhibition de la migration des cellules HUVEC *in vitro* par le peptide C5 et par des inhibiteurs de protéases

1.10⁵ cellules HUVEC sont ensemencées en plaque 24 puits, dans du milieu complet. Une fois les cellules adhérentes, une blessure artificielle est réalisée dans le tapis cellulaire, à l'aide d'une pointe de pipette, à T0 (A). Le milieu est remplacé par du milieu contrôle (SVF 1 %) supplémenté ou non en VEGF (30 ng/mL), ou en bFGF (30 ng/mL). Les cellules sont incubées seules, avec le peptide C5 (20 µM), de l'aprotinine (25 µg/mL), ou de la galardine (10⁻⁹ M) pendant 48 heures. Elles sont alors observées et photographiées à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 40).

Les activités exercées par le peptide C5, sur les cellules endothéliales, sont identiques, que le milieu soit supplémenté ou non avec les inducteurs angiogéniques VEGF et bFGF. Dans la suite de ce travail, nous étudierons les effets du cyclopeptide sur les cellules incubées uniquement dans le milieu contrôle.

II.3.5. Effets du peptide C5 sur les MMPs et les TIMPs

Les MMP-2 et -9, la MT1-MMP, ainsi que leurs inhibiteurs, les TIMPs, sont très largement impliqués dans les phénomènes migratoires. Nous avons donc étudié l'effet du peptide C5 sur ces molécules.

a) Effets sur l'activité gélatinolytique et sur la sécrétion des TIMPs

La figure 56A montre les résultats obtenus en zymographie gélatine, à partir des milieux de culture. Les cellules HUVEC sécrètent la MMP-2 sous 3 formes : la forme active à 72 kDa, une forme intermédiaire à 68 kDa, et la forme active à 66 kDa. L'incubation des cellules avec le peptide C5 n'induit pas de variation de sécrétion de la MMP-2, quelle que soit sa forme. Aucune sécrétion de MMP-9 n'est détectée dans le milieu des cellules HUVEC.

Le zymogramme inverse révèle la présence de TIMP-1 et de TIMP-2 dans les milieux de culture. Leur sécrétion par les cellules HUVEC n'est pas modifiée par l'incubation des cellules avec le peptide C5 (Figure 56B).

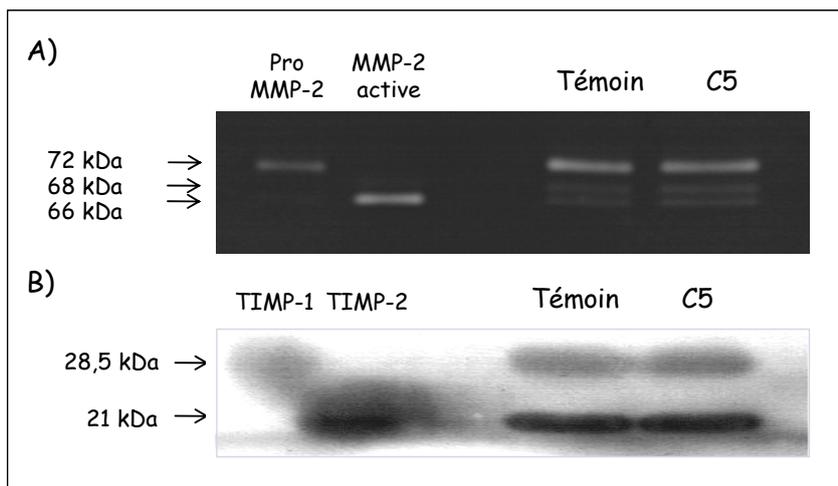


Figure 56 : Le peptide C5 n'a pas d'effet sur la sécrétion de la MMP-2 et des TIMPs

Les cellules HUVEC sont cultivées 48 heures, en présence ou non de peptide C5 (20 μ M), et en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie gélatine (A), et en zymographie inverse (B).

b) Effets sur l'expression de la MT1-MMP

L'expression de la MT1-MMP, analysée par PCR en temps réel, n'est pas modifiée par le peptide C5.

L'analyse en Western-blot des extraits membranaires indique que les cellules HUVEC expriment les formes latente (66 kDa) et active (60 kDa) de la MT1-MMP (Figure 57A). Comme au niveau transcriptionnel, le peptide C5 (20 μ M) n'induit pas de modification significative de l'expression globale de cette protéase. En revanche, lorsque les cellules sont incubées avec le peptide C5, elles expriment une quantité plus importante de forme latente de la MT1-MMP, et une quantité nettement moindre de sa forme active (Figure 57B).

Le cyclopeptide inhibe fortement l'activation de la MT1-MMP.

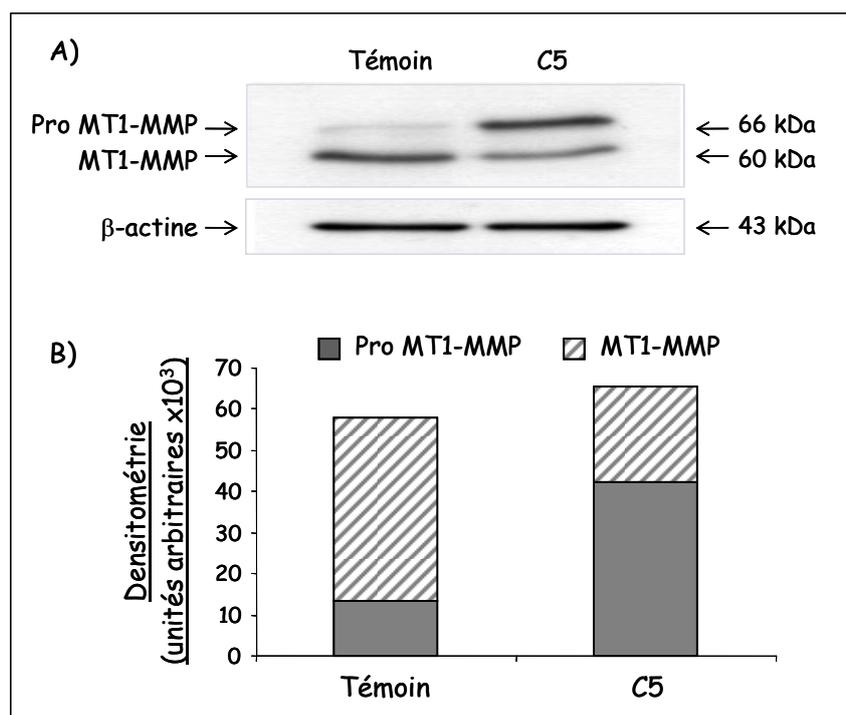


Figure 57 : Inhibition de l'expression et de l'activation de la MT1-MMP par le peptide C5

Les cellules HUVEC sont cultivées 48 heures, en présence ou non de peptide C5 (20 μ M). Les extraits membranaires sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-MT1-MMP. La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine, afin de montrer l'égalité des dépôts (A). Les quantifications densitométriques des formes pro et active de la MT1-MMP sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D (B).

II.3.6. Effets du peptide C5 sur le système d'activation du plasminogène

Le système d'activation du plasminogène, ses inhibiteurs (PAIs), ainsi que le récepteur à l'urokinase (uPAR), jouent un rôle prépondérant dans les processus migratoires, lors de la progression tumorale. Nous avons étudié leur expression et leur sécrétion, pour tenter d'élucider plus précisément les mécanismes responsables de l'inhibition de la migration cellulaire induite par le peptide C5.

a) Effets sur les activateurs du plasminogène et l'inhibiteur PAI-1

Les cellules HUVEC sécrètent les 2 activateurs du plasminogène, uPA et tPA ; la sécrétion de tPA est moins importante que celle d'uPA (Figure 58A). Lors de l'incubation des cellules avec le peptide C5 (20 μ M), la sécrétion de tPA n'est pas modifiée, en revanche, celle d'uPA est réduite de 26 % (Figure 58B).

L'analyse en Western-blot des milieux conditionnés met en évidence l'expression de l'inhibiteur PAI-1 par les cellules endothéliales (Figure 58C). Sa sécrétion reste inchangée suite au traitement des cellules par le peptide C5 (Figure 58D).

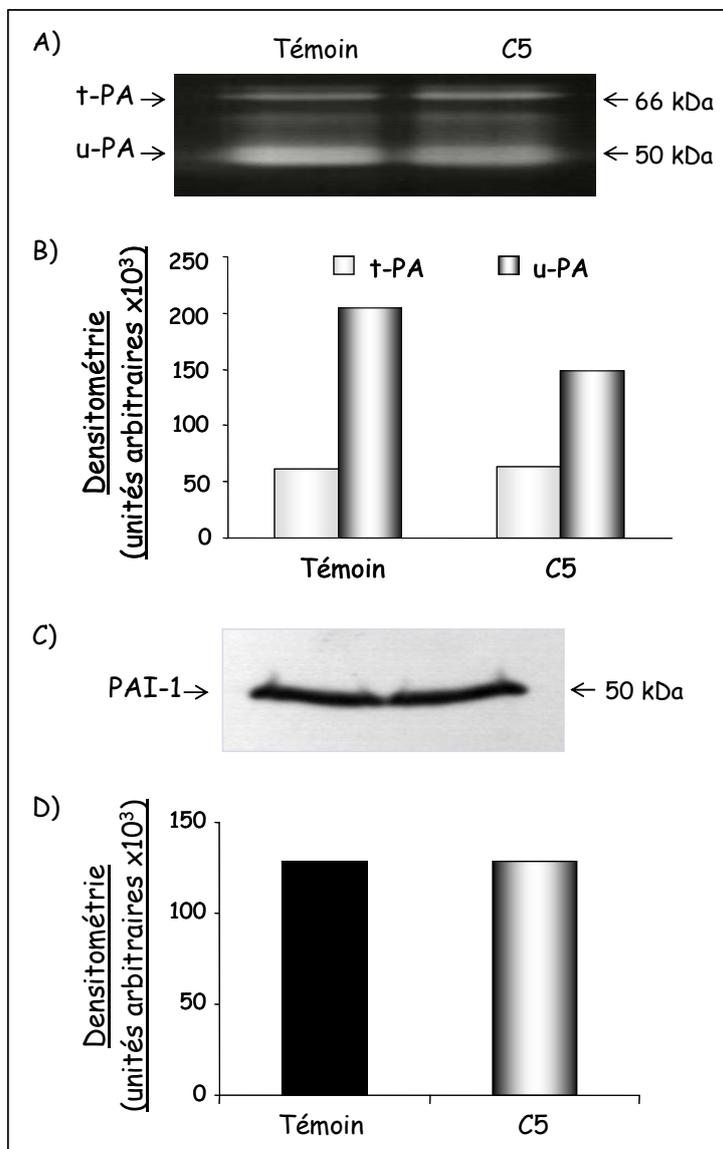


Figure 58 : Effets du peptide C5 sur la sécrétion des activateurs du plasminogène et de l'inhibiteur PAI-1 par le peptide C5

Les cellules HUVEC sont cultivées 48 heures, en présence ou non du peptide C5 (20 μ M), en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie gélatine-plasminogène (A). Les milieux de culture, concentrés sur colonne Nanosep® 10K, sont analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-PAI-1 (C). Les quantifications densitométriques d'uPA, de tPA (B), et de PAI-1 (D) sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D.

b) Effets sur l'activité plasmine

Dans les milieux de culture, l'activité plasmine générée est inhibée de 51 % de manière significative ($p < 0,05$), lors d'une incubation des cellules HUVEC avec le peptide C5.

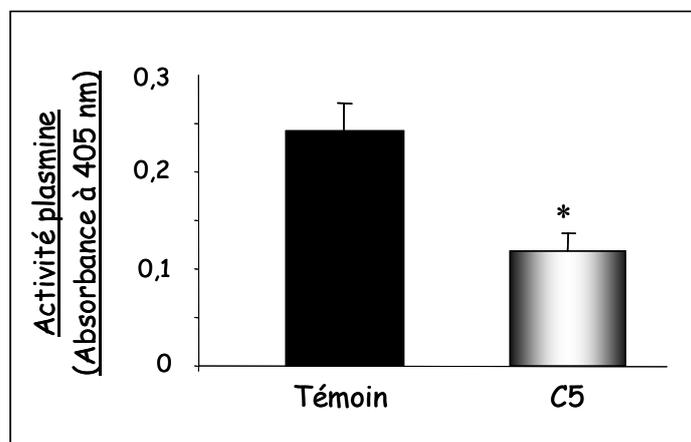


Figure 59 : Inhibition de l'activité plasmine par le peptide C5

Les cellules HUVEC sont cultivées 48 heures, en présence ou non du peptide C5 (20 μ M). L'activité plasmine générée dans les milieux de culture est mesurée par une technique colorimétrique utilisant un substrat synthétique de la plasmine, le S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA).

c) Effets sur le récepteur à l'urokinase uPAR

L'expression d'uPAR à la surface des membranes cellulaires est analysée par Western-blot (Figure 60A). L'incubation des cellules avec le peptide C5 (20 μ M) induit une forte inhibition (60 %) de l'expression d'uPAR (Figure 60B). Cette inhibition peut être corrélée à la diminution de l'activité plasmine précédemment obtenue (Figure 59).

En résumé, l'inhibition de l'activation de la MT1-MMP, ainsi que l'inhibition de l'activité plasmine, peuvent expliquer l'altération des capacités migratoires des cellules induite par le cyclopeptide, lors du processus d'angiogenèse.

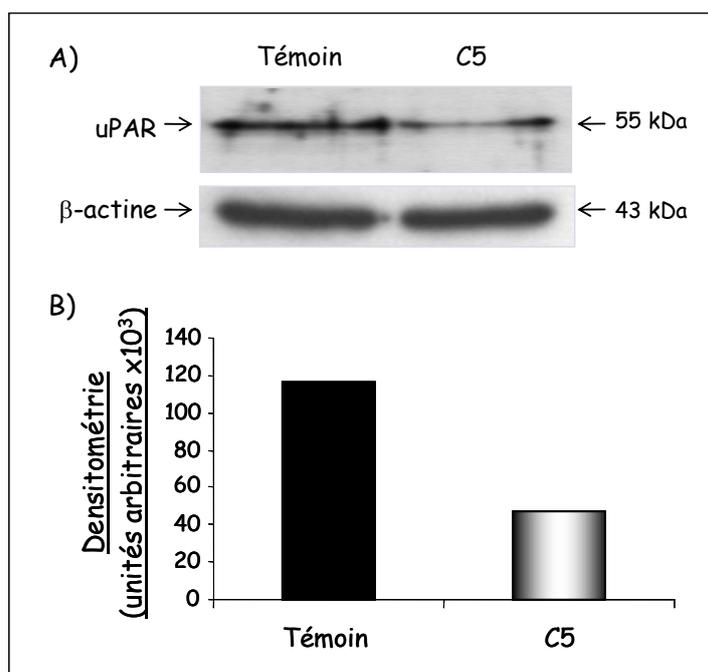


Figure 60 : Inhibition de l'expression de uPAR par le peptide C5

Les cellules HUVEC sont cultivées 48 heures, en présence ou non de peptides C5 (20 μ M). Les extraits membranaires sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-PAI-1. La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine, afin de monter l'égalité des dépôts (A). La quantification densitométrique est effectuée à l'aide du logiciel Bio1D (B).

II.3.7. Effets du peptide C5 sur la distribution des intégrines β 1 et sur l'organisation du cytosquelette

uPAR peut interagir avec les sous-unités β 1 des intégrines situées à la surface des cellules, et ainsi induire l'activation de voies de signalisation, impliquant notamment les protéines du cytosquelette (p125^{FAK}, actine) ; le tout aboutit à la modification des capacités migratoires des cellules (Blasi et Carmeliet, 2002).

Nous venons de démontrer que le peptide C5 inhibe fortement l'expression d'uPAR à la surface des cellules. Nous avons donc étudié la répartition des intégrines β 1, l'expression de la protéine p125^{FAK}, ainsi que la distribution de l'actine F, par immunomarquages des cellules HUVEC (Figure 61).

Les expériences suivantes sont réalisées pour des temps d'incubation des cellules HUVEC, en présence ou non du peptide C5 (20 μ M), de 24 et 48 heures. Les résultats obtenus pour ces 2 temps sont identiques.

Les intégrines β 1 sont localisées au niveau membranaire, et sont essentiellement regroupées au niveau des lamellipodes, structures permettant la migration cellulaire (Figure 61A). Lorsque les cellules sont incubées avec le peptide C5, la distribution de ces intégrines est modifiée : le regroupement, ou “*clustering*”, des sous-unités β 1 au niveau des lamellipodes est inhibé, et leur répartition est majoritairement cytoplasmique (Figure 61B).

Les cellules HUVEC expriment une quantité importante de protéine p125^{FAK}, notamment au niveau des lamellipodes (Figure 61C). La première phosphorylation de FAK, consécutive à l'interaction entre uPAR et une sous-unité β 1 d'intégrine, se fait sur la tyrosine 397. Cette observation témoigne d'un renouvellement accru des plaques d'adhésions focales, indispensables au processus de migration. Le peptide C5 induit une forte inhibition de la phosphorylation de la protéine FAK, comme le montre la figure 61D.

Le cytosquelette d'actine est très développé dans les cellules HUVEC. De nombreuses fibres de stress, résultant de la polymérisation de l'actine, sont présentes au front de migration des cellules, au niveau des lamellipodes (Figure 61E). En revanche, lors du traitement des cellules avec le peptide C5, les fibres de stress disparaissent du front de migration, et deviennent beaucoup plus périphériques, ce qui est caractéristique d'un phénotype non migratoire (Figure 61F).

L'ensemble de ces marquages permet également de mettre en évidence un changement morphologique des cellules endothéliales traitées par le peptide C5 : celles-ci sont plus rondes et n'émettent plus de lamellipodes. Elles perdent leur phénotype migratoire.

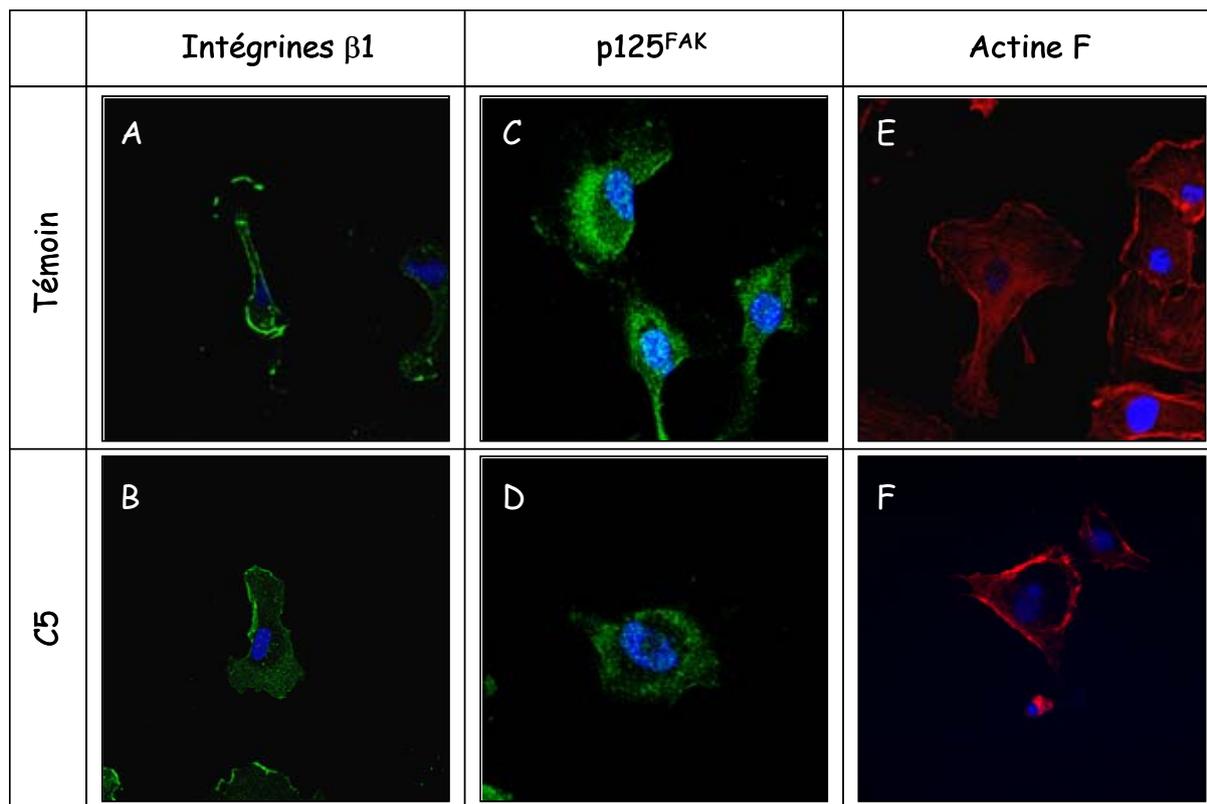


Figure 61 : Le peptide C5 inhibe le *clustering* des intégrines $\beta 1$ et altère l'organisation du cytosquelette des cellules HUVEC

Les cellules HUVEC sont incubées pendant 24 heures dans du milieu contenant le peptide C5 (20 μ M) (B, D, F), ou non (A, C, E).

Les cellules, fixées au méthanol, sont incubées avec un anticorps anti- $\beta 1$ (A et B) ou un anticorps anti-p125^{FAK} (C et D), puis avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor® 488. Des contrôles négatifs avec les cellules seules, ou incubées sans anticorps primaire, sont réalisés afin de vérifier la spécificité des anticorps utilisés.

Les cellules fixées dans du formaldéhyde 3,7 %, et perméabilisées à l'acétone, sont incubées avec de la phalloïdine couplée à l'Alexa fluor® 568 (E et F).

Pour chaque immunomarquage, un contre marquage nucléaire au Hoechst-33342 est réalisé (bleu) pour visualiser le noyau cellulaire. Les cellules sont observées et photographiées à l'aide d'un microscope confocal (grossissement x378).

Cette étude démontre que le cyclopeptide C5 inhibe la progression tumorale en exerçant à la fois des activités anti-tumorales et anti-angiogéniques, *in vitro* et *in vivo*. De par ces propriétés, le peptide C5 peut être considéré comme un agent thérapeutique potentiel dans la lutte contre le mélanome.

III. LES MATRIKINES DU DOMAINE NC1 DU COLLAGÈNE DE TYPE IV

III.1. EFFETS DE LA TUMSTATINE SUR LES CELLULES DE MELANOME HUMAIN *IN VITRO*

Le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV, la tumstatine, et plus particulièrement la séquence 183-232, exerce de puissantes activités anti-tumorales *in vivo* et *in vitro*, dans un modèle de mélanome murin (Pasco et coll., 2004b). Nous avons étudié l'effet de cette même séquence sur les propriétés prolifératives et invasives de cellules de mélanome humain, dans un modèle *in vitro*.

III.1.1. Transfection des cellules de mélanome humain UACC-903 par l'ADNc des domaines NC1[$\alpha 3$ (IV)181-229] et NC1[$\alpha 5$ (IV)181-229]

Nous avons étudié l'effet du domaine NC1[$\alpha 3$ (IV)181-229], dans un modèle de mélanome humain, en induisant sa surexpression par transfection de cellules cancéreuses humaines, et nous l'avons comparé au domaine NC1[$\alpha 5$ (IV)181-229], pour lequel l'absence d'activité anti-tumorale ou anti-angiogénique a été décrite (Petitclerc et coll., 2000). Les transfections stables de cellules de mélanome humain UACC-903 ont été réalisées avec le plasmide p3XFlag-CMVTM-9, contenant l'ADNc codant la séquence 181-229 du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV (clones notés $\alpha 3C$). Les cellules transfectées avec le plasmide vide (clones notés Mock), ou avec de l'ADNc codant la séquence 181-229 du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 5$ du collagène de type IV (clones notés $\alpha 5C$), servent de témoins négatifs lors des expériences.

Les conditions optimales de transfection, avec la lipofectamine 2000TM, ont été préalablement déterminées (voir Matériel et Méthodes). Quarante-huit heures après la transfection des cellules, la sélection des clones positifs se fait par l'ajout de généticine (700 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans le milieu de culture. Après 15 jours de sélection, 12 clones de chaque condition sont isolés et caractérisés.

III.1.2. Criblage des clones cellulaires positifs à la transfection

Dans un premier temps, il a été vérifié, par la technique de RT-PCR, que les cellules UACC-903 n'expriment pas les domaines NC1 des chaînes $\alpha 3$ et $\alpha 5$ du collagène de type IV.

Pour vérifier l'expression des domaines NC1[$\alpha 3$ (IV)181-229], ou NC1[$\alpha 5$ (IV)181-229] par les cellules, nous avons analysé les ARN des clones transfectés, par la technique de RT-PCR. Les amorces utilisées s'hybrident avec l'ADNc codant le marqueur FLAG pour l'une (amorce 1), et en aval du multi-site de clonage pour l'autre (amorce 2) (Figure 62).

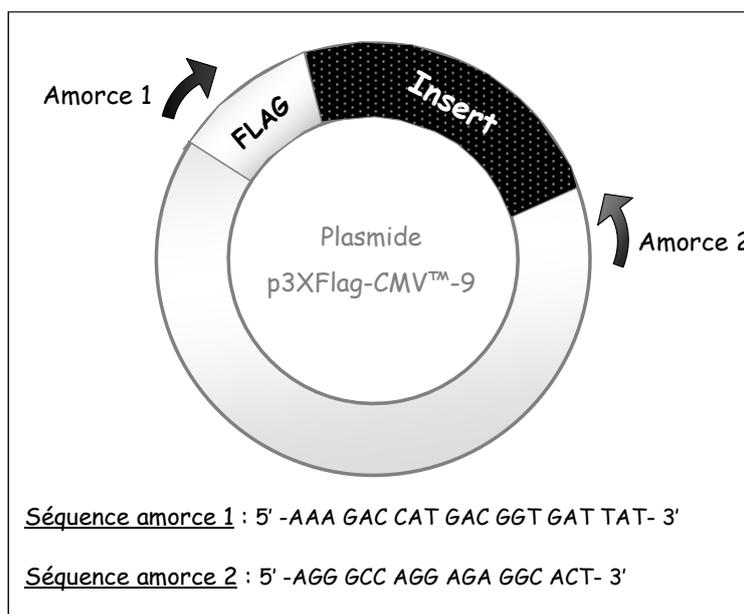


Figure 62 : Séquences et positionnement des amorces utilisées pour le criblage des clones positifs à la transfection

Une électrophorèse en gel d'agarose est ensuite réalisée sur les échantillons d'ADNc ainsi obtenus.

Le gel d'agarose, représenté à la figure 63, montre 2 amplicons de tailles différentes : l'un à 195 pb, qui correspond à l'amplification du plasmide sans l'insert (clones Mock), et l'autre à 336 pb, qui correspond à l'amplification du plasmide contenant la séquence codant le domaine NC1[$\alpha 3$ (IV)181-229] (clones $\alpha 3C$), ou bien la séquence codant le domaine NC1[$\alpha 5$ (IV)181-229] (clones $\alpha 5C$) ; parmi ces clones, nous avons sélectionné les trois qui expriment le plus fortement la séquence d'intérêt.

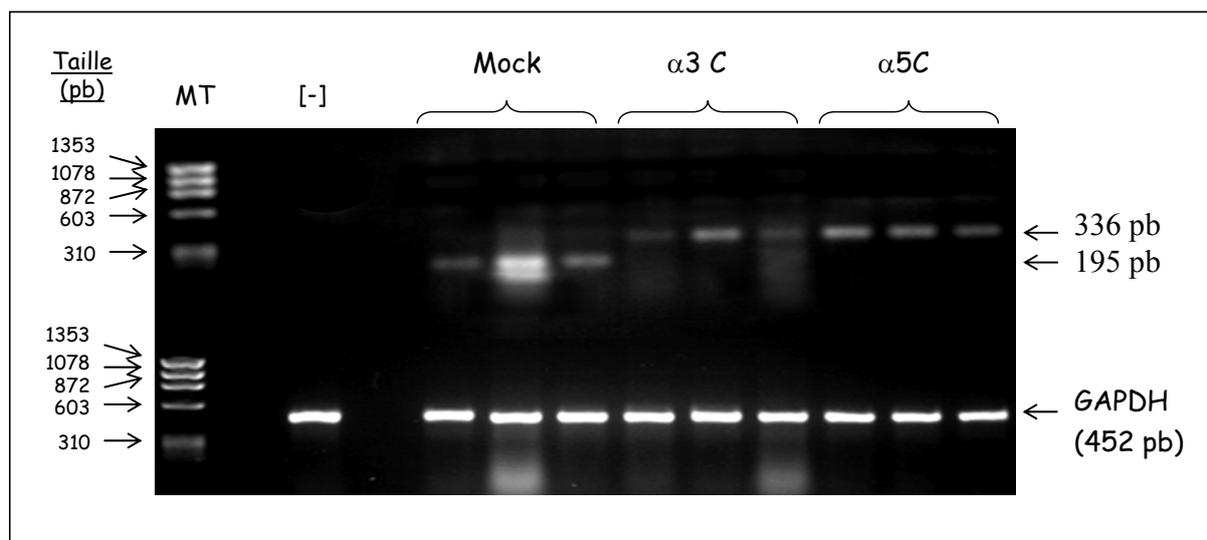


Figure 63 : Vérification par électrophorèse de la présence du plasmide dans les cellules UACC-903 transfectées

Les ARN totaux des cellules transfectées par le plasmide vide (Mock), le plasmide contenant la séquence codant le domaine NC1[α 3(IV)181-229] (α 3C), ou le domaine NC1[α 5(IV)181-229] (α 5C), sont extraits par utilisation du réactif Tri Reagent™. Les ARN totaux des cellules UACC-903 non transfectées servent de témoin négatif ([-]). Après traitement des ARN totaux à la DNase I, les échantillons sont soumis à une RT-PCR, avec le couple d'amorces décrit à la figure 62. Une RT-PCR avec un couple d'amorces spécifique du gène de la GAPDH est également réalisée sur ces mêmes échantillons. Les ADNc sont ensuite analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % (m/v) contenant du bromure d'éthidium. Un marqueur de taille (MT) est déposé sur le gel. La visualisation des bandes est réalisée sous lampe UV. L'expression du gène cible est rapportée à celle du gène domestique.

Lors de cette étude, les expériences sont réalisées sur les trois clones précédemment sélectionnés dans chaque condition. Les résultats décrits représentent la moyenne des résultats obtenus pour les 3 clones.

III.1.3. Effet de la surexpression du domaine α 3C sur la prolifération cellulaire

Nous avons testé les capacités prolifératives des cellules transfectées, pendant 72 heures, soit par coloration des noyaux au violet cristal, soit par test WST-1. Les résultats obtenus avec les 2 techniques sont identiques.

La surexpression du domaine NC1[α 3(IV)181-229] (α 3C) par les cellules tumorales ralentit fortement leur prolifération ; après 48 heures d'incubation, l'inhibition de prolifération cellulaire observée pour les clones α 3C est de 42 % ($p < 0,001$). Les cellules qui surexpriment

le domaine NC1[α 5(IV)181-229] (α 5C) ne présentent pas de modification de leur prolifération (Figure 64).

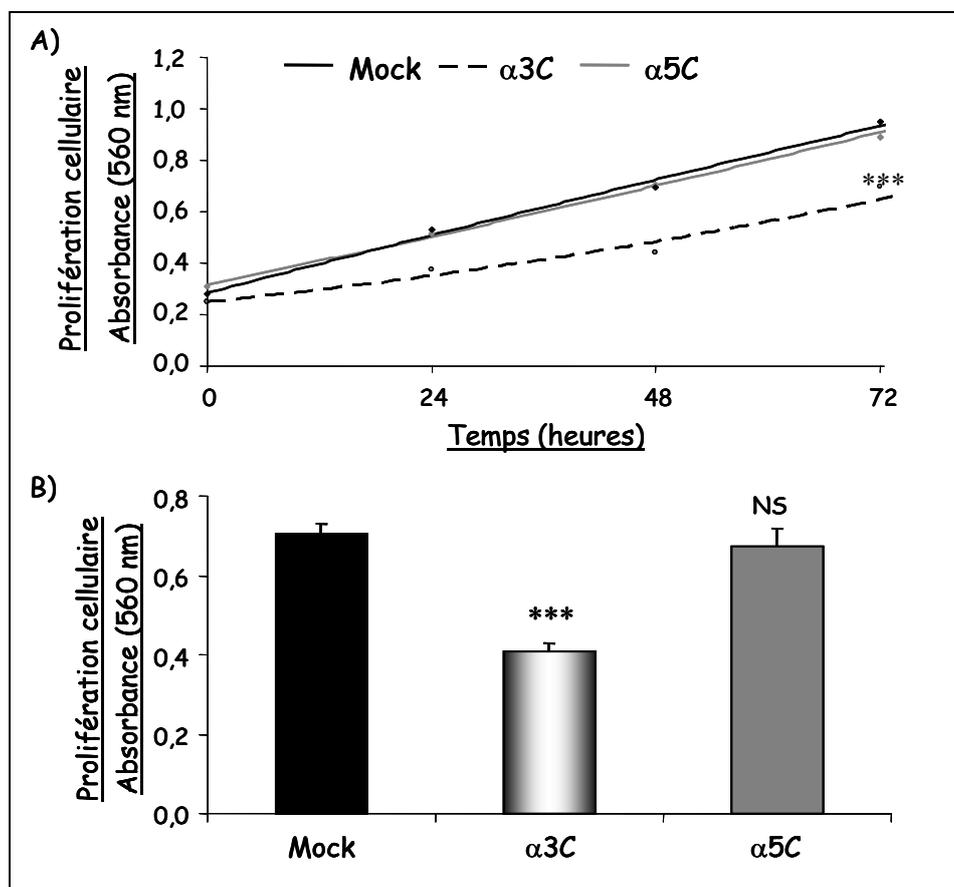


Figure 64 : Effets inhibiteurs de la surexpression du domaine α 3C sur la prolifération cellulaire

2.10^4 cellules Mock, α 3C, ou α 5C sont ensemencées en plaque 24 puits, dans du milieu contenant 5 % de SVF. La prolifération des cellules transfectées est estimée toutes les 24 heures pendant 72 heures, par coloration des noyaux au violet cristal. (A) Cinétique de la prolifération cellulaire pendant 72 heures. (B) Prolifération cellulaire au temps T 48 heures.

III.1.4. Effet de la surexpression du domaine α 3C sur l'apoptose

Nous avons vérifié si l'inhibition de prolifération observée pour les cellules α 3C était due à un phénomène d'apoptose.

L'enzyme PARP-1, protéine de 115 kDa présente en abondance dans le noyau cellulaire, est impliquée dans la réparation de l'ADN. Elle est couramment utilisée comme marqueur de l'apoptose. En effet, dans les cellules en apoptose, le clivage de PARP-1 par la

caspase-3, protéine pro-apoptotique, induit son inactivation et donne un fragment majoritaire de 89 kDa (Duriez et Shah, 1997).

Les cellules sont incubées 48 heures dans le milieu contenant du SVF (5 %), puis les extraits nucléaires sont analysés en Western-blot. La figure 65A montre que les cellules Mock, $\alpha 3C$ et $\alpha 5C$ n'expriment que la forme 115 kDa de la protéine PARP-1. La forme clivée (89 kDa), caractéristique de l'apoptose, n'est pas détectée. La surexpression du domaine $\alpha 3C$ par les cellules cancéreuses n'induit pas leur apoptose.

La condensation de la chromatine, qui intervient lors de l'entrée des cellules en apoptose, peut être visualisée grâce à un marquage des noyaux cellulaires au Hoechst-33342. Les cellules qui surexpriment le domaine $\alpha 3C$ ne présentent pas de signes caractéristiques de l'apoptose, tels que la présence de corps apoptotiques (Figure 65B). Ces résultats corroborent ceux obtenus lors de l'étude de PARP-1.

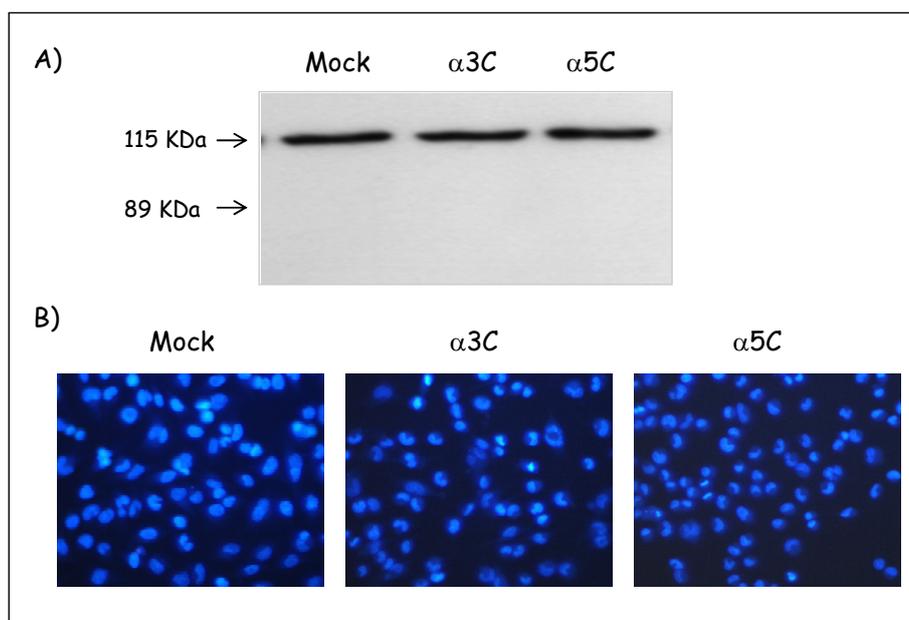


Figure 65 : Effets de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'apoptose

Les cellules Mock, $\alpha 3C$, ou $\alpha 5C$ sont cultivées 48 heures, dans le milieu contenant du SVF (5 %). Les extraits nucléaires sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-PARP-1 (A). $2 \cdot 10^4$ cellules Mock, $\alpha 3C$, ou $\alpha 5C$ sontensemencées en plaque 24 puits, dans du milieu contenant du SVF (5 %), pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes avec du Hoechst-33342 et les noyaux sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence (λ excitation = 488 nm ; λ émission = 460 nm), puis photographiés (grossissement x 200).

III.1.5. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire : p21^{WAF1} et phospho-pRb

Des études antérieures ont montré que l'inhibition de prolifération induite par la surexpression de la séquence 183-232 de la tumstatine, dans un modèle de mélanome murin, était corrélée à une diminution de l'expression de la cycline D1 *in vivo* (Pasco et coll., 2004b). Cette inhibition suggérant un blocage du cycle cellulaire en phase G1, nous nous sommes intéressée aux protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, pour tenter d'élucider, en partie, le(s) mécanisme(s) responsable(s) de l'inhibition de prolifération des cellules de mélanome humain, induite par la surexpression du domaine $\alpha 3C$.

Nous avons étudié l'expression de 2 protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire : p21^{WAF1} et pRb (protéine du Rétinoblastome), sous sa forme hyperphosphorylée. La protéine p21^{WAF1} appartient à la famille des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CDK) ; c'est un inhibiteur potentiel de la progression du cycle cellulaire. A l'opposé, la protéine pRb, sous sa forme hyperphosphorylée, est indispensable au bon déroulement de ce cycle (Meijer, 2003).

Les extraits nucléaires provenant des cellules Mock, $\alpha 3C$ et $\alpha 5C$, cultivées pendant 48 heures dans du milieu contenant du SVF (5 %), sont analysés en Western blot. La surexpression du domaine $\alpha 3C$ par les cellules UACC-903 induit une augmentation de 86 % de l'expression de la protéine p21^{WAF1} (Figure 66A). En revanche, l'expression de la protéine phospho-pRb est inhibée de 30 % (Figure 66B). L'expression de ces 2 protéines n'est pas modifiée lors de la surexpression du $\alpha 5C$.

Ces résultats indiquent que la surexpression de la séquence 181-229 de la tumstatine provoque un blocage du cycle cellulaire, probablement en phase G1, dans les cellules cancéreuses humaines.

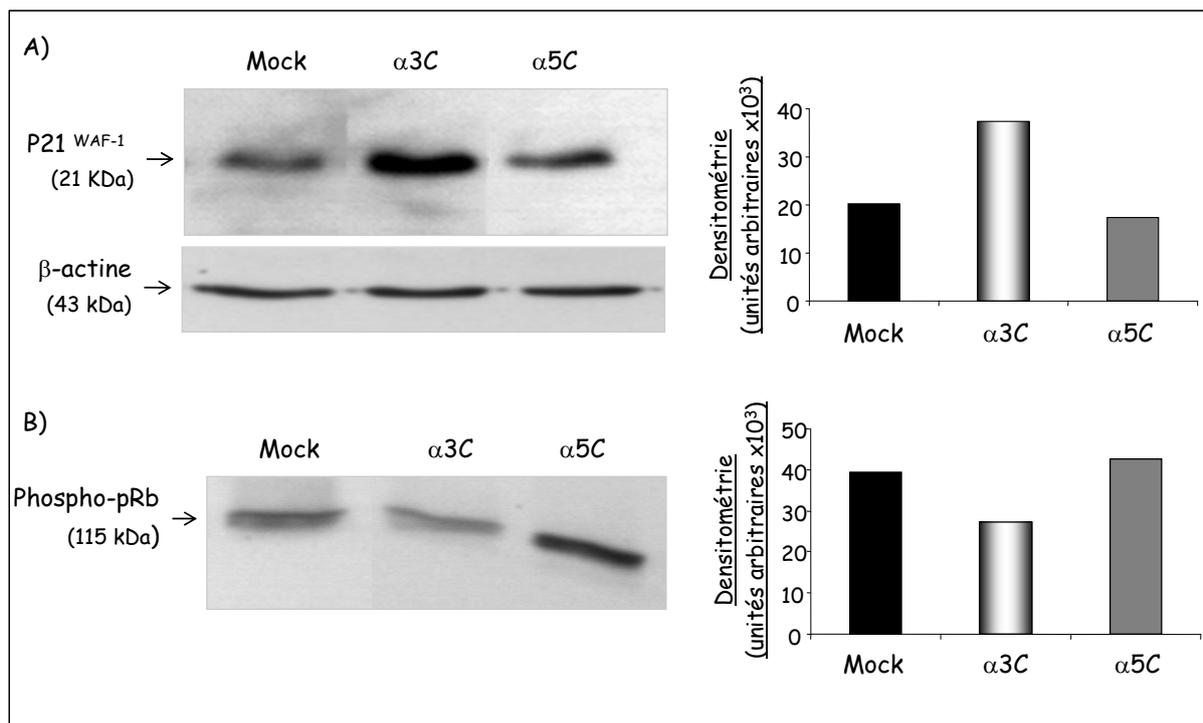


Figure 66 : Effets de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'expression des protéines p21^{WAF1} et phospho-pRb

Les cellules Mock, $\alpha 3C$, ou $\alpha 5C$ sont cultivées 48 heures, dans le milieu contenant du SVF (5 %). Les extraits nucléaires sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-p21^{WAF1}. La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine, afin de montrer l'égalité des dépôts. La quantification densitométrique est effectuée avec le logiciel Bio1D (A). Les extraits nucléaires sont également analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-phospho-pRb. La quantification densitométrique est effectuée avec le logiciel Bio1D (B).

III.1.6. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur les propriétés invasives *in vitro* des cellules UACC-903

L'effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur le phénotype invasif des cellules de mélanome UACC-903, est étudié dans le modèle de chambres de Boyden modifiées, en présence de Matrigel®.

Après 72 heures d'incubation, les cellules $\alpha 3C$ présentent une forte inhibition de 75 % de leurs capacités invasives, comparativement aux cellules Mock et $\alpha 5C$.

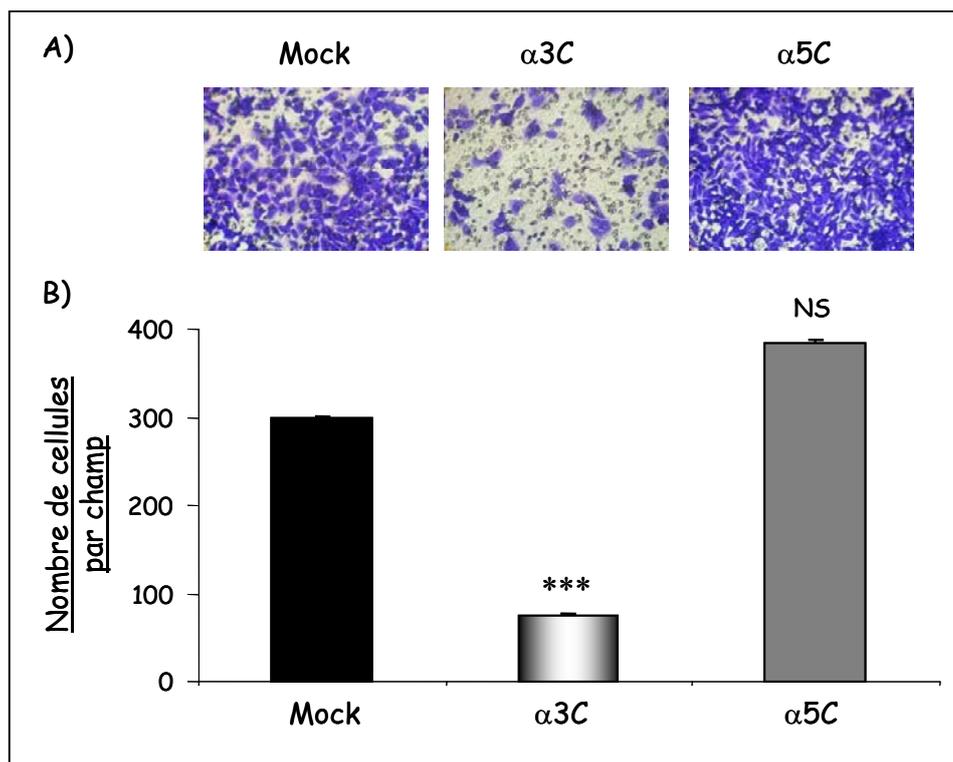


Figure 67 : Inhibition de l'invasion cellulaire par la surexpression du domaine $\alpha 3C$

5.10^4 cellules Mock, $\alpha 3C$, ou $\alpha 5C$ sont ensemencées sur la face supérieure de la membrane poreuse de la chambre de Boyden modifiée, recouverte de Matrigel® ($30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), dans du milieu contenant de la SAB (0,2 %). Après 72 heures d'incubation, les cellules sont fixées au méthanol, colorées au violet cristal (A), et comptées sur 4 champs à l'aide d'un microscope inversé (grossissement $\times 200$). Chaque histogramme représente la moyenne des résultats obtenus pour 3 clones (B).

III.1.7. Effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'activité plasmine

Pour tenter d'élucider les mécanismes responsables de l'inhibition de l'invasion des cellules $\alpha 3C$ sur Matrigel®, nous avons étudié l'activité plasmine de ces clones cellulaires. La surexpression du domaine $\alpha 3C$ n'a pas d'effet sur l'activité plasmine générée dans les milieux de culture des cellules transfectées (Figure 68).

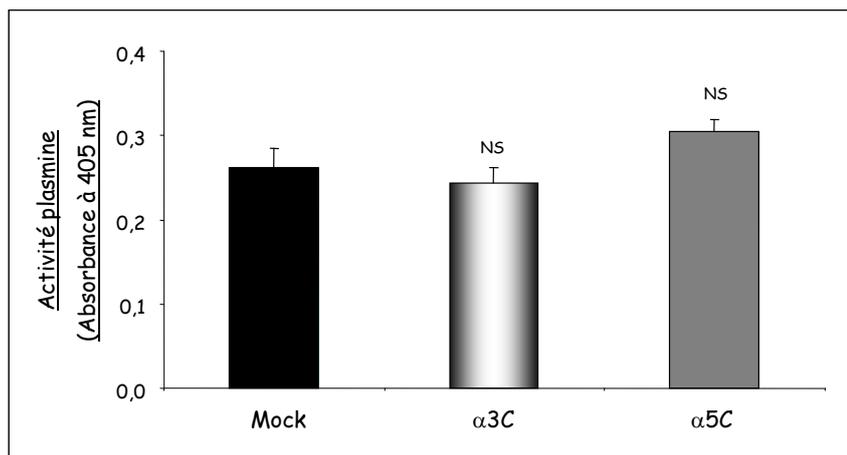


Figure 68 : Absence d'effet de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur l'activité plasmine

Les cellules Mock, $\alpha 3C$, ou $\alpha 5C$ sont cultivées pendant 48 heures dans le milieu dépourvu de sérum. L'activité plasmine générée dans les milieux de culture est mesurée par une technique colorimétrique utilisant un substrat synthétique de la plasmine S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA).

III.1.8. Effets de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ sur les MMPs et les TIMPs

Les MMPs et leurs inhibiteurs, les TIMPs, constituent, avec le système d'activation du plasminogène, l'autre cascade protéolytique fortement impliquée dans les processus d'invasion cellulaire.

a) Effets sur l'activité gélatinolytique

Après 48 heures d'incubation des cellules en absence de SVF, les milieux de culture ainsi que les extraits membranaires sont analysés par zymographie gélatine.

La sécrétion de pro MMP-2, dans le milieu de culture, n'est pas modifiée lors de la surexpression du domaine $\alpha 3C$ par les cellules UACC-903 (Figure 69A). Il en est de même pour la quantité de pro MMP-2 présente dans les extraits membranaires (Figure 69B).

En revanche, l'analyse des extraits membranaires met en évidence une inhibition de l'activation de la pro MMP-2 dans les clones $\alpha 3C$ de plus de 50 %, en comparaison aux clones Mock et $\alpha 5C$ (Figure 69B et C).

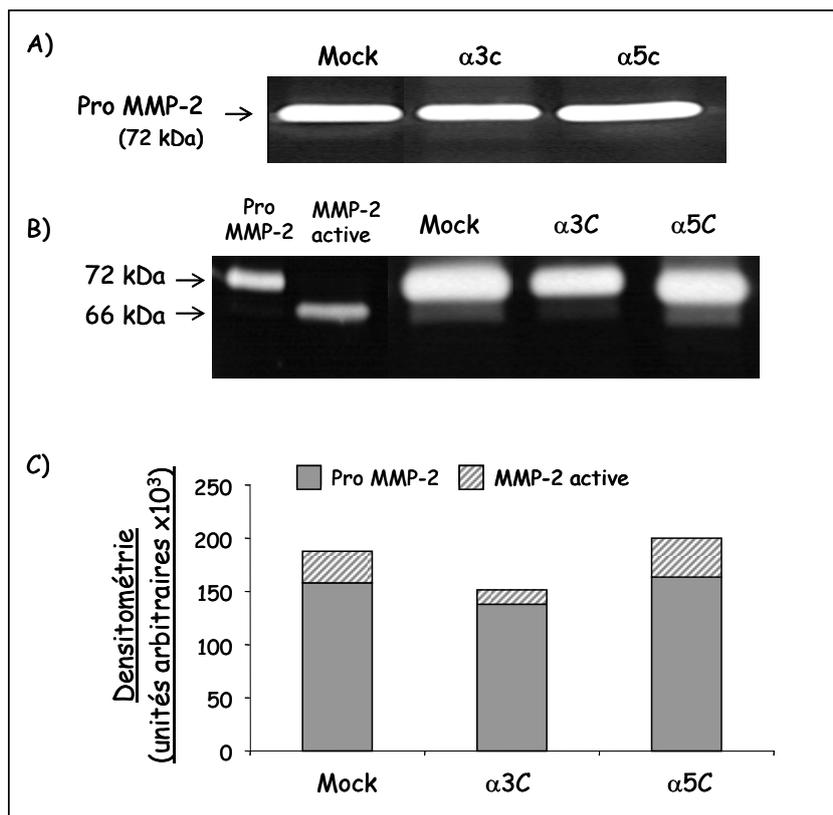


Figure 69 : Effets de la surexpression du domaine α3C sur la MMP-2

Les cellules Mock, α3C, ou α5C sont cultivées pendant 48 heures, en absence de SVF. Les milieux de culture (A), et les extraits membranaires concentrés sur gélatine-agarose (B) sont ensuite analysés en zymographie gélatine. Les quantifications densitométriques correspondant au zymogramme des extraits membranaires sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D (C).

b) Effets sur la sécrétion des TIMPs

Le zymogramme inverse des milieux de culture démontre que les sécrétions du TIMP-2 et du TIMP-3 sont inhibées par la surexpression de la séquence 181-229 de la tumstatine. La sécrétion du TIMP-1 et/ou du TIMP-3 glycosylé est également diminuée (Figure 70).

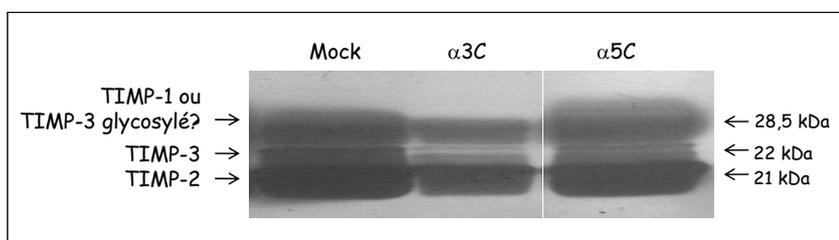


Figure 70 : Inhibition de la sécrétion des TIMPs dans les milieux de culture par la surexpression du domaine α3C

Les cellules Mock, α3C, ou α5C sont cultivées 48 heures, en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie inverse.

c) Effets sur l'expression de la MT1-MMP

Nous avons vu l'importance de la MT1-MMP dans les phénomènes de migration cellulaire. Nous avons étudié l'expression de cette protéase dans les extraits membranaires des cellules UACC-903 surexprimant les différentes séquences d'intérêt.

La figure 71 montre que l'expression globale de la MT1-MMP n'est pas modifiée. En revanche, la présence de la pro MT1-MMP au niveau membranaire est plus importante pour les clones $\alpha 3C$, en comparaison avec les cellules Mock et $\alpha 5C$. Au contraire, l'expression des formes actives de cette protéase est inhibée de plus de 60 %. La surexpression du domaine $\alpha 3C$ par les cellules UACC-903 inhibe l'activation de la pro MT1-MMP, contrairement à la surexpression de la séquence $\alpha 5C$.

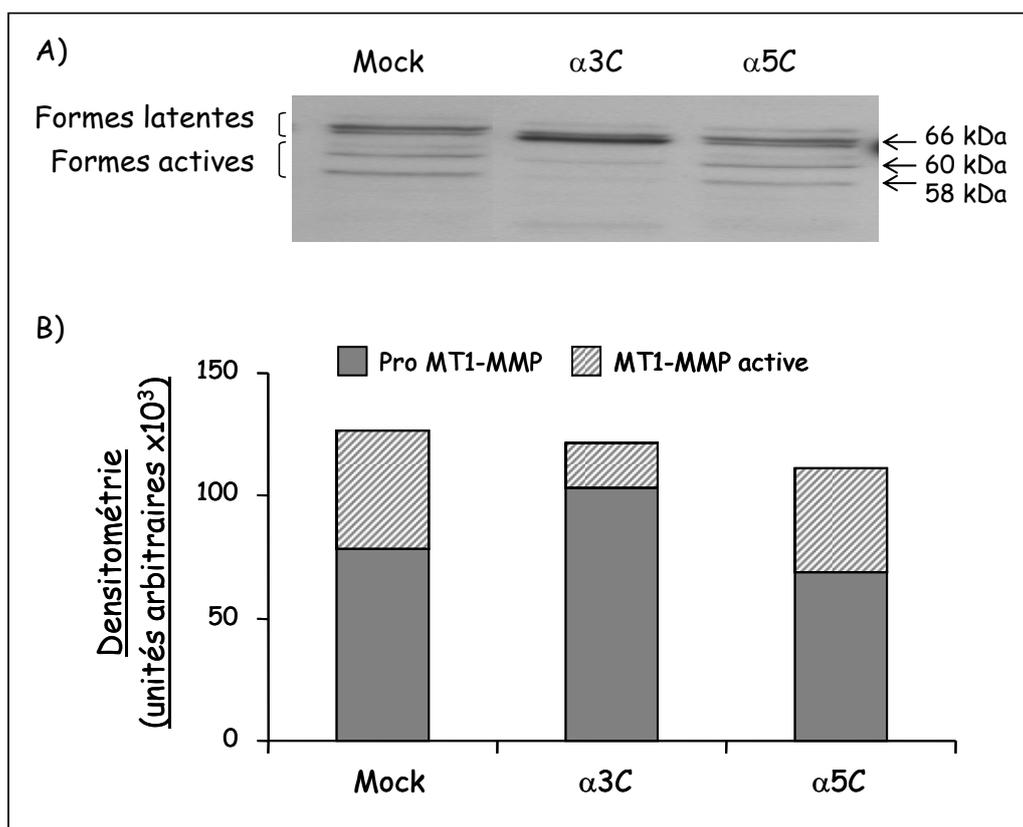


Figure 71 : Inhibition de l'activation de la MT1-MMP par la surexpression du domaine $\alpha 3C$

Les cellules Mock, $\alpha 3C$, ou $\alpha 5C$ sont cultivées pendant 48 heures en absence de SVF. Les extraits membranaires sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-MT1-MMP (A). Les quantifications densitométriques sont effectuées avec le logiciel Bio1D (B).

La surexpression de la séquence 181-229 de la tumstatine entraîne une inhibition des propriétés prolifératives et invasives des cellules cancéreuses, dans ce modèle de mélanome humain ; ceci confirme les résultats précédemment obtenus dans le modèle de mélanome murin (Pasco et coll., 2004b). Au vu des résultats obtenus avec les cultures cellulaires, nous avons envisagé une thérapie génique *in vivo* chez la souris, en induisant la surexpression des séquences d'intérêt.

III.2. ESSAIS THERAPEUTIQUES AVEC LA TUMSTATINE

Pour cette étude, nous avons opté pour la technique d'électroporation *in vivo*, qui permet notamment l'expression à long terme des peptides d'intérêt, après injection de constructions plasmidiques contenant les ADNc codant ces séquences. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Docteur Lluís Mir (Laboratoire de Vectorisation Physique et Chimique de Médicaments et d'Acides nucléiques, CNRS, UMR 8121, Institut Gustave Roussy, Villejuif).

Dans un premier temps, pour tester l'effet de la surexpression de la tumstatine sur la croissance tumorale, la séquence codant le domaine [α 3(IV)181-229] murin est insérée dans le plasmide p3XFlag-CMVTM-9 (noté α 3C). Au cours de la même expérience, nous avons également testé l'effet du domaine homologue de la chaîne α 4(IV). Aucune activité anti-tumorale n'a encore été décrite pour ce domaine NC1 (Petitclerc et coll., 2000). Le plasmide contenant la séquence codant le domaine NC1[α 4(IV)181-229] (noté α 4C) est donc construit. Le plasmide vide (noté Mock) est utilisé comme témoin négatif lors de cette expérience.

L'injection, dans chaque muscle ischio-jambier postérieur des souris C57/Bl6, des plasmides contenant les ADNc codant les séquences d'intérêt, est suivie par l'étape d'électroporation ; les conditions sont décrites dans la partie Matériel et Méthodes. Sept jours après l'électrotransfert, $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées par voie sous-cutanée aux souris. L'évolution de la croissance tumorale des animaux est alors régulièrement contrôlée. Lors des différentes expériences, chaque lot est composé d'au moins 7 souris.

Quatorze jours après l'injection des cellules tumorales, toutes les souris développent une tumeur, quel que soit le type de traitement reçu.

Vingt-et-un jours après l'apparition de la tumeur, le volume tumoral moyen des souris qui ont subi l'électrotransfert du plasmide vide (Mock) est de $0,98 \text{ cm}^3$. Les souris traitées par le plasmide $\alpha 3C$ présentent une forte inhibition de la croissance tumorale dès J16, en comparaison avec les souris traitées par le plasmide Mock. Cette inhibition atteint 46 % à J21. De manière surprenante, la surexpression du domaine $\alpha 4C$ inhibe la croissance tumorale de manière encore plus efficace que la tumstatine. Le volume tumoral est diminué de 83 %, 21 jours après l'apparition de la tumeur (Figure 72).

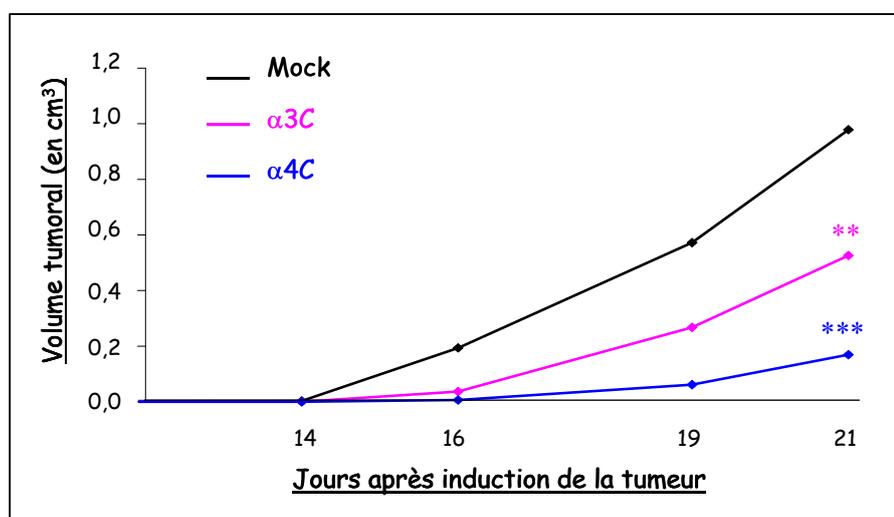


Figure 72 : Inhibition de la croissance tumorale *in vivo* par la surexpression des domaines $\alpha 3C$ et $\alpha 4C$

Le plasmide vide (Mock), le plasmide contenant la séquence codant le domaine $\alpha 3C$, ou la séquence codant le domaine $\alpha 4C$ sont injectés aux souris C57/B16 par voie intramusculaire, avant l'étape d'électroporation, $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées aux souris, par voie sous-cutanée. Les volumes tumoraux sont mesurés à différents temps après induction de la tumeur.

III.3. EFFETS DU DOMAINE NC1[α 4(IV)] SUR LES CELLULES DE MELANOME HUMAIN *IN VITRO*

A la suite de ces expériences, nous avons voulu vérifier, dans le modèle de mélanome humain *in vitro*, si le domaine NC1[α 4(IV)] exerçait effectivement une activité anti-tumorale, contrairement à ce qui avait été publié jusque là. Pour cela, nous avons testé l'effet de la surexpression du domaine NC1[α 4(IV)], complet (noté α 4L) ou partiel (noté α 4C), sur la prolifération et l'invasion des cellules tumorales de mélanome humain.

III.3.1. Transfection stable des cellules UACC-903 et criblage des clones positifs

a) Transfection stable des cellules de mélanome humain par l'ADNc codant les domaines α 4L ou α 4C

Nous avons procédé à la transfection stable des cellules de mélanome humain UACC-903, avec le plasmide p3XFlag-CMVTM-9 contenant l'ADNc codant le domaine NC1 de la chaîne α 4 du collagène de type IV :

- séquence complète : NC1[α 4(IV)1-229] (clones notés α 4L)
- séquence partielle : NC1[α 4(IV)181-229] (clones notés α 4C)

Les cellules transfectées avec le plasmide vide servent de témoin négatif, lors des expériences (clones notés Mock).

Les conditions utilisées pour les transfections sont décrites dans le paragraphe III.1.1.

b) Criblage par la technique de RT-PCR

Nous avons vérifié, par RT-PCR, que les cellules UACC-903 n'expriment pas la chaîne α 4 du domaine NC1 du collagène de type IV.

Pour démontrer l'expression des domaines α 4L et α 4C par les cellules, nous avons analysé, par la technique de RT-PCR, les ARN des clones transfectés. Les amorces utilisées s'hybrident avec l'ADNc codant le marqueur FLAG pour l'une, et en aval du multi-site de clonage pour l'autre, comme précédemment décrit dans la figure 62.

Trois amplicons de tailles différentes sont visualisés sur le gel d'agarose : un à 195 pb, qui correspond à l'amplification du plasmide sans l'insert (clones Mock), un autre à 336 pb, qui correspond à l'amplification du plasmide contenant la séquence codant le domaine $\alpha 4C$, et un dernier à 882 pb, qui correspond à l'amplification du plasmide contenant la séquence codant le domaine $\alpha 4L$ (Figure 73). Les trois clones qui expriment le plus fortement la séquence d'intérêt sont sélectionnés pour la suite de l'étude.

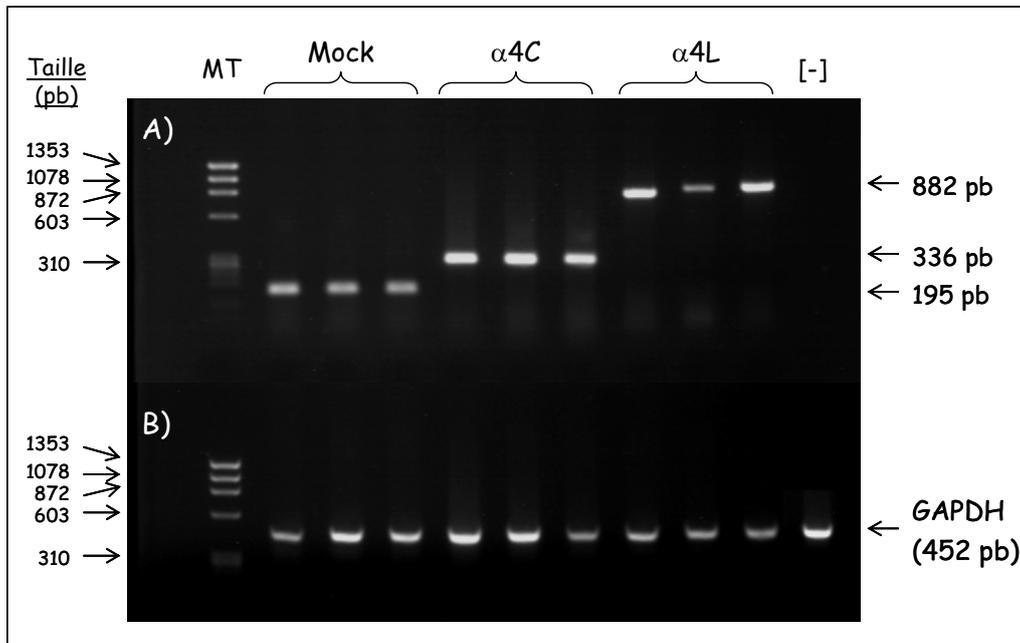


Figure 73 : Vérification par électrophorèse de la présence des inserts dans les cellules UACC-903 transfectées

Les ARN totaux des cellules transfectées avec le plasmide vide (Mock), le plasmide contenant la séquence codant le domaine $\alpha 4C$, ou le domaine $\alpha 4L$, sont extraits par utilisation du réactif Tri Reagent™. Les ARN totaux des cellules UACC-903 non transfectées servent de témoin négatif (-). Après traitement des ARN totaux à la DNase I, les échantillons sont soumis à une RT-PCR, avec le couple d'amorces décrit à la figure 62. Une RT-PCR avec un couple d'amorces spécifique du gène de la GAPDH est également réalisée. Les ADNc sont ensuite analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % (m/v) contenant du bromure d'éthidium. Un marqueur de taille (MT) est déposé sur le gel. La visualisation des bandes est réalisée sous lampe UV. L'expression du gène cible est rapportée à celle du gène domestique.

c) Criblage par immunocytochimie

Nous avons également vérifié l'expression protéique des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$, par les cellules UACC-903, en réalisant des immunomarquages grâce à un anticorps dirigé contre la séquence FLAG des protéines [$\alpha 4(IV)$] de fusion.

Après fixation au formaldéhyde 3,7 %, les cellules cultivées pendant 48 heures sont incubées avec l'anticorps anti-FLAG, puis avec un anticorps secondaire, spécifique du premier et couplé à l'Alexa Fluor 488. Les cellules sont observées grâce à un microscope inversé à fluorescence.

La spécificité des anticorps est vérifiée soit en effectuant les immunomarquages en absence d'anticorps primaire, soit en marquant les cellules non transfectées ; ces marquages sont négatifs.

L'observation, en microscopie à fluorescence, des cellules transfectées montre un marquage intense des clones cellulaires Mock, $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ précédemment sélectionnés. Ces cellules transfectées expriment toutes le domaine d'intérêt. Le marquage cellulaire est homogène, ce qui traduit une localisation essentiellement cytoplasmique de la protéine de fusion (Figure 74).

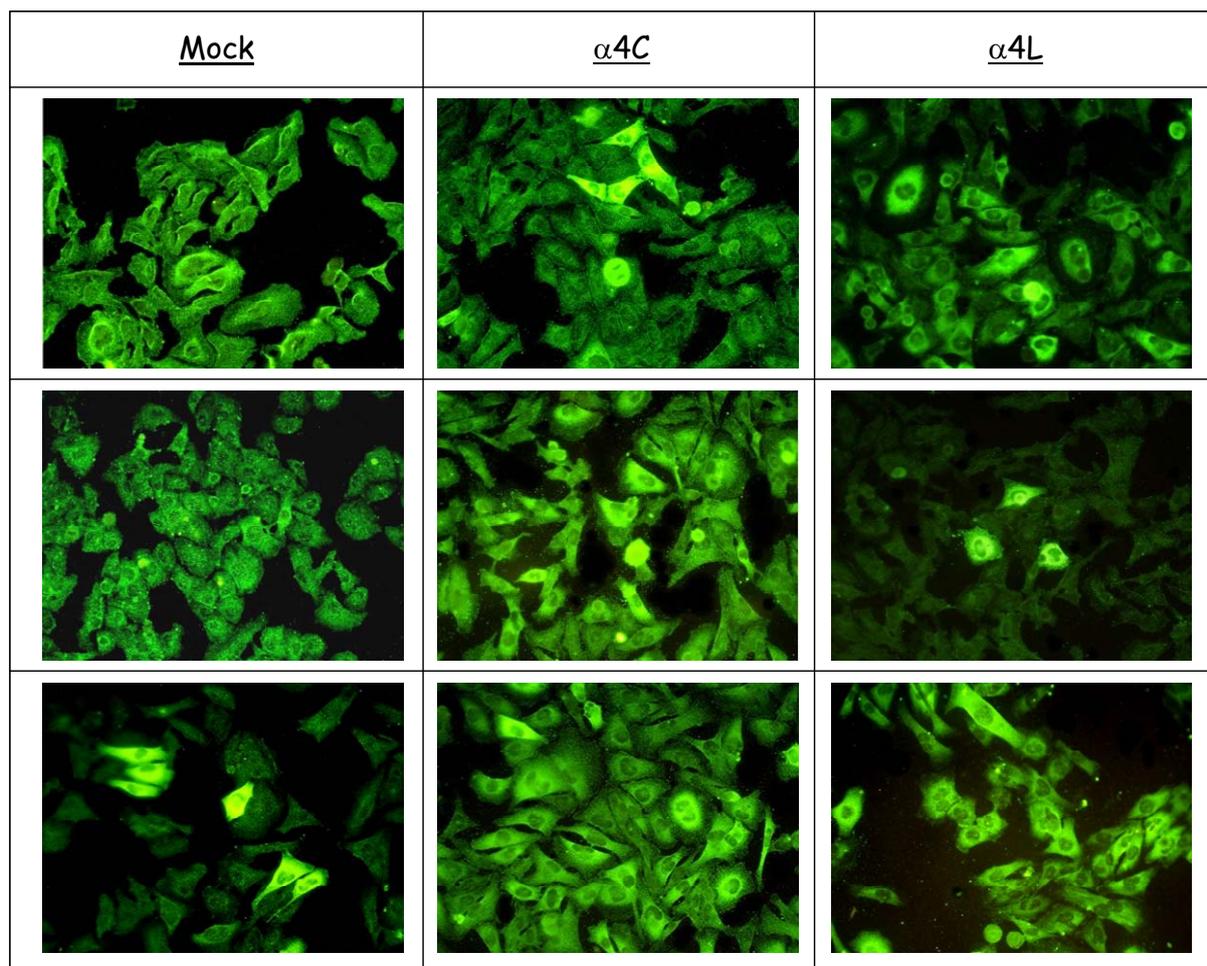


Figure 74 : Vérification par immunocytochimie de l'expression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$, par les cellules UACC-903 transfectées

Les cellules Mock, $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ sont incubées pendant 48 heures dans du milieu contenant du SVF (10 %). Les cellules, fixées au formaldéhyde 3,7 %, sont incubées avec un anticorps anti-FLAG, puis avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor® 488. Des contrôles négatifs avec les cellules seules, ou incubées sans anticorps primaire, sont réalisés afin de vérifier la spécificité des anticorps utilisés. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope inversé à fluorescence (λ excitation = 488 nm ; λ émission = 514 nm), et photographiées (grossissement x378).

Jusqu'à présent, nous n'avons pas pu mettre en évidence, par des méthodes immunologiques classiques, la sécrétion de la séquence d'intérêt dans les milieux de culture des cellules transfectées, même lorsque les milieux sont concentrés. Cependant, nous avons utilisé les milieux conditionnés des clones cellulaires, et nous avons testé leur effet sur les propriétés invasives des cellules UACC-903 non transfectées. Les résultats obtenus seront détaillés dans le paragraphe III.3.4.

Dans la suite de cette étude, toutes les expériences sont réalisées sur les trois clones précédemment sélectionnés et exprimant le plus fortement la protéine d'intérêt. Les tests statistiques (test Student) sont réalisés en comparant les moyennes des groupes par rapport à celle du groupe témoin.

III.3.2. Effet de la surexpression des domaines α 4L et α 4C sur la prolifération cellulaire

La prolifération des cellules transfectées est mesurée pendant 72 heures, soit par coloration des noyaux au violet cristal, soit par test WST-1. Les résultats obtenus avec les 2 techniques sont identiques.

La surexpression des domaines α 4L et α 4C inhibe la prolifération des cellules tumorales UACC-903 de manière importante. La prolifération des clones cellulaires α 4C est ralentie de 34 % ($p < 0,01$) dès 24 heures, versus 20 % (NS) pour les clones α 4L, en comparaison avec les clones témoins Mock (Figure 75A). Après 72 heures d'incubation, l'inhibition de prolifération atteint 42 % pour les clones α 4C, et 38 % pour les clones α 4L, de manière significative dans les 2 cas ($p < 0,01$) (Figure 75B). Les domaines α 4L et α 4C exercent une activité anti-proliférative sur les cellules de mélanome humain.

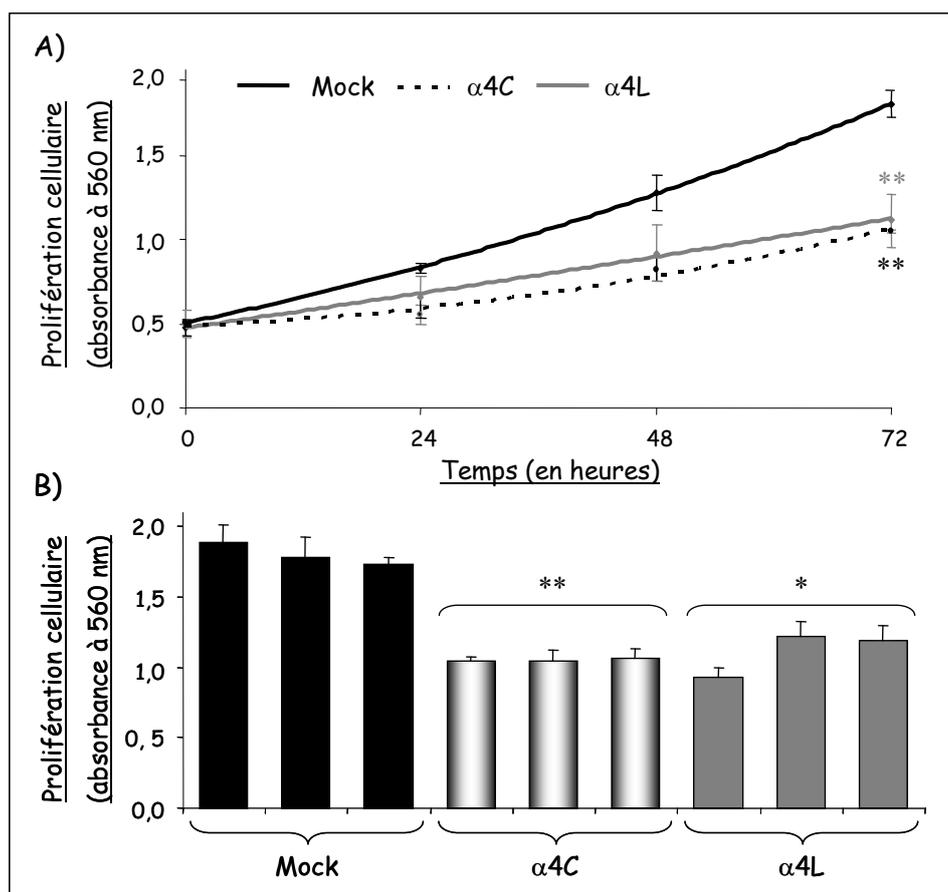


Figure 75 : Effets inhibiteurs de la surexpression des domaines α4L et α4C sur la prolifération cellulaire

2.10⁴ cellules Mock, α4C, ou α4L sont ensemencées en plaque 24 puits, dans du milieu contenant 5 % de SVF. La prolifération des cellules transfectées est estimée toutes les 24 heures pendant 72 heures, par coloration des noyaux au violet cristal. (A) Cinétique de la prolifération cellulaire pendant 72 heures. Les résultats représentent la moyenne des résultats obtenus pour les 3 clones. (B) Prolifération cellulaire de chaque clone au temps T 72 heures.

III.3.3. Effet de la surexpression des domaines α4L et α4C sur l'apoptose

Pour vérifier si l'inhibition de prolifération induite par la surexpression du domaine NC1[α4(IV)] est due à un phénomène d'apoptose, les cellules cultivées pendant 48 heures sont ensuite incubées avec du Hoechst-33442.

La figure 76 montre les noyaux des cellules provenant des différents clones cellulaires Mock, α4C et α4L. Nous n'observons ni condensation de la chromatine, ni présence de corps apoptotiques dans ces noyaux. Le domaine [α4(IV)] n'induit pas l'apoptose des cellules UACC-903.

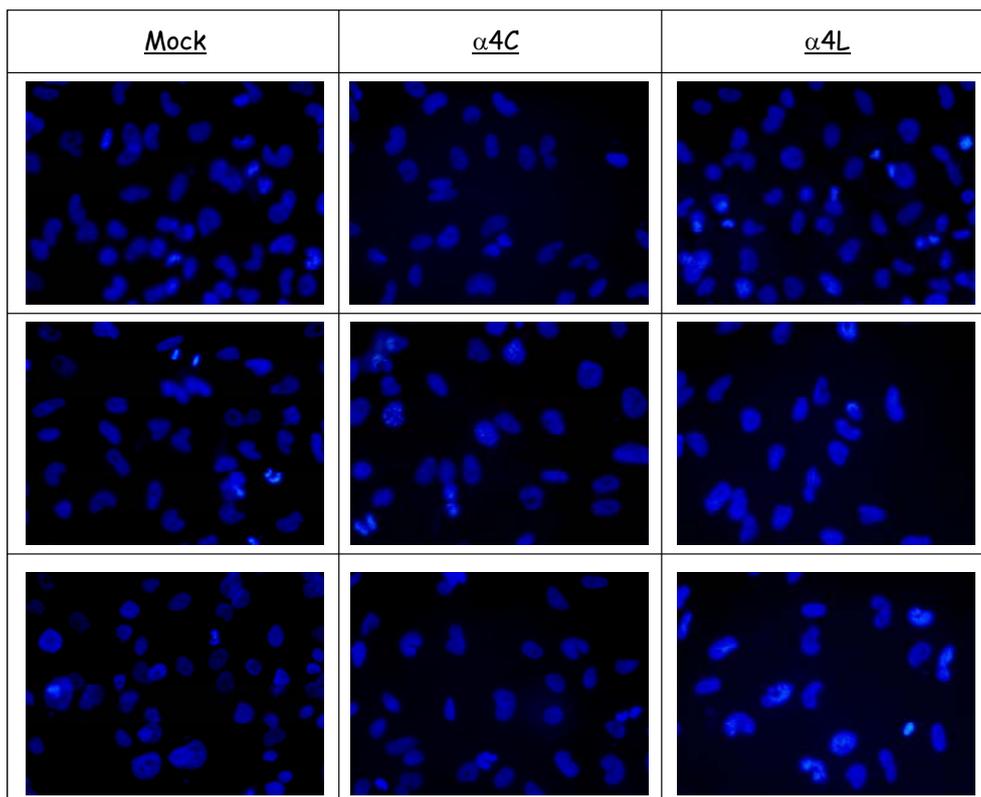


Figure 76 : Absence d'effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur l'apoptose

Les cellules Mock, $\alpha 4C$, ou $\alpha 4L$ sont ensemencées en plaque 24 puits, dans du milieu contenant du SVF (5 %), pendant 48 heures. Les cellules sont ensuite incubées 15 minutes avec du Hoechst-33342, et les noyaux sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence (λ excitation = 488 nm ; λ émission = 460 nm), puis photographiés (grossissement x 200).

III.3.4. Effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur l'invasion cellulaire

Les capacités invasives des cellules de mélanome UACC-903 surexprimant les domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sont testées dans le modèle de chambres de Boyden modifiées. Après 72 heures d'incubation, l'invasion des cellules $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ au travers d'une matrice de Matrigel® est fortement inhibée, respectivement de 86 % et 71 % ($p < 0,001$), comparativement aux cellules témoins (Figure 77A).

Pour déterminer l'implication des différentes cascades protéolytiques impliquées dans la migration des cellules, nous avons testé l'effet d'inhibiteurs des MMPs (galardine) et du système d'activation du plasminogène (aprotinine).

L'incubation des cellules avec la galardine (10^{-9} M) entraîne une inhibition de l'invasion cellulaire de 46 %, contrairement à l'aprotinine qui n'exerce aucun effet (Figure 77B), suggérant une forte implication des MMPs dans ce processus, mais pas de la plasmine.

Nous avons démontré, par les techniques de RT-PCR et d'immunomarquage, que les cellules transfectées expriment les séquences d'intérêt. Toutefois, par des méthodes immunologiques utilisant des anticorps anti- $\alpha 4$ (IV) ou anti-FLAG, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de peptides sécrétés dans le milieu de culture. Afin de vérifier si une molécule était sécrétée dans le milieu, nous avons recherché un éventuel effet inhibiteur des milieux conditionnés provenant des clones cellulaires, sur les propriétés invasives des cellules non transfectées.

Pour cela, les cellules UACC-903 non transfectées, sont ensemencées dans le modèle de chambres de Boyden modifiées, en présence de 100 μ L de milieu de culture, et de 100 μ L de milieu conditionné non concentré, provenant des cultures des cellules transfectées (5 μ g de protéines totales). La figure 77C montre que l'incubation des cellules UACC-903 non transfectées avec les milieux conditionnés, non concentrés, provenant des cultures de clones $\alpha 4$ C et $\alpha 4$ L entraîne une inhibition significative de l'invasion des cellules, respectivement de 33 % ($p < 0,01$) et 24 % ($p < 0,05$).

Ces résultats suggèrent que les cellules transfectées sécrètent une molécule, que l'on ne retrouve pas dans le milieu des cellules témoins Mock, et qui induit une inhibition de l'invasion cellulaire.

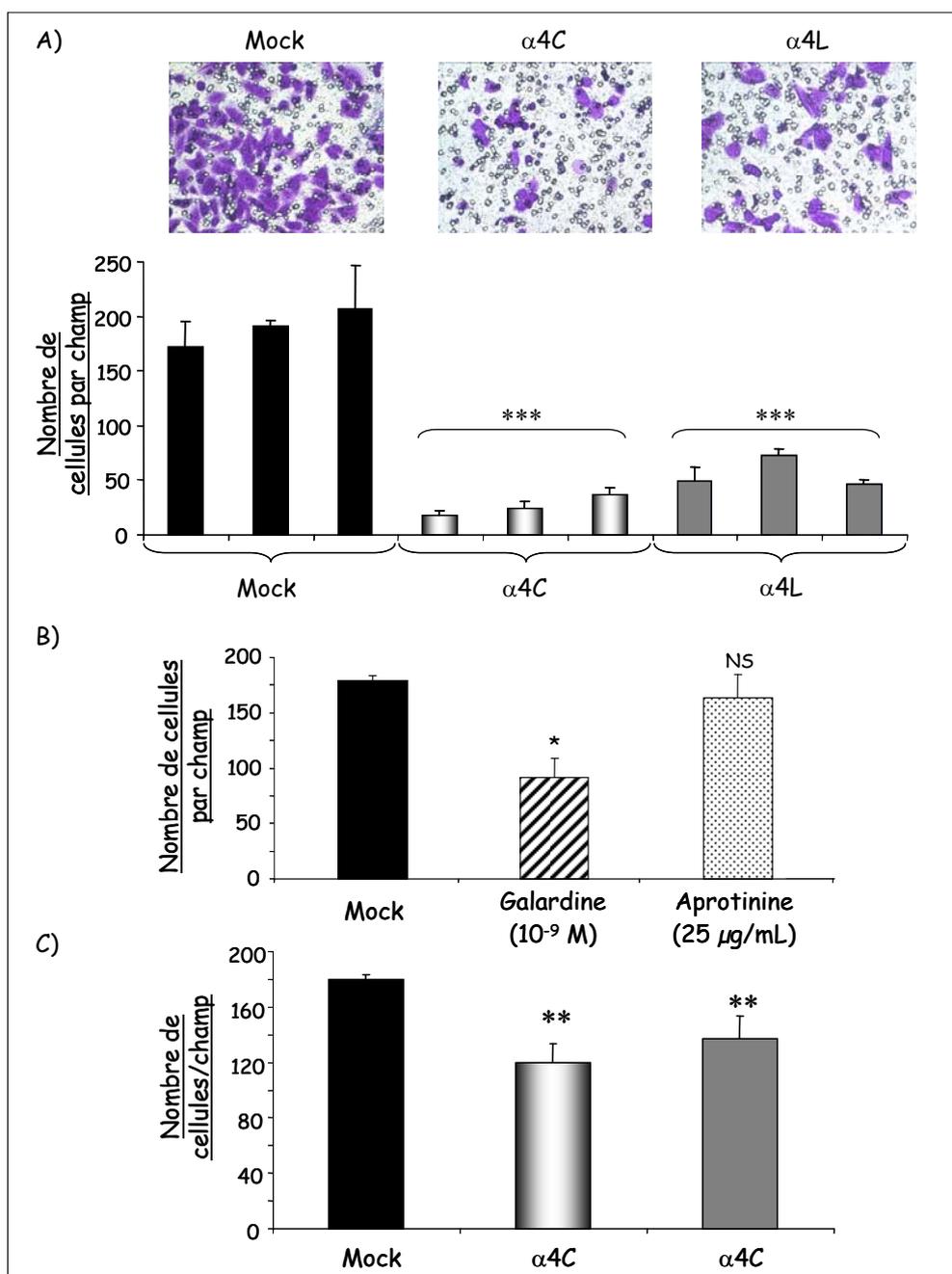


Figure 77 : Inhibition de l'invasion cellulaire par la surexpression des domaines α4L et α4C, et par les inhibiteurs de protéases

5.10⁴ cellules sont ensemencées sur la face supérieure de la membrane poreuse de la chambre de Boyden modifiée, préalablement recouverte de Matrigel® (30 µg/cm²), dans du milieu contenant de la SAB (0,2 %). Après 72 heures d'incubation, les cellules sont fixées au méthanol, colorées au violet cristal, et comptées sur 4 champs à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x 200). (A) Les cellules Mock, α4C, ou α4L sont incubées pendant 72 heures. Chaque histogramme représente la moyenne des résultats obtenus pour 3 clones. (B) Les cellules Mock sont incubées pendant 72 heures, en présence de galardine (10⁻⁹ M) ou d'aprotinine (25 µg/mL). (C) Les cellules UACC-903 non transfectées sont incubées pendant 72 heures, en présence des milieux conditionnés issus des cultures des clones Mock, α4C, ou α4L. Chaque histogramme représente la moyenne du nombre de cellules comptées sur 4 champs, dans 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

III.3.5. Effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur le système d'activation du plasminogène

Les milieux de culture des cellules qui surexpriment les domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ sont analysés en zymographie gélatine/plasminogène.

Les cellules transfectées sécrètent les 2 formes des activateurs du plasminogène : uPA et tPA. La transfection des cellules par les peptides $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ ne modifie pas la sécrétion de ces 2 protéases (Figure 78A et B).

L'activité plasmine générée dans les milieux de culture est également étudiée grâce à l'utilisation du substrat synthétique S-2251. La figure 78C montre que cette activité n'est pas modifiée par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$.

Le domaine NC1[$\alpha 4(IV)$] n'exerce aucune activité sur le système d'activation du plasminogène.

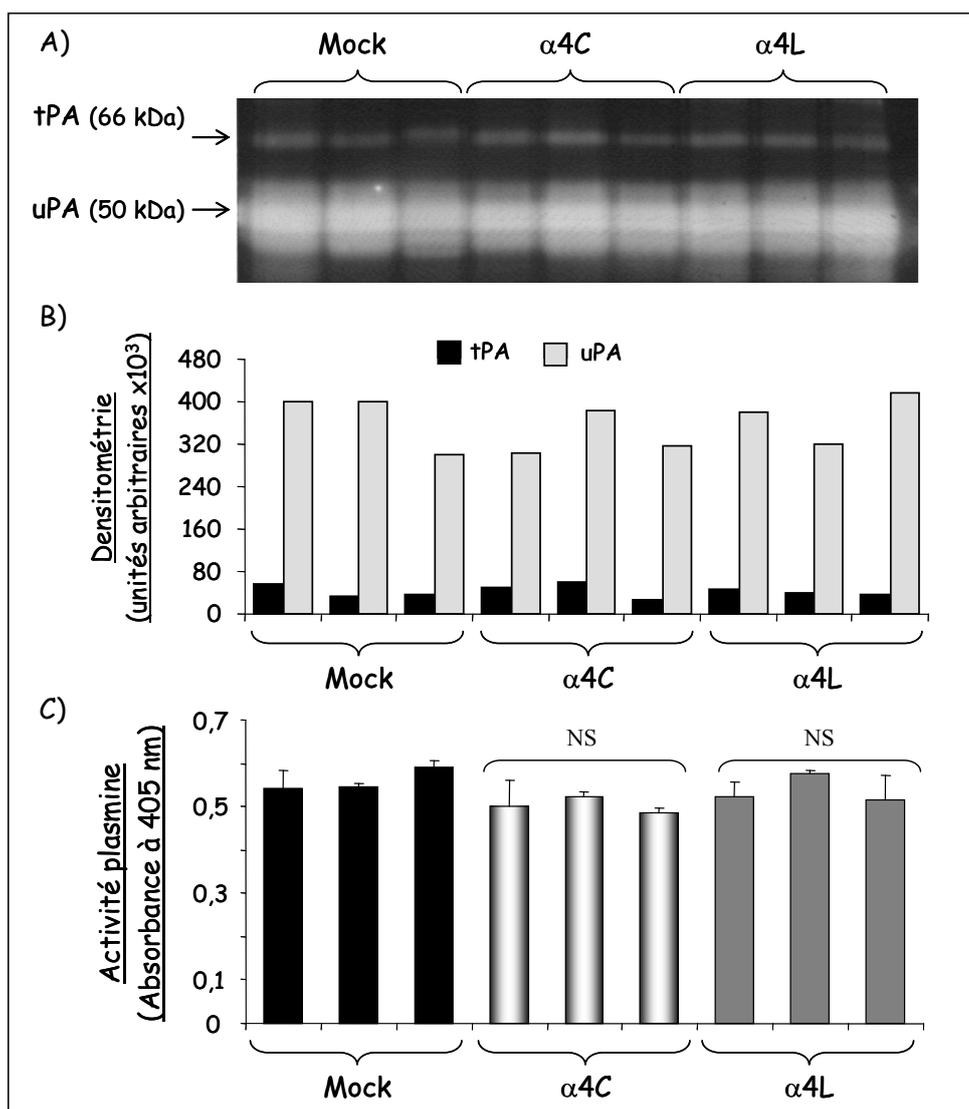


Figure 78 : Absence d'effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur la sécrétion des activateurs de la plasmine, et sur l'activité plasmine générée

Les milieux de culture des cellules Mock, $\alpha 4C$, ou $\alpha 4L$, cultivées pendant 48 heures sans sérum, sont analysés en zymographie gélatine-plasminogène (A). Les quantifications densitométriques d'uPA et de tPA sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D (B). L'activité plasmine générée dans les milieux de culture est mesurée par une technique colorimétrique utilisant un substrat synthétique de la plasmine, le S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA) (C).

III.3.6. Effets de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur les MMPs et les TIMPs

Pour tenter d'élucider les mécanismes responsables de l'inhibition des propriétés invasives des cellules tumorales induite par les domaines NC1[$\alpha 4(IV)$], la voie des MMPS et des TIMPs est étudiée.

a) Effets sur l'activité gélatinolytique

L'effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur la sécrétion de la MMP-2, enzyme impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire, est étudiée par zymographie gélatine des milieux de culture.

Le zymogramme et la quantification correspondante démontrent que les domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ n'ont aucun effet sur la sécrétion de la pro MMP-2. Aucune forme active de cette gélatinase n'est décelée dans le milieu de culture (Figure 79).

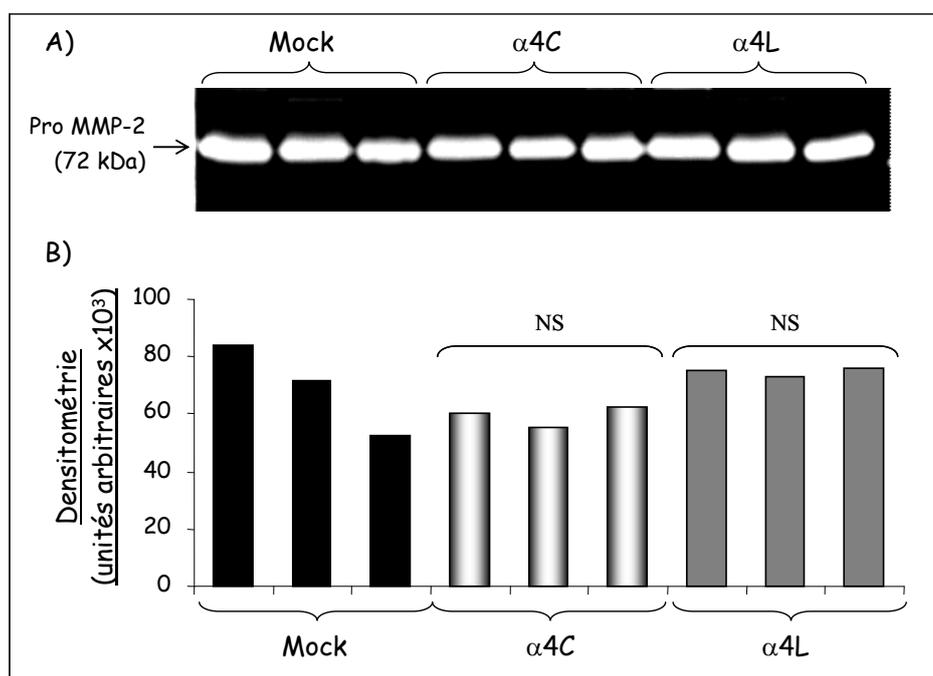


Figure 79 : Absence d'effet de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur la sécrétion de la MMP-2

Les cellules Mock, $\alpha 4C$, ou $\alpha 4L$ sont cultivées pendant 48 heures, en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie gélatine (A). La quantification densitométrique correspondante est effectuée à l'aide du logiciel Bio1D (B).

b) Effets sur la sécrétion des TIMPs

Les TIMPs sont également très importants dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire. Les milieux de culture des cellules transfectées sont analysés en zymographie inverse.

Les cellules UACC-903 transfectées sécrètent 3 types de TIMPs : du TIMP-3 glycosylé et/ou du TIMP-1 (28,5 kDa), du TIMP-3 non glycosylé (22 kDa), ainsi que du TIMP-2 (21 kDa). L'observation du zymogramme, représenté à la figure 80, montre une inhibition de la sécrétion du TIMP-3 induite par la surexpression des domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ (Figure 80A). Il en est de même pour la sécrétion du TIMP-1 et/ou du TIMP-3 glycosylé. En revanche, la quantification du TIMP-2 démontre que la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ ne modifie pas la sécrétion de cet inhibiteur (Figure 80B).

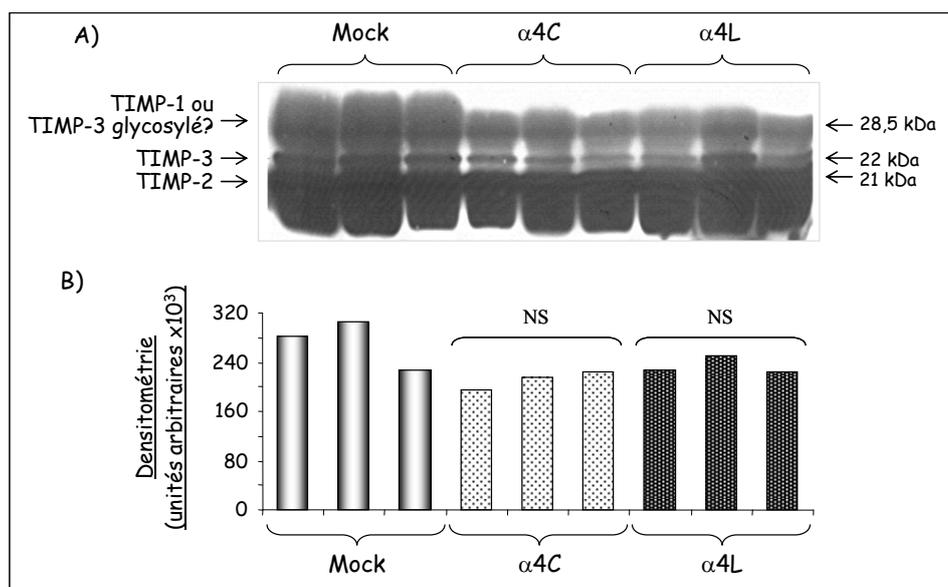


Figure 80 : Inhibition de la sécrétion des TIMPs dans les milieux de culture par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$

Les cellules Mock, $\alpha 4C$, ou $\alpha 4L$ sont cultivées 48 heures, en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie inverse (A). La quantification densitométrique correspondant au TIMP-2 est effectuée à l'aide du logiciel Bio1D (B).

Pour confirmer l'effet inhibiteur des domaines [$\alpha 4(IV)$] sur la sécrétion du TIMP-3, les milieux de culture sont analysés par la technique de Western-blot. La surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ inhibe fortement l'expression globale du TIMP-3. La transfection des cellules par $\alpha 4C$ induit une inhibition d'expression des TIMP-3 glycosylé et non glycosylé de 50 % et 78 % respectivement. L'inhibition exercée par le domaine $\alpha 4L$ sur l'expression du TIMP-3 est de 78 %, et ce sur les 2 formes de l'inhibiteur (Figure 81).

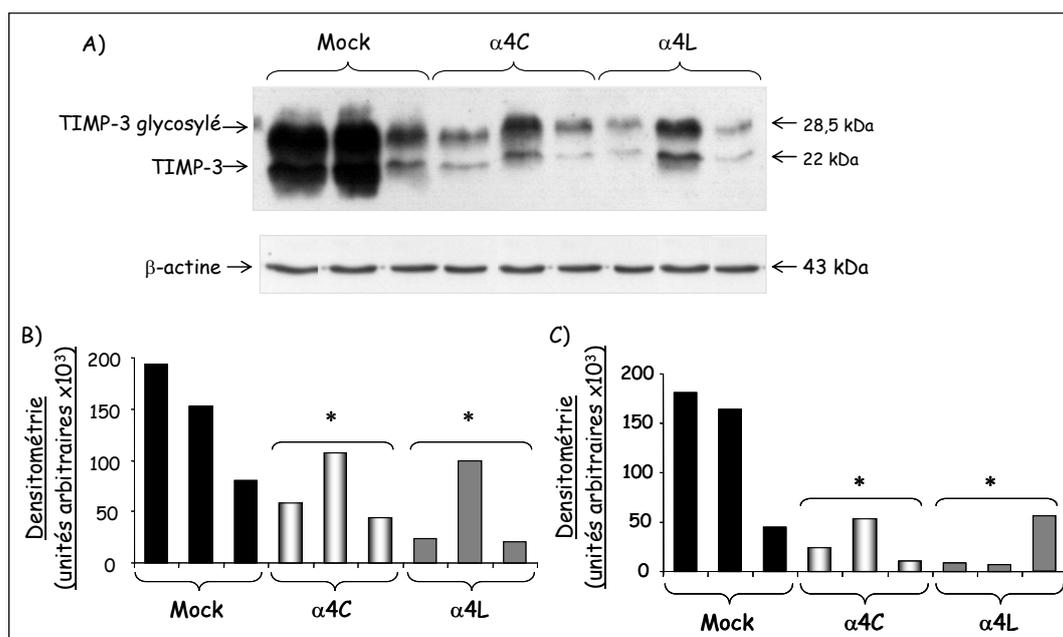


Figure 81 : Inhibition de la sécrétion du TIMP-3 dans les milieux de culture par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$

Les cellules Mock, $\alpha 4C$, ou $\alpha 4L$ sont cultivées 48 heures, en absence de SVF. Les milieux de culture sont ensuite analysés en zymographie inverse (A). Les milieux de culture, concentrés sur colonne Nanosep® 10K, sont analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-TIMP-3. La membrane est ensuite déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β -actine, afin de monter l'égalité des dépôts (A). Les quantifications densitométriques du TIMP-3 glycosylé (B), et non glycosylé (C) sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D.

c) Effets sur l'expression de la MT1-MMP

L'expression de la MT1-MMP, protéase clé des processus d'invasion cellulaire, est étudiée par la technique de Western-blot.

Les cellules Mock expriment les formes latente (66 kDa) et active (60 kDa) de la MT1-MMP dans des proportions quasi égales. La surexpression des domaines $\alpha 4C$ et surtout $\alpha 4L$ entraîne une diminution globale de l'expression de la MT1-MMP. De plus, la quantité de forme active exprimée par les clones $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ est réduite en moyenne de 66 % et 67 % ($p < 0,05$) respectivement, en comparaison avec les cellules témoins (Figure 82).

Les domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ inhibent fortement l'activation de la MT1-MMP.

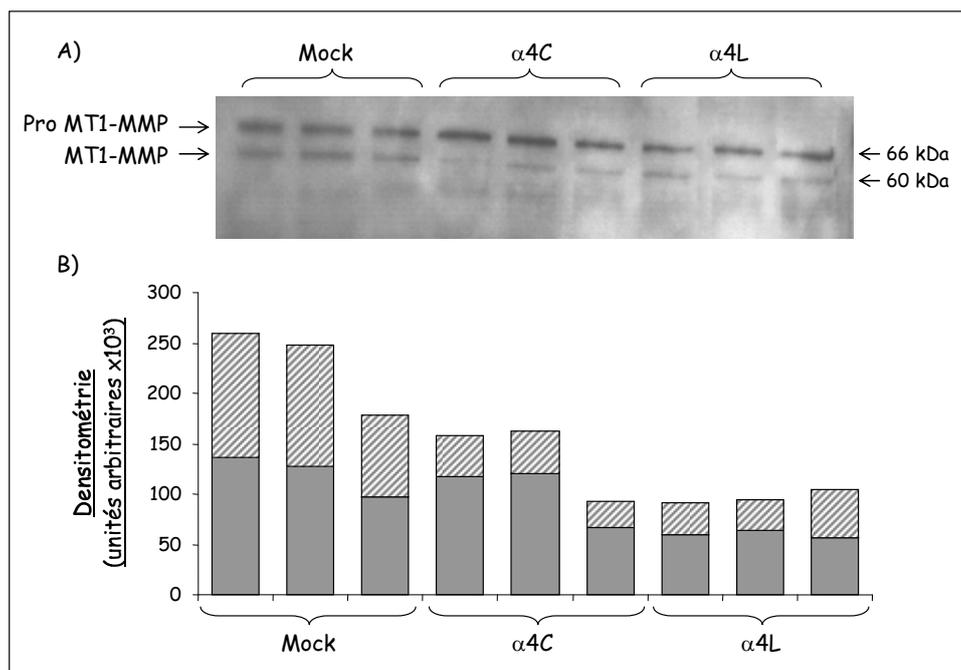


Figure 82 : Inhibition de l'activation de la MT1-MMP par la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$

Les cellules Mock, $\alpha 4C$, ou $\alpha 4L$ sont cultivées pendant 48 heures en absence de SVF. Les extraits membranaires sont ensuite analysés par Western-blot, avec un anticorps anti-MT1-MMP (A). Les quantifications densitométriques sont effectuées à l'aide du logiciel Bio1D (B).

III.3.7. Effets de la surexpression des domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ sur l'adhésion cellulaire sur Matrigel®

L'adhésion des cellules est un paramètre important à prendre en compte lors de l'étude des phénomènes de migration et d'invasion cellulaire. L'inhibition des capacités invasives des cellules de mélanome, induite par le domaine NC1[$\alpha 4(IV)$], peut-elle être attribuée à une augmentation de l'adhésion des cellules?

L'adhésion des cellules UACC-903 est mesurée en plaque 96 puits, par coloration des noyaux au cristal violet, 1 heure après le dépôt des cellules dans les puits recouverts de 10 μg de Matrigel®.

Les cellules qui surexpriment les domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ adhèrent plus fortement que les cellules témoin sur un tapis de Matrigel®. Les clones $\alpha 4L$ présentent une augmentation de leur adhésion de 33 % ($p < 0,01$). Cette augmentation est encore plus forte (+ 120 %, $p < 0,05$) dans le cas où les cellules surexpriment le domaine $\alpha 4C$ (Figure 83).

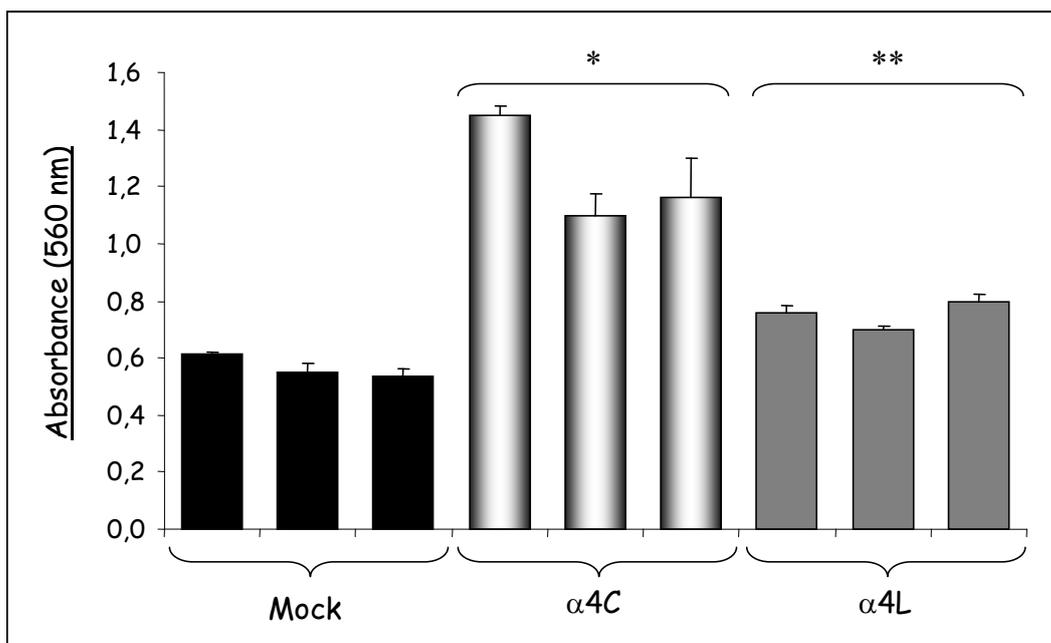


Figure 83 : Effets de la surexpression des domaines α4L et α4C sur l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire est mesurée en plaques 96 puits tapissées avec 10 µg de Matrigel®. $3 \cdot 10^4$ cellules UACC-903 sont déposées dans du milieu sans SVF. Après 1 heure d'incubation à 37°C, les noyaux sont colorés au violet cristal, puis l'absorbance est lue à 560 nm après élution par l'acide acétique 10 %.

Le domaine NC1[α4(IV)] exerce une puissante activité anti-tumorale *in vitro*, en inhibant essentiellement la prolifération des cellules tumorales, ainsi que leurs capacités invasives. Cette activité inhibitrice est reproduite par son fragment C-terminal α4C. Ces domaines peuvent donc être considérés comme de nouvelles matrikines dérivées des domaines NC1 du collagène de type IV.

III.4. ESSAIS THERAPEUTIQUES

Lors des essais thérapeutiques menés avec le domaine C-terminal de la tumstatine (NC1[α3(IV)181-229]) (voir paragraphe III.2.), parallèlement à la mesure de la croissance tumorale, des prélèvements sanguins sont effectués sur les souris, afin de procéder au dosage de la protéine de fusion présente dans le sérum. Le dosage, par technique ELISA, dans les sérums des animaux ayant subi l'électrotransfert, n'a permis de détecter aucune trace de cette matrikine, bien qu'un net effet inhibiteur ait été observé sur la croissance tumorale. Le marquage de la séquence d'intérêt par le peptide FLAG peut constituer un site de

reconnaissance pour le système immunitaire de la souris, et ainsi entraîner sa destruction rapide. Par conséquent, nous avons décidé de reproduire cette expérience en remplaçant le plasmide p3XFlag-CMV™-9 par le plasmide pVAX1.

III.4.1 Dosage de la tumstatine sérique

Dans le but de mesurer la concentration de tumstatine présente dans le sang des souris traitées par la technique d'électroporation, une nouvelle construction plasmidique, dans laquelle l'ADNc codant le domaine [$\alpha 3(IV)1-229$] est inséré dans le plasmide pVAX1 ($\alpha 3L$), est réalisée. Les souris sont euthanasiées à différents temps, et leur sang est récupéré. Un dosage de la tumstatine sérique est ensuite réalisé par la technique ELISA.

La figure 84 montre la présence de domaine $\alpha 3L$ dans le sang des souris. A J0, sa concentration est inférieure à 5 $\mu\text{g/mL}$, et s'élève rapidement dès le premier jour suivant l'électrotransfert du plasmide $\alpha 3L$. Cette expression est toujours décelable 28 jours après l'électroporation, avec une concentration sérique supérieure à 100 $\mu\text{g/mL}$.

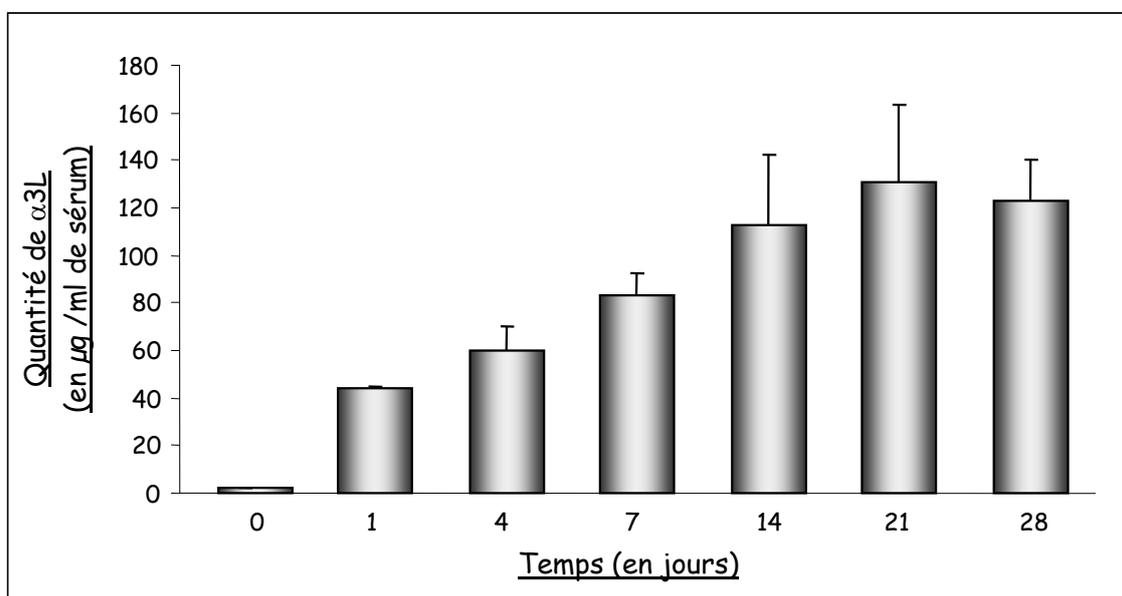


Figure 84 : Dosage du domaine $\alpha 3L$ sérique des souris traitées par la technique d'électrotransfert

Le dosage ELISA de la tumstatine est réalisé, à différents temps, sur les sérums des souris traitées par électrotransfert du plasmide $\alpha 3L$, avec un anticorps spécifique anti-NC1[$\alpha 3(IV)185-203$].

L'utilisation du plasmide pVAX1 permet de détecter le domaine d'intérêt dans le sang des animaux traités par électroporation. Ce plasmide est conservé dans la suite de l'étude pour réaliser de nouvelles constructions, et mener de nouveaux essais thérapeutiques.

III.4.2. Croissance tumorale

Les premiers essais thérapeutiques menés avec la tumstatine, ont également révélé une activité anti-tumorale pour la chaîne $\alpha 4(\text{IV})$, que nous avons développée au paragraphe III.2.1. Afin d'étudier les effets de la tumstatine et du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4(\text{IV})$ sur la croissance tumorale, de nouvelles constructions ont été réalisées. Les ADNc codant la tumstatine, complète ou partielle (NC1[$\alpha 3(\text{IV})$ 1-229], noté $\alpha 3\text{L}$ et NC1[$\alpha 3(\text{IV})$ 181-229], noté $\alpha 3\text{C}$), ainsi que les ADNc codant le domaine NC1[$\alpha 4(\text{IV})$] complet NC1[$\alpha 4(\text{IV})$ 1-229], noté $\alpha 4\text{L}$, et le domaine NC1[$\alpha 4(\text{IV})$ 181-229], noté $\alpha 4\text{C}$, sont insérés dans le plasmide pVAX1. Les plasmides vide (Mock), ou contenant l'ADNc codant le domaine [$\alpha 5(\text{IV})$ 181-229] (noté $\alpha 5\text{C}$) sont utilisés comme témoins négatifs. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 85.

La surexpression des différents domaines ne retarde pas l'apparition de la tumeur. Toutes les souris développent une tumeur environ 10 jours après l'injection des cellules cancéreuses par voie sous-cutanée.

L'évolution tumorale des souris traitées par électrotransfert des plasmides Mock et $\alpha 5\text{C}$ est rapide. Quatorze jours après l'injection des cellules B16F1, les tumeurs ont un volume moyen respectif de $0,61 \text{ cm}^3$ et $0,64 \text{ cm}^3$.

Les surexpressions des domaines NC1[$\alpha 3(\text{IV})$] et NC1[$\alpha 4(\text{IV})$] entraînent des effets différents, selon que l'on considère les séquences complètes ou partielles.

La surexpression du domaine $\alpha 3\text{L}$ inhibe fortement la croissance tumorale dès le douzième jour suivant l'induction de la tumeur. A J14, le volume tumoral est réduit de 65% ($p < 0,05$) par rapport aux souris Mock. La surexpression du domaine $\alpha 3\text{C}$ est moins efficace, puisque la croissance tumorale n'est inhibée que de 20 %, de manière non significative.

Le domaine $\alpha 4\text{L}$ exerce une puissante activité anti-tumorale. L'augmentation du volume des tumeurs chez les souris traitées est très lente : l'inhibition du volume tumoral est de 89 % ($p < 0,01$), 14 jours après l'induction. En revanche, le volume des tumeurs des souris qui surexpriment le domaine $\alpha 4\text{C}$ n'est diminué que de 33 %, de manière non significative.

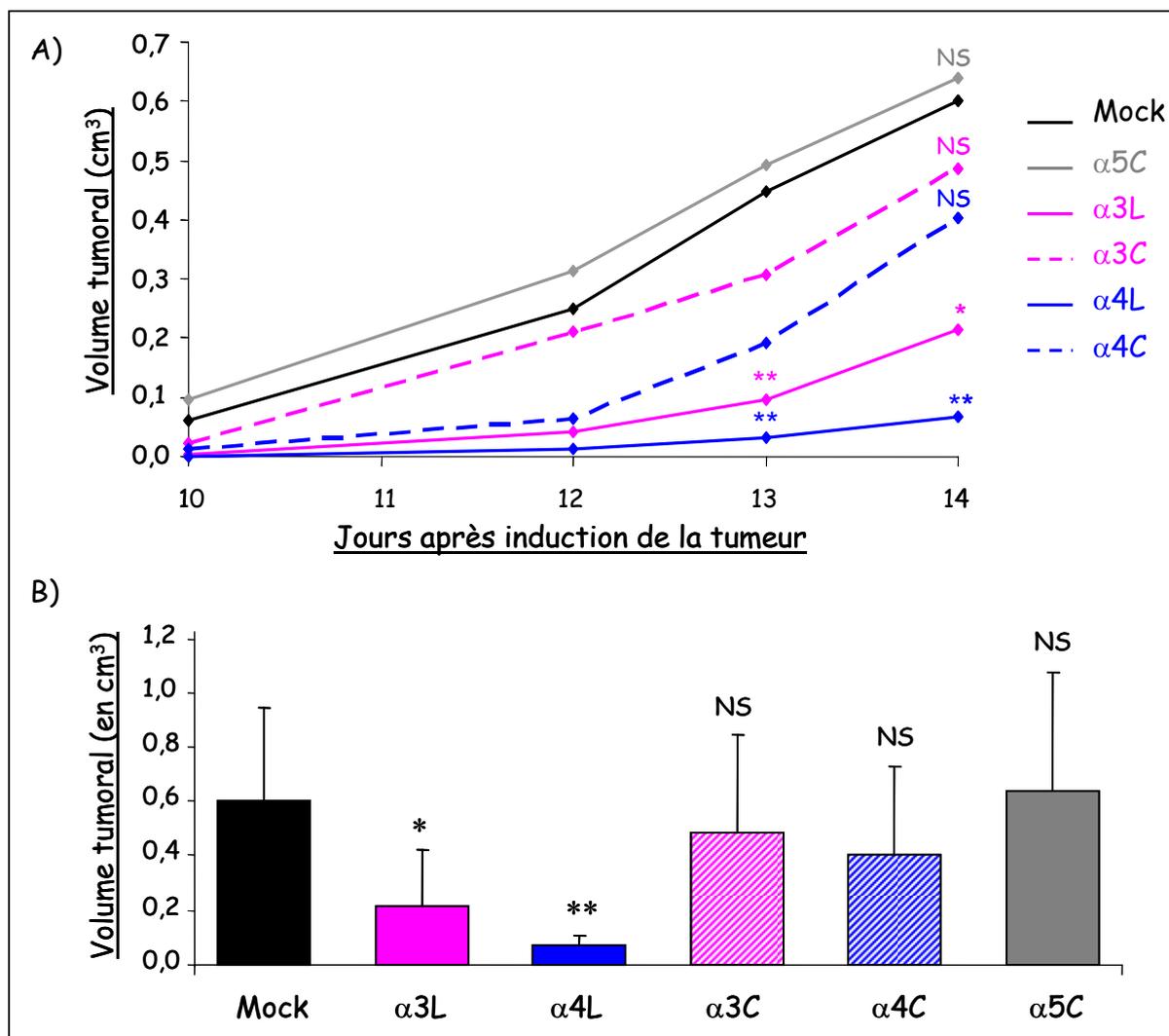


Figure 85 : Effets de la surexpression des domaines $\alpha3L$, $\alpha3C$, $\alpha4L$, $\alpha4C$ et $\alpha5C$ sur la croissance tumorale *in vivo*

Les plasmides Mock, $\alpha3C$, $\alpha3L$, $\alpha4C$, $\alpha4L$, ou $\alpha5C$ sont injectés aux souris C57/B16 par voie intramusculaire, avant l'étape d'électrotransfert. Sept jours après l'électroporation, $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées aux souris, par voie sous-cutanée. Les volumes tumoraux sont mesurés dès l'apparition de la tumeur. (A) Cinétique d'évolution de la croissance tumorale. (B) Volumes tumoraux mesurés 14 jours après l'apparition de la tumeur.

III.4.3. Survie des animaux

La survie des animaux traités est également un paramètre important à prendre en compte pour évaluer l'efficacité du traitement. Pour cette étude, les souris sont sacrifiées dès que le volume tumoral atteint 1 cm^3 (Figure 86).

Les tumeurs des souris traitées par le plasmide Mock, ou par le peptide $\alpha 5C$, commencent à atteindre un volume de 1 cm^3 14 jours après l'injection des cellules cancéreuses. Toutes les souris Mock et celles traitées par le peptide $\alpha 5C$ sont euthanasiées respectivement 19 et 20 jours après l'induction de la tumeur.

La surexpression des fragments C-terminaux, $\alpha 3C$ et $\alpha 4C$, permet une survie des souris de 22 jours. Lors du traitement par le domaine $\alpha 3L$, les premières souris ne sont euthanasiées que 17 jours après l'injection des cellules cancéreuses. La survie au sein de ce groupe est de 22 jours. La surexpression du domaine $\alpha 3L$ améliore la survie des souris.

Les animaux traités par électrotransfert du domaine $\alpha 4L$ présentent la meilleure courbe de survie. Les premières souris ne sont euthanasiées qu'au jour 18 suivant l'induction tumorale, soit 4 jours plus tard que les animaux du groupe témoin "Mock". La totalité des souris de ce groupe est euthanasiée 24 jours après l'injection des cellules cancéreuses, soit 5 jours plus tard que les souris traitées par le plasmide Mock. Ces résultats démontrent la forte activité anti-tumorale exercée par le domaine $\alpha 4L$ *in vivo*.

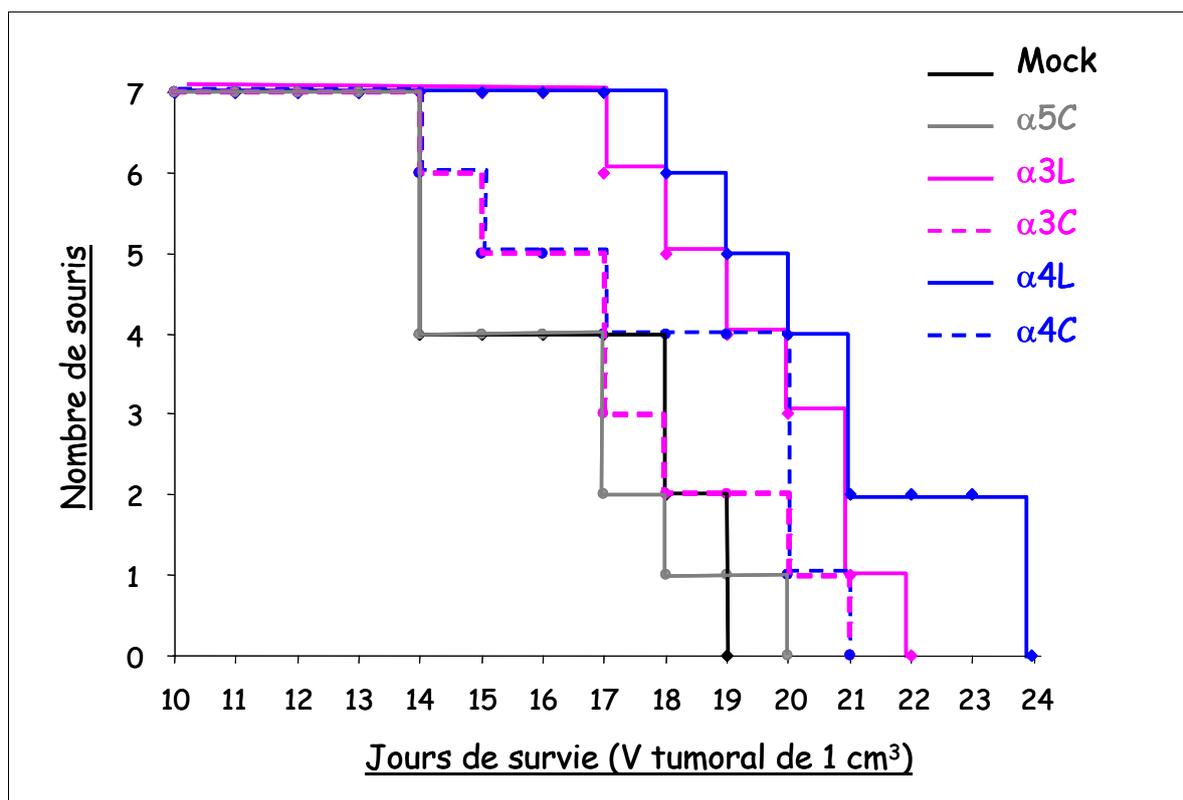


Figure 86 : Effets de la surexpression des domaines $\alpha 3L$, $\alpha 3C$, $\alpha 4L$, $\alpha 4C$ et $\alpha 5C$ sur la survie des souris

Les plasmide Mock, $\alpha 3C$, $\alpha 3L$, $\alpha 4C$, $\alpha 4L$, ou $\alpha 5C$ sont injectés aux souris C57/Bl6 par voie intramusculaire, avant l'étape d'électrotransfert. Sept jours après l'électroporation, $2,5 \cdot 10^5$ cellules B16F1 sont injectées aux souris, par voie sous-cutanée. Lorsque les volumes tumoraux atteignent 1 cm^3 , les souris sont euthanasiées. La survie, à volume égal, est déterminée pour chaque souris, dans les différents groupes.

La tumstatine, et son fragment C-terminal 181-229, exercent de fortes activités anti-tumorales, *in vitro*, dans un modèle de mélanome humain. Ces propriétés sont notamment imputables aux activités anti-prolifératives et anti-invasives de la matrikine. *In vivo*, les études menées ont confirmé le pouvoir anti-tumoral de la tumstatine.

De manière intéressante, les essais thérapeutiques ont permis de révéler l'activité anti-tumorale d'une autre matrikine : le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4$ du collagène de type IV ($\alpha 4(IV)$).

E- Discussion

I. EFFET DU COLLAGÈNE DE TYPE XIX SUR LA CROISSANCE TUMORALE

Le collagène de type XIX est un collagène mineur associé aux membranes basales, avec les collagènes de type IV, XV et XVIII (Myers et coll., 1997). Il a été initialement caractérisé pour son implication dans les processus de différenciation musculaire et de morphogénèse (Sumiyoshi et coll., 2001 ; Sumiyoshi et coll., 2004), ce qui n'exclut pas d'autres fonctions. D'autre part, au cours des phases précoces de la progression tumorale du cancer du sein, le collagène XIX semble disparaître rapidement des membranes basales, suggérant une protéolyse de ce collagène, avec génération de matrikines potentiellement actives (Amenta et coll., 2003). Le collagène XIX pourrait donc intervenir dans le contrôle de l'angiogenèse et de l'invasion cellulaire, lors de la progression tumorale. Effectivement, la plupart des domaines C-terminaux des chaînes constituant les collagènes de membranes basales, comme l'endostatine, la restine, l'arrestène, la canstatine et la tumstatine correspondant respectivement aux chaînes $\alpha 1(\text{XVIII})$, $\alpha 1(\text{XV})$, $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$, et $\alpha 3(\text{IV})$, exercent des propriétés anti-angiogéniques et/ou anti-tumorales (Nyberg et coll., 2005 ; Maquart et coll., 2004). Nous avons donc émis l'hypothèse que le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type XIX pouvait également contrôler la croissance tumorale et/ou l'angiogenèse.

Lors de cette étude, nous avons réalisé des expériences *in vivo*, dans un modèle de mélanome murin. Suite à l'injection de cellules B16F1 par voie sous-cutanée, les souris C57/Bl6 développent une tumeur sous-cutanée, dont le volume est mesuré régulièrement. Les résultats obtenus montrent que la pré-incubation des cellules tumorales avec le peptide NC1[$\alpha 1(\text{XIX})$], suivie de 2 réinjections péri-tumorales du peptide aux jours 7 et 14 suivant l'induction de la tumeur, diminue fortement la croissance tumorale. Cet effet est aussi puissant que celui obtenu avec la tumstatine (Floquet et coll., 2004). La seule pré-incubation des cellules avec le peptide NC1[$\alpha 1(\text{XIX})$] n'a pas d'effet significatif sur la croissance tumorale. En revanche, la suppression de l'étape de pré-incubation des cellules avec le peptide NC1[$\alpha 1(\text{XIX})$], préalablement aux injections péri-tumorales, ne modifie pas l'inhibition de croissance tumorale. Ces observations prouvent que les injections du peptide NC1[$\alpha 1(\text{XIX})$], après induction de la tumeur, sont plus importantes pour exercer une inhibition sur la

croissance tumorale, que la pré-incubation initiale des cellules de mélanome. Le peptide NC1[α 1(XIX)] agit également de manière systémique, puisque des injections intrapéritonéales (10 mg/kg), 10 et 14 jours après l'induction de la tumeur, induisent une forte inhibition de la croissance tumorale.

L'activité anti-tumorale du peptide NC1[α 1(XIX)] n'est pas due à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales. En revanche, elle est associée à une importante réduction des capacités invasives des cellules tumorales B16F1 *in vitro*, comme le montrent les expériences d'invasion sur Matrigel®. Une telle inhibition des propriétés invasives a été décrite pour le domaine NC1 de la chaîne α 3 du collagène de type IV (Pasco et coll., 2000a).

L'angiogenèse tumorale est un processus indispensable à la croissance de la tumeur, et nécessite la migration de cellules endothéliales, notamment sous l'action de facteurs de croissance comme le VEGF et le bFGF. L'examen histologique des tumeurs a révélé une diminution significative de la vascularisation des tumeurs provenant des animaux traités. Cet effet anti-angiogénique s'exerce, au moins en partie, de manière directe, puisque le peptide NC1[α 1(XIX)] inhibe la capacité des cellules endothéliales HMEC-1 à former des pseudotubes *in vitro*. Les mêmes effets ont été décrits pour l'endostatine et la canstatine (Kuo et coll., 2001 ; Panka et coll., 2003). Le peptide NC1[α 1(XIX)] ne semble pas induire l'apoptose des cellules endothéliales, comme le font certains inhibiteurs de l'angiogenèse (Chavakis et Dimmeler, 2002), puisque la prolifération des cellules HMEC-1 incubées en présence du peptide n'est pas altérée. De plus, les cellules endothéliales humaines incubées avec le peptide NC1[α 1(XIX)] ne présentent pas de corps apoptotiques, ni de condensation chromatinienne ; ceci confirme l'absence de phénomène d'apoptose. Le traitement des animaux par le peptide NC1[α 1(XIX)] induit une diminution de l'expression de VEGF dans les tumeurs, ce qui peut également contribuer à l'inhibition de la vascularisation intratumorale.

La migration des cellules endothéliales met en jeu des protéases comme les MMPs, et en particulier la MT1-MMP. Celle-ci joue un rôle très important dans la dégradation de la matrice extracellulaire, que ce soit de manière directe ou indirecte, via l'activation de la pro MMP-2 (Hofmann et coll., 2000c). De plus, la MT1-MMP semble jouer un rôle crucial dans l'angiogenèse tumorale, puisque l'utilisation d'anticorps spécifiques, ou de petits ARN interférants (siRNA) suffit à inhiber l'angiogenèse (Egeblad et coll., 2002 ; Lafleur et coll., 2002 ; Seiki et coll., 2003 ; Bauvois, 2004 ; Robinet et coll., 2005). La MT1-MMP est également capable d'augmenter l'expression de VEGF, dans les cellules d'adénocarcinomes

mammaires et de gliomes humains (Sounni et coll., 2004 ; Sounni et coll., 2002). En conséquence, l'inhibition d'expression de la MT1-MMP induite par le peptide NC1[α 1(XIX)] peut expliquer, au moins en partie, l'inhibition de l'angiogenèse.

Les mécanismes par lesquels le peptide NC1[α 1(XIX)] affecte l'expression de la MT1-MMP et du VEGF restent encore inconnus. Il a été précédemment démontré que certaines matrikines dérivées des domaines NC1 des collagènes de membranes basales pouvaient se lier à des récepteurs spécifiques des cellules endothéliales ou tumorales, et ainsi activer des voies de signalisation intracellulaires, le tout aboutissant à la modulation de l'expression de gènes spécifiques ; c'est le cas de l'endostatine qui entraîne une diminution de l'expression de VEGF au niveau transcriptionnel (Hajitou et coll., 2002). Nous pouvons donc penser que le mode d'action du peptide NC1[α 1(XIX)] est similaire à celui de l'endostatine. Cette hypothèse devra être vérifiée, en étudiant le récepteur sur lequel se fixe le domaine NC1[α 1(XIX)], et les signaux intracellulaires déclenchés lors de sa fixation sur ce récepteur.

L'ensemble de ces résultats démontre que le domaine NC1 de la chaîne α 1 du collagène de type XIX limite la progression tumorale en exerçant des activités anti-angiogéniques, *in vitro* et *in vivo*. Ce domaine peut donc être considéré comme une nouvelle matrikine dérivée des collagènes associés aux membranes basales, et pourrait conduire au développement de nouveaux agents thérapeutiques anticancéreux.

II. EFFETS D'UN CYCLOPEPTIDE DERIVE DE LA TUMSTATINE

Il a été précédemment démontré que le peptide natif CNYYSNS (L7) dérivé du domaine NC1 de la chaîne α 3 du collagène de type IV, la tumstatine, inhibait la progression tumorale du mélanome dans un modèle murin. Cet effet anti-tumoral dépend de la conformation du peptide : la présence d'un coude β au niveau des résidus YYSNS est indispensable à son activité biologique (Floquet et coll., 2004). Le but de cette étude est donc de concevoir un cyclopeptide synthétique, dérivé du peptide natif CNYYSNS, contenant le coude β contraint dans sa conformation, dans le but d'augmenter sa biodisponibilité *in vivo*.

Le peptide YSNSG conçu est un cyclopentapeptide qui contient les 4 résidus YSNS nécessaires à la formation du coude β , ainsi qu'une glycine qui confère une certaine flexibilité au peptide, et qui permet la cyclisation. Les résultats obtenus par simulations de dynamique moléculaire suggèrent que le cyclopeptide est capable d'adopter cette conformation en coude β . Les études menées par résonance magnétique nucléaire, et par modélisation moléculaire confirment la présence du coude β au niveau des résidus YSNS du cyclopeptide. Cette conformation ne dépend ni de la température, ni du pH (Thevenard et coll., 2006).

II.1. EFFET ANTI-TUMORAL DU PEPTIDE C5

Le peptide natif CNYYSNS et le cyclopeptide YSNSG sont tous les deux capables de promouvoir l'adhésion des cellules tumorales UACC-903. Cette adhésion est inhibée lors de l'incubation des cellules avec un anticorps bloquant anti- $\alpha v \beta 3$, mais pas lors d'une incubation avec un anticorps bloquant anti- $\beta 1$. Ceci suggère que le récepteur du cyclopeptide est l'intégrine $\alpha v \beta 3$, comme cela avait été précédemment démontré pour le peptide [$\alpha 3(\text{IV})185-203$] (Pasco et coll., 2000b). De plus, des tests de compétition d'adhésion cellulaire montrent que ces deux peptides inhibent l'adhésion des cellules tumorales sur le peptide NC1[$\alpha 3(\text{IV})185-203$]. L'expérience inverse montre également que le peptide NC1[$\alpha 3(\text{IV})185-203$] est capable d'inhiber l'adhésion des cellules sur les peptides CNYYSNS et YSNSG. Ces deux peptides entrent en compétition avec le peptide NC1[$\alpha 3(\text{IV})185-203$] pour sa liaison à l'intégrine $\alpha v \beta 3$, présente à la surface des cellules tumorales, comme démontré avec d'autres petits peptides contenant la séquence YSNS (Shahan et coll., 1999a). L'ensemble de ces résultats suggère que le cyclopeptide YSNSG interagit avec les cellules de mélanome en se liant à l'intégrine $\alpha v \beta 3$, de la même manière que le peptide natif NC1[$\alpha 3(\text{IV})185-203$], et probablement sur le même site. Cette hypothèse devra être confirmée par des études d'interactions moléculaires entre des fragments de l'intégrine et le cyclopeptide, associées à des études de "docking" moléculaire. Le cyclopeptide constitue ainsi un nouvel antagoniste potentiel de cette intégrine largement impliquée dans les phénomènes de progression tumorale.

Le cyclopeptide exerce des activités anti-tumorales sur des cellules de mélanome. *In vitro*, il inhibe les capacités prolifératives et invasives des cellules UACC-903, de manière aussi efficace que le peptide natif CNYYSNS. Le processus d'invasion tumorale dépend de la dégradation de la matrice extracellulaire ainsi que de la migration des cellules tumorales, et

met en jeu des cascades protéolytiques (MMPs et système d'activation du plasminogène). Nous avons donc étudié l'effet des deux peptides sur l'expression et l'activation des MMPs et du plasminogène.

Les peptides YSNSG et CNYYSNS ne modifient pas la sécrétion des pro MMP-2 et -9 *in vitro*. En revanche, ces peptides inhibent fortement l'expression et l'activation de la pro MT1-MMP. En fixant la pro MMP-2 à la surface des cellules, la MT1-MMP induit l'activation de cette gélatinase. L'inhibition d'expression et d'activation de la MT1-MMP explique donc l'inhibition de l'activation de la pro MMP-2 associée aux membranes, que nous avons observée en zymographie gélatine. La MT1-MMP est également capable de dégrader certains composants de la matrice extracellulaire, comme les collagènes I, II et III, les laminines, le nidogène, etc... L'activité de la MT1-MMP est inhibée par le TIMP-2 (Sato et coll., 2005). Dans notre modèle d'étude, la sécrétion du TIMP-2 est augmentée de manière importante, lors de l'incubation des cellules avec les peptides YSNSG et CNYYSNS. Ainsi, l'inhibition d'activation de la MMP-2 et de la MT1-MMP peuvent expliquer, en partie, la forte inhibition des propriétés invasives des cellules de mélanome induite par le cyclopeptide YSNSG et le peptide natif CNYYSNS.

Le système d'activation du plasminogène, faisant intervenir les protéases uPA et tPA, constitue l'autre cascade protéolytique importante impliquée dans l'invasion tumorale (Andreasen et coll., 2000). Les résultats que nous avons obtenus en zymographie gélatine-plasminogène et en Western-blot, montrent que les peptides YSNSG et CNYYSNS induisent une inhibition significative de la sécrétion des activateurs du plasminogène, uPA et tPA, et une forte augmentation de l'expression de leur inhibiteur PAI-1, par les cellules tumorales.

En résumé, l'inhibition de la voie MMP-2/MT1-MMP, associée à l'inhibition du système d'activation du plasminogène, entraînent une diminution de la dégradation de la matrice extracellulaire, et donc une inhibition des propriétés invasives des cellules tumorales (Figure 87).

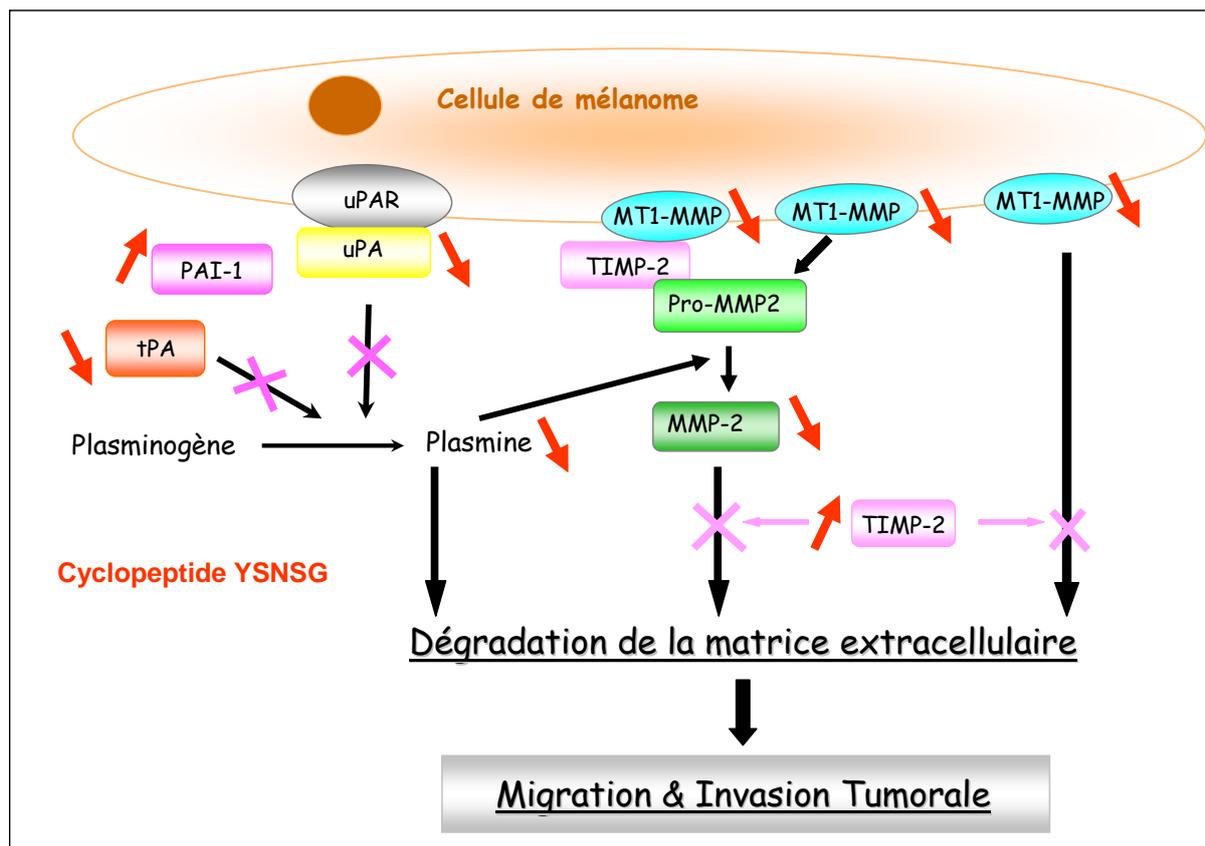


Figure 87 : Schéma récapitulatif des effets du cyclopeptide YSNSG sur les cascades protéolytiques impliquées dans l'invasion tumorale

Les effets du cyclopeptide YSNSG sont indiqués par les flèches rouges

Les résultats obtenus *in vivo*, dans le modèle de mélanome murin, confirment que le cyclopeptide YSNSG inhibe la croissance tumorale de manière au moins aussi efficace que le peptide natif CNYYSNS. En effet, lorsque les cellules B16F1 injectées aux souris C57/B16 sont incubées avec le cyclopeptide YSNSG ou le peptide natif CNYYSNS, la croissance tumorale est fortement inhibée 18 jours après l'induction de la tumeur, et ce de manière quasi identique avec les 2 peptides.

La conception de peptides RGD cycliques, antagonistes des intégrines β_3 , a montré que la cyclisation leur conférait une plus grande résistance aux dégradations protéolytiques et une amélioration de leur biodisponibilité *in vivo* (Kim et coll., 2005 ; Haier et coll., 2002). Dans le modèle de mélanome murin, l'administration du cyclopeptide YSNSG par voie intrapéritonéale, entraîne une inhibition de la croissance tumorale plus importante que dans le cas du traitement avec le peptide natif CNYYSNS. Ces observations suggèrent que le cyclopeptide est plus efficace que le peptide natif CNYYSNS, et qu'il possède une meilleure stabilité, ainsi qu'une meilleure biodisponibilité *in vivo*. Nous devons vérifier, par exemple,

si le cyclopeptide est plus résistant que le peptide linéaire CNYYSNS, lors des digestions par diverses protéases.

Le cyclopeptide YSNSG dérivé de la tumstatine est un antagoniste potentiel de l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Il peut être considéré comme un agent thérapeutique anti-tumoral dans la lutte contre le mélanome.

II.2. EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE DU PEPTIDE C5

L'angiogenèse tumorale est un phénomène crucial, indispensable au développement de la tumeur ; elle constitue donc une cible privilégiée pour les matrikines. L'endostatine l'arrestène, la canstatine ou encore le fragment 54-132 de la tumstatine (tum-5) sont capables de limiter la croissance tumorale en exerçant des activités anti-angiogéniques (Hamano et Kalluri, 2005 ; Tabruyn et Griffioen, 2007). Des études antérieures menées au laboratoire ont montré que le domaine C-terminal NC1[$\alpha 3$ (IV)185-203] exerçait aussi bien des activités anti-tumorales, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Pasco et coll., 2000, Pasco et coll., 2004b), que des activités anti-angiogéniques (Shahan et coll., 2004; Pasco et coll., 2005).

L'analyse immunohistochimique des coupes de tumeurs de souris, traitées ou non avec le cyclopeptide YSNSG, montre que ce peptide est également capable de diminuer l'angiogenèse tumorale *in vivo*. Pour élucider les mécanismes biochimiques responsables de cette activité anti-angiogénique, nous avons étudié les effets du cyclopeptide sur des cellules endothéliales (HUVEC) dans différents modèles *in vitro*. Le cyclopeptide ne modifie pas la prolifération des cellules HUVEC, et n'induit pas de processus apoptotique. En revanche, il inhibe la formation de pseudotubes capillaires lorsque les cellules endothéliales sont cultivées sur un tapis de Matrigel®. Dans un modèle de blessure *in vitro*, il ralentit très nettement la fermeture de la cicatrice artificielle. Etant donné que le cyclopeptide n'inhibe pas la prolifération des cellules HUVEC, l'effet inhibiteur observé dans les deux modèles peut être imputable à une inhibition de la migration cellulaire. Au cours de l'angiogenèse tumorale, les cellules endothéliales de vaisseaux préexistants sont activées par des facteurs angiogéniques, comme le VEGF ou le bFGF, et par l'hypoxie : elles acquièrent alors un phénotype migratoire, caractérisé par l'émission de lamellipodes. Deux systèmes protéolytiques majeurs sont impliqués dans le processus de migration : les MMPs et le système d'activation du plasminogène. L'inhibition de la migration des cellules endothéliales par la galardine et l'aprotinine, dans les modèles de formation de pseudotubes capillaires et de blessure cicatricielle, confirme l'implication de ces deux systèmes protéolytiques. Dans les deux

modèles, l'inhibition observée est voisine de 50 %. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés (Collen et coll., 2003).

Parmi les MMPs, la MT1-MMP favorise la migration cellulaire par son activité protéolytique localisée au niveau des lamellipodes, donc au front de migration. Elle induit également un signal de transduction intracellulaire, par l'intermédiaire de son domaine intracytoplasmique, aboutissant à l'activation des MAP kinases (Genis et coll., 2006 ; Langlois et coll., 2007). L'incubation des cellules HUVEC avec le cyclopeptide YSNSG induit une forte diminution de l'activation de la MT1-MMP, ce qui explique, au moins en partie, son activité anti-angiogénique.

Le système d'activation du plasminogène semble jouer un double rôle : il intervient par son activité protéolytique générée à la surface cellulaire, et par des mécanismes indépendants de cette activité protéolytique (Mazar et coll., 1999 ; Ragno, 2006). La réalisation d'une blessure artificielle dans un tapis de cellules endothéliales induit une nette augmentation de l'expression du récepteur à l'urokinase (uPAR) à la surface des cellules en cours de migration (Pepper et coll., 1993). L'activité uPA est localisée à la membrane cellulaire par son récepteur membranaire uPAR. Lors de nos expériences, le cyclopeptide YSNSG induit une nette inhibition de la sécrétion d'uPA et de l'expression d'uPAR à la surface cellulaire, le tout aboutissant à une forte diminution de l'activité plasmine générée, ce qui contribue également aux effets inhibiteurs du cyclopeptide sur l'angiogenèse.

Lorsqu'il est occupé par uPA, uPAR est capable de stimuler la migration cellulaire indépendamment de l'activité protéolytique. En effet, bien qu'uPAR ne possède pas de domaine transmembranaire, la fixation d'uPA peut induire un signal de transduction intracellulaire, conduisant à la phosphorylation de p125^{FAK}, à l'activation des MAP kinases, et finalement à la migration des cellules endothéliales (Tang et coll., 1998). De plus, uPAR peut également contrôler la migration cellulaire, en interagissant avec les familles d'intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ ou $\beta 3$, par l'intermédiaire de son domaine D2, (Ossowski et Aguirre-Ghiso, 2000; Wey et coll., 2001) (Figure 88).

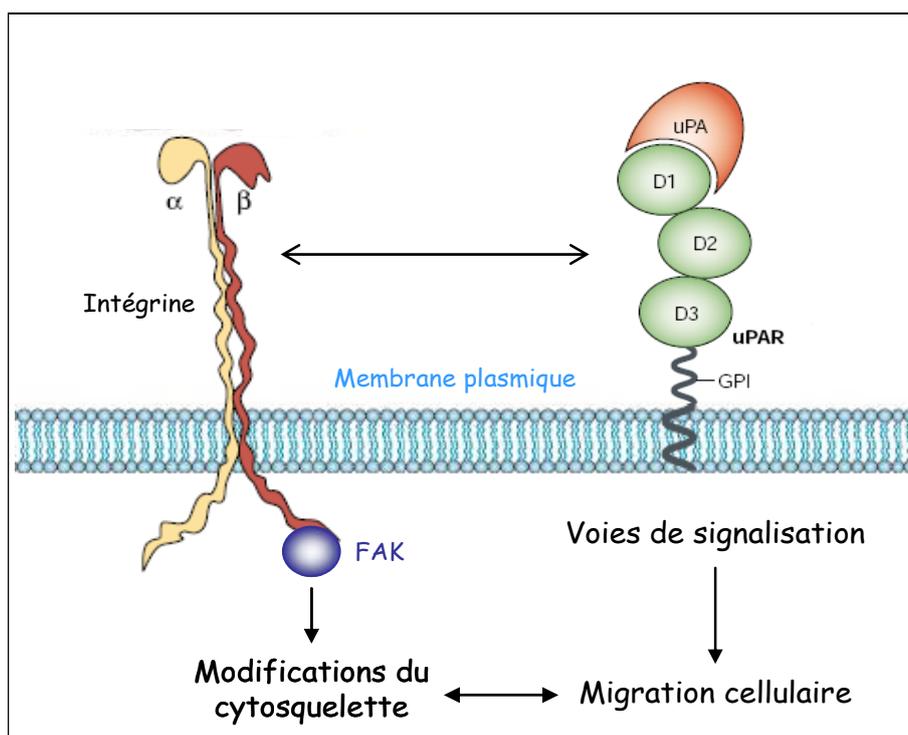


Figure 88 : Implications d'uPAR et du complexe uPAR/intégrine dans le phénomène de migration cellulaire

(Adapté de Blasi et Carmeliet, 2002)

L'incubation des cellules HUVEC avec le cyclopeptide YSNSG affecte le regroupement des intégrines $\beta 1$ dans les lamellipodes, et entraîne une diminution de la phosphorylation de $p125^{\text{FAK}}$. Le tout aboutit à une profonde réorganisation du cytosquelette d'actine, conférant un phénotype non-migratoire aux cellules endothéliales. uPAR constitue donc une cible potentielle pour limiter l'angiogenèse tumorale. Ce type de stratégie thérapeutique anti-angiogénique a déjà été utilisé. L'utilisation d'ARN antisens, ou d'antagonistes d'uPAR, inhibe, *in vitro*, la formation de pseudotubes capillaires par les cellules endothéliales en culture dans des gels de fibrine et, *in vivo*, la croissance tumorale (Min et coll., 1996 ; Li et coll., 1998 ; Lakka et coll., 2001).

Les autres matrikines dérivées des domaines NC1 des chaînes du collagène de type IV, comme l'arrestène, la canstatine ou le fragment tum-5 de la tumstatine, exercent leur activité anti-angiogénique, dans des modèles *in vitro* et *in vivo*, essentiellement en induisant l'apoptose des cellules endothéliales et la diminution de leur synthèse protéique, par l'intermédiaire d'un signal conduisant à l'inhibition de mTOR (Nyberg, 2005; Hamano et Kalluri, 2005). L'ensemble de nos résultats montre que le cyclopeptide YSNSG exerce une

puissante activité anti-angiogénique par un nouveau mécanisme moléculaire, aboutissant à l'inhibition de la protéolyse matricielle par la MT1-MMP et le système uPA/plasmine, et induisant un phénotype non-migratoire des cellules endothéliales.

III. LES MATRIKINES DES DOMAINES NC1 DU COLLAGÈNE DE TYPE IV

Les membranes basales constituent un support pour les cellules épithéliales et endothéliales. En plus de ce rôle architectural, il est maintenant démontré qu'en interagissant avec les cellules, les composants de cette membrane basale peuvent également intervenir dans la régulation du comportement cellulaire. Parmi ces composants, le collagène de type IV joue un rôle crucial lors des phénomènes d'adhésion, de prolifération et de migration cellulaire, aussi bien par l'intermédiaire de son domaine en triple hélice (Kalluri, 2003 ; Chelberg et coll., 1989 ; Chelberg et coll., 1990), que par ses domaines NC1 α (IV) (Ortega et Werb, 2002). La tumstatine inhibe la croissance tumorale *in vivo*, dans différents modèles de cancer, en exerçant à la fois des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales. L'activité anti-angiogénique est due à la séquence 54-132 (Tum-5). Cette séquence réduit la prolifération des cellules endothéliales en induisant leur apoptose, ainsi que la diminution de leur synthèse protéique, par un mécanisme impliquant l'inhibition de l'activation de p125^{FAK}, de la PI3-kinase, de PKB (ou Akt), et de mTOR (Maeshima et coll., 2002). Un tel mécanisme d'inhibition a depuis été démontré dans les cellules de gliome, suggérant que le fragment tum-3 (ou tum-5) de la tumstatine peut aussi exercer des activités anti-tumorales directes (Kawaguchi et coll., 2006). La deuxième séquence active de la tumstatine, la séquence 185-203, inhibe la prolifération de nombreuses cellules tumorales *in vitro*, dans des modèles murin (Han et coll., 1997) et humain (Maeshima et coll., 2000a). En revanche, ces peptides ne modifient pas les capacités prolifératives des fibroblastes dermiques et des cellules endothéliales (Shahan et coll., 1999b). Des études antérieures, menées au laboratoire, ont montré que la surexpression de la tumstatine, et de sa séquence 183-232, inhibait la progression tumorale à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle de mélanome murin (Pasco et coll., 2004b). Les mécanismes moléculaires aboutissant à cette inhibition peuvent être spécifiques des cellules de mélanome murines ou humaines utilisées. Nous avons donc voulu vérifier l'effet de cette séquence sur la progression tumorale, dans un modèle de mélanome

humain, en induisant la surexpression du domaine NC1[α 3(IV)181-229], par transfection stable des cellules de mélanome humain UACC-903. De plus, nous avons comparé les effets de la séquence NC1[α 3(IV)181-229] (α 3C) à ceux induits par la séquence NC1[α 5(IV)181-229] (α 5C). Dans cette dernière, la séquence YSNS, responsable de l'activité anti-tumorale de la tumstatine, est remplacée par une séquence YANS, et le peptide synthétique correspondant est incapable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (Han et coll., 1997).

La surexpression de la séquence α 3C entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire, sans induire de phénomène d'apoptose, alors que la séquence α 5C est sans effet. Ceci confirme les résultats obtenus avec les peptides synthétiques (Han et coll., 1997). L'inhibition de prolifération induite par la surexpression de la séquence 181-229 de la tumstatine, dans le modèle de mélanome murin, est corrélée à une diminution de l'expression de la cycline D1 *in vivo*, suggérant un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Pasco et coll., 2004b). Pour élucider les mécanismes responsables de l'inhibition de prolifération observée dans le modèle de mélanome humain, nous avons étudié l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine pRb, associée au facteur de transcription E2F, permet le maintien des cellules en phase G1. Lorsque les kinases dépendantes des cyclines (CDK), associées aux cyclines, phosphorylent pRb, le complexe pRb/E2F se dissocie, une seconde phosphorylation de pRb par les CDK intervient, permettant la libération totale de pRb sous sa forme hyper-phosphorylée, et de E2F : E2F active alors la transcription des cyclines nécessaires pour la transition du cycle G1/S. La protéine p21^{WAF-1} est un inhibiteur des CDK, et maintient pRb sous sa forme hypo-phosphorylée, piégeant ainsi E2F : le cycle cellulaire reste bloqué en phase G1 (Javelaud et Besancon, 2000 ; Meijer, 2003). La surexpression du domaine α 3C induit une forte augmentation de l'expression de la protéine p21^{WAF-1}, ainsi qu'une forte diminution de la phosphorylation de pRb, suggérant un blocage du cycle cellulaire en phase G1. Un tel blocage devra être confirmé par une étude en cytométrie de flux, après marquage des cellules à l'iodure de propidium. Ces deux résultats peuvent donc expliquer, au moins en partie, l'inhibition de prolifération des cellules de mélanome humain précédemment observée.

De la même façon, nous avons démontré l'inhibition de l'invasion cellulaire par le domaine α 3C, mais pas par le domaine α 5C. La surexpression de la tumstatine par les cellules de mélanome murin, induit une inhibition du système de la plasmine (Pasco et coll., 2004b). En revanche, dans les cellules UACC-903, la surexpression du domaine α 3C ne modifie pas l'activité plasminogène générée dans les milieux de culture. Pour expliquer l'inhibition des

propriétés invasives, nous avons étudié les MMPs et leurs inhibiteurs, les TIMPs. La MMP-2 et la MT1-MMP sont très largement impliquées dans la progression du mélanome (Hofmann et coll., 2000a ; Hofmann et coll., 2000). La sécrétion de pro MMP-2 n'est pas modifiée, en revanche, son activation est considérablement inhibée, comme le montre l'analyse des extraits membranaires en zymographie gélatine. L'activation de la MT1-MMP est très fortement diminuée, ce qui peut notamment expliquer l'inhibition d'activation de la pro MMP-2. La MT1-MMP intervenant également de manière directe dans la dégradation de la matrice extracellulaire, l'inhibition de son activation est donc directement responsable de la diminution des capacités invasives des cellules. En revanche, l'expression globale de la MT1-MMP ne paraît pas modifiée, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel. Il conviendra d'analyser les effets des inhibiteurs potentiels du domaine $\alpha 3C$ sur les proprotéines convertases de type furine responsables de l'activation de la MT1-MMP, comme la furine, ou bien encore PACE4, PC5 et PC7 (Remacle et coll., 2006). L'inhibition des capacités prolifératives et invasives des cellules surexprimant le domaine $\alpha 3C$, dans le modèle de mélanome humain, permet d'expliquer le large effet inhibiteur observé sur la croissance tumorale *in vivo*, chez les souris surexprimant le domaine $\alpha 3C$, après électroporation *in vivo*.

Par ailleurs, lors des expériences d'électroporation *in vivo*, les souris surexprimant le domaine NC1[$\alpha 4(IV)$ 181-229] présentent une nette inhibition de leur croissance tumorale, plus importante qu'avec le domaine NC1[$\alpha 3(IV)$ 181-229]. Des études antérieures ont montré l'absence d'activité du domaine NC1[$\alpha 4(IV)$] sur l'angiogenèse, et sur la croissance tumorale des mélanomes (Petitclerc et coll., 2000). De manière contradictoire, des études récentes ont attribué une activité anti-angiogénique, *in vitro*, à de petits peptides issus de la chaîne $\alpha 4(IV)$ (Karagiannis et Popel, 2007).

Nous avons donc étudié les effets des domaines NC1[$\alpha 4(IV)$ 1-229] ($\alpha 4L$) et NC1[$\alpha 4(IV)$ 181-229] ($\alpha 4C$) sur la progression tumorale *in vitro*, dans le modèle de mélanome humain. La surexpression des domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ induit une inhibition de la prolifération des cellules UACC-903, ainsi que de leurs propriétés invasives. Après transfection stable des cellules cancéreuses humaines, l'expression des domaines protéiques d'intérêt par les cellules a été mise en évidence, au niveau ARNm par RT-PCR, et au niveau protéique par immunocytochimie. En revanche, leur sécrétion dans le milieu de culture n'a pas encore pu être démontrée de manière directe. Les milieux conditionnés de cellules

surexprimant les domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ inhibent l'invasion des cellules UACC-903 non transfectées, alors que les milieux conditionnés par les cellules transfectées par le plasmide vide (Mock) sont sans effet. Ces résultats suggèrent que les cellules surexprimant $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$, mais pas les cellules Mock, sécrètent dans le milieu de culture, soit les domaines d'intérêt, soit une autre molécule diffusible, capable d'inhiber les capacités invasives des cellules tumorales. L'absence de détection des fragments d'intérêt dans les milieux de culture peut s'expliquer par une dégradation rapide, par une fixation rapide au récepteur, ou encore par une faible synthèse protéique.

L'inhibition de prolifération des cellules surexprimant les domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$, n'est pas imputable à un phénomène d'apoptose. Pour tenter d'expliquer les mécanismes responsables de cette inhibition, l'étude des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire s'avère nécessaire. Des résultats préliminaires montrent que la surexpression du domaine $\alpha 4C$ induit une diminution de la protéine phospho-pRb, et une très forte augmentation de p21^{WAF-1}, suggérant un blocage du cycle cellulaire en phase G1, comme nous l'avions montré avec le domaine $\alpha 3C$. Ces résultats préliminaires demandent toutefois à être complétés par une étude du cycle cellulaire en cytométrie de flux, après marquage des cellules à l'iodure de propidium.

Pour expliquer les mécanismes moléculaires responsables de l'effet inhibiteur obtenu sur les propriétés invasives des cellules de mélanome, nous avons étudié les cascades protéolytiques mises en jeu. L'absence d'effet inhibiteur de l'aprotinine sur l'invasion des cellules tumorales, suggère l'absence d'implication du système d'activation du plasminogène ; la sécrétion d'uPA et de tPA, ainsi que l'activité plasmine ne sont pas modifiées. En revanche, l'inhibition de l'invasion exercée par la galardine indique l'implication de MMPs dans le processus de migration. Les sécrétions de la MMP-2 et du TIMP-2 ne sont pas modifiées par les domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$. La sécrétion du TIMP-3, sous les formes glycosylée et non glycosylée, et/ou du TIMP-1 est très fortement inhibée. Cependant, l'absence de TIMP-3 dans les cellules tumorales ne semble pas modifier leur potentiel tumorigénique, contrairement au déficit en TIMP-3 dans les cellules stromales (Cruz-Munoz et coll., 2006). La surexpression des domaines $\alpha 4C$ et $\alpha 4L$ diminue l'expression de la MT1-MMP, ainsi que son activation de plus de 65%. Cette protéase est cruciale dans les processus de migration, comme nous l'avons précédemment souligné. Ceci peut expliquer l'inhibition de l'invasion cellulaire. Comme dans le cas de la surexpression du

domaine $\alpha 3C$, nous devons rechercher un effet inhibiteur sur les protéases activatrices de la MT1-MMP.

En plus de l'implication de la MT1-MMP dans les processus de migration, l'adhésion des cellules tumorales aux composants de la matrice peut influencer sur leurs capacités d'invasion. Les cellules de mélanome adhèrent, s'étalent et migrent lorsqu'elles sont ensemencées sur des tapis constitués de domaines riches en triple hélice de collagène de type IV, générés par digestion du collagène IV par la pepsine. En revanche, lorsque les tapis sont constitués majoritairement de domaines NC1 purifiés de la protéine, ces cellules adhèrent, s'étalent, mais ne migrent plus (Chelberg et coll., 1989). Nous avons démontré que la surexpression des domaines $\alpha 4L$, et surtout $\alpha 4C$, augmentent fortement l'adhésion des cellules UACC-903 sur la membrane basale, ce qui pourrait également contribuer à l'inhibition de leurs capacités migratoires. Il serait intéressant d'étudier d'éventuelles modifications d'expression et/ou de répartition de molécules d'adhésion, telles que les intégrines.

Alors que, jusqu'à présent, le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4(IV)$ semblait dénué d'activité anti-tumorale ou anti-angiogénique, nous venons de démontrer que sa surexpression, *in vitro* par des cellules de mélanome et *in vivo* chez la souris, induit une forte diminution de la progression tumorale. Cette activité est, au moins en partie, reproduite par le fragment C-terminal $\alpha 4C$ de ce domaine NC1. Il a été précédemment montré qu'un peptide synthétique reproduisant la séquence $\alpha 4(IV)182-200$ n'exerçait aucun effet inhibiteur sur la prolifération des cellules de mélanome (Han et coll., 1997), ou sur l'activation des polynucléaires neutrophiles (Monboisse et coll., 1994). Ce peptide contient la séquence FANK à la place de la séquence YSNS, responsable de l'activité biologique du peptide $\alpha 3$ correspondant. Une étude récente montre que 3 peptides d'une vingtaine d'acides aminés, appelés tétrastatines et reproduisant des séquences de la chaîne $\alpha 4(IV)$, sont capables d'inhiber la migration de cellules HUVEC *in vitro*, sans modifier leur prolifération (Karagiannis et Popel, 2007). Les séquences les plus efficaces sont les tétrastatines 1 et 3, qui correspondent respectivement aux résidus 1514-1533 et 1628-1646 de la chaîne $\alpha 4(IV)$, soit aux résidus 55-74 et 169-187 du domaine NC1[$\alpha 4(IV)$]. La tétrastatine 1 n'est pas localisée dans le fragment C-terminal $\alpha 4C$. En revanche, la tétrastatine 3 (résidus 169-187), qui n'exerce pas d'effet significatif sur la prolifération des cellules HUVEC mais inhibe fortement leur migration, recouvre partiellement le peptide $\alpha 4(IV)182-200$ précédemment testé. Afin de déterminer la ou les séquence(s) du domaine NC1[$\alpha 4(IV)$] responsable(s) de l'activité anti-tumorale, nous utiliserons divers peptides synthétiques, conçus à partir de ces différents résultats.

IV. ESSAIS THÉRAPEUTIQUES

A partir des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, sur l'activité anti-tumorale de la tumstatine et du domaine NC1[α 4(IV)], nous avons tenté de développer une stratégie thérapeutique basée sur la surexpression de ces matrikines chez la souris. La surexpression *in vivo* peut être induite à partir de vecteurs viraux, notamment d'adénovirus, avec des inconvénients et des risques liés aux propriétés mêmes des vecteurs viraux, ainsi qu'aux réactions immunitaires vis-à-vis des protéines de l'enveloppe virale et à la transformation maligne des cellules infectées (Académie nationale de médecine, 2001). De telles constructions ont été utilisées pour la surexpression de la canstatine, de l'endostatine, ou de la tumstatine (Folkmann, 2006 ; Magnon et coll., 2006 ; Myioshi et coll., 2006). Des stratégies de délivrance intramusculaire de plasmides codant la tumstatine ont déjà été utilisées *in vivo* chez la souris, entraînant une augmentation relativement faible de la concentration sérique de cette matrikine, mais induisant néanmoins une diminution du volume tumoral (Yao et coll., 2005). Pour notre part, nous avons choisi d'utiliser une stratégie de délivrance intramusculaire de plasmides codant les matrikines d'intérêt après électroporation *in vivo*, en collaboration avec le Dr L. Mir (IGR, Villejuif), à partir d'un protocole bien établi (André et Mir, 2004).

La concentration basale de tumstatine dans le sang des souris est de l'ordre de 2 μ g/mL. Cette concentration est supérieure d'environ 6 fois à celle précédemment publiée (0,35 μ g/mL) (Hamano et coll., 2003). Toutefois, les conditions expérimentales lors du dosage ELISA sont différentes, tout comme les anticorps utilisés. De plus, cette concentration basale en tumstatine est également nettement supérieure à celle de l'endostatine (entre 0,03 et 0,10 μ g/ml) (John et coll., 1999 ; Standker et coll., 1997).

Dès le premier jour suivant l'électroporation, la matrikine d'intérêt est détectée dans le sérum et sa production se poursuit pendant au moins 28 jours. La concentration maximale, qui paraît atteindre un plateau à partir du 15^{ème} jour, est d'environ 120 μ g/mL, soit 60 fois supérieure à la concentration basale. La concentration sérique obtenue est alors très proche, en molarité, de la concentration utilisée lors des tests *in vitro*.

La surexpression du domaine α 3L inhibe efficacement la croissance tumorale *in vivo* dans le modèle de mélanome murin, puisque le volume tumoral à J14 est diminué de 65 %. En revanche, la surexpression du domaine α 3C est moins efficace, avec une inhibition de l'ordre de 20 %. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence d'efficacité : i) le domaine α 3C ne contient pas la séquence 54-132 responsable de l'activité anti-angiogénique,

et capable d'inhiber la croissance tumorale à elle seule (Hamano et coll., 2003 ; Yao et coll., 2005 ; Miyoshi et coll., 2006) ; ii) le domaine $\alpha 3C$ peut être plus sensible aux dégradations protéolytiques, ou il peut être synthétisé à une concentration moindre. Un tel résultat a déjà été observé dans le modèle de mélanome murin : la surexpression du domaine $\alpha 3C$ n'induisait pas d'inhibition de la dissémination métastatique, contrairement au domaine $\alpha 3L$ (Pasco et coll., 2004b).

Les domaines $\alpha 4L$ et $\alpha 4C$ inhibent la croissance tumorale de manière drastique, avec une réduction du volume tumoral de 89 % et 33 % respectivement. L'effet exercé par le domaine $\alpha 4C$ est, comme dans le cas de la tumstatine, moins important. Toutefois les séquences responsables de l'activité anti-tumorale pour le domaine $\alpha 4(IV)$ étant encore inconnues, il est possible que la partie C-terminale de ce domaine, correspondant aux résidus 181-229, ne contienne pas la totalité des séquences actives.

Au vu de l'inhibition de croissance tumorale induite par la surexpression des domaines $\alpha 3L$ et $\alpha 4L$, nous avons étudié la survie des animaux. Pour ce faire, nous avons choisi de sacrifier les souris lorsque le volume tumoral atteignait 1 cm³ (Miyoshi et coll., 2006). La surexpression des domaines $\alpha 3L$ et surtout $\alpha 4L$ augmente de façon très significative la durée de vie des souris, ce qui constitue un résultat très encourageant. Toutefois, ces résultats demandent à être confirmés et corrélés à la concentration de matrikines circulantes.

Dans l'introduction de ce manuscrit nous avons rappelé qu'actuellement, dans le cas du mélanome, seule l'exérèse chirurgicale est efficace ; les traitements contre la dissémination métastatique restent très décevants. Nous devons donc tester l'effet de la surexpression des domaines $\alpha 3L$ et $\alpha 4L$ sur la formation de métastases chez la souris, soit après injection de cellules de mélanome B16F1 par voie intraveineuse, soit par utilisation d'un modèle de formation spontanée de métastases, après injection de cellules de mélanome B16G3, et excision de la tumeur primaire (Hofmann et coll., 2003).

V. DISCUSSION GENERALE

La progression tumorale, en particulier la progression du mélanome, fait intervenir divers partenaires, impliqués à la fois dans l'invasion locale, l'angiogenèse tumorale, et dans la dissémination métastatique. Les cascades protéolytiques, les MMPs et le système

d'activation du plasminogène, ainsi que les facteurs pro-angiogéniques (VEGF et bFGF) et les intégrines, constituent autant de cibles potentielles pour envisager une stratégie thérapeutique efficace.

L'inhibition des MMPs a fait l'objet de nombreuses études, et a été recherchée lors de stratégies visant à inhiber leur expression, activation et activité enzymatique. Parmi les MMPs, la MT1-MMP joue un rôle crucial en intervenant dans l'invasion locale, d'une part en dégradant la matrice extracellulaire environnante, d'autre part en activant des pro MMPs. De plus, elle est responsable de l'initiation de la migration des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse (Genis et coll., 2006); elle constitue donc une cible privilégiée dans le traitement du cancer.

Concernant l'inhibition de l'expression des MMPs, diverses cytokines comme l'interféron γ ou le TGF β , ainsi que des inhibiteurs des voies de transduction conduisant à leur expression, ont été utilisés. De même, des stratégies de thérapie génique visant à restaurer l'expression de facteurs de transcription perdue au cours de la progression tumorale (p53, PTEN), permettent d'induire à nouveau la répression de certaines MMPs (Overall et Lopez-Otin, 2002). L'activation des pro MMPs peut, elle aussi, être la cible de stratégies thérapeutiques, notamment avec les TIMPs. De nombreux inhibiteurs de l'activité enzymatique des MMPs ont été testés dans des essais cliniques de phase I et II (batimastat, marimastat, ...). Toutefois, l'absence de succès notable et l'induction d'effets secondaires indésirables ont généralement conduit à l'arrêt de leur utilisation (Chantrain et DeClerck, 2002). Les travaux futurs devraient aboutir à une diminution de leur toxicité *in vivo*, et à une amélioration de leur spécificité, notamment sur la base d'études structurales (Cuniasse et coll., 2005).

L'angiogenèse tumorale est une cible prometteuse dans la lutte contre la progression tumorale et a fait l'objet de diverses stratégies thérapeutiques, dont certaines sont en cours de phase clinique très avancée (Clamp et Jayson, 2005 ; Folkman, 2006). Cependant, l'utilisation d'anticorps anti-VEGF, ou d'inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs de croissance pro-angiogéniques, a donné lieu à d'importants effets secondaires et n'a pas été poursuivie dans le cadre des traitements anti-cancéreux, malgré une efficacité certaine (Folkman, 2006).

Nous avons souligné l'importance des intégrines lors du processus d'angiogenèse, avec un rôle majeur pour l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Cette intégrine, fortement exprimée par les cellules de mélanome et les cellules endothéliales activées, constitue une cible potentielle.

Divers antagonistes et peptides contenant la séquence RGD ont été proposés (Hood et coll., 2002). Ces derniers ont fait l'objet de nombreuses études et leur cyclisation a nettement amélioré leur activité biologique, ainsi que leur biodisponibilité (Kim et coll., 2005 ; Haier et coll., 2002). Par ailleurs, nous avons précisé l'importance d'un autre récepteur, uPAR, lors de l'angiogenèse tumorale, et souligné les diverses stratégies ciblées sur ce récepteur, à partir d'antagonistes ou de siRNA (Min et coll., 1996 ; Li et coll., 1998 ; Lakka et coll., 2001).

Les matrikines sont générées par une protéolyse ménagée de macromolécules matricielles, essentiellement réalisée par des MMPs (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MT1-MMP,...). Certaines matrikines, comme celles dérivées des chaînes des laminines 1 ou 5, ou les élastokines provenant de la dégradation partielle des peptides d'élastine, exercent des activités pro-tumorales et pro-angiogéniques (Pasco et coll., 2004a ; Robinet et coll., 2005 ; Devy et coll., en préparation). Au contraire, les matrikines dérivées des collagènes de membrane basale, notamment leurs domaines non collagéniques C-terminaux, limitent la progression tumorale en exerçant à la fois des propriétés anti-tumorales et anti-angiogéniques (Pasco et coll., 2004a). L'endostatine, dérivée du domaine C-terminal du collagène XVIII, a fait l'objet de très nombreuses études démontrant les mécanismes de son activité anti-tumorale et anti-angiogénique (Folkman, 2006). Ces études ont conduit au développement thérapeutique de cette matrikine, utilisée sous forme de protéines recombinantes natives, ou chimiquement modifiées, seule ou en association à une chimiothérapie, ou encore par surexpression *in vivo* à partir de vecteurs viraux. Cependant, des souris surexprimant l'endostatine *in vivo* souffrent, à long terme, de problèmes oculaires (Elamaa et coll., 2005).

La tumstatine, dérivée du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3$ du collagène IV, exerce aussi des activités anti-angiogéniques et anti-tumorales par l'intermédiaire de 2 séquences distinctes :

- la séquence 54-132 (Tum-5), responsable de l'activité anti-tumorale
- la séquence 185-203, responsable de l'activité anti-angiogénique

Toutefois, la séquence 54-132 exerce également une activité anti-tumorale directe (Yao et coll., 2006), tout comme la séquence 185-203 exerce une activité anti-angiogénique (Shahan et coll., 2004 ; Pasco et coll., 2005). La tumstatine a été utilisée dans diverses stratégies thérapeutiques comme l'endostatine, par utilisation de domaines protéiques recombinants natifs ou modifiés (Yokoyama et Ramakrishnan, 2005 ; Meng et coll., 2006), par surexpression *in vivo* après injection intramusculaire de constructions plasmidiques (Yao et coll., 2005), ou à l'aide de vecteurs viraux ciblés avec le promoteur h-TERT de télomérase (Myiوشي et coll., 2006). L'utilisation de la tumstatine peut parfois engendrer des

complications immunologiques, puisque ce domaine contient l'épitope reconnu par les anticorps lors du syndrome de Goodpasture (Borza et coll., 2000).

Au cours de notre travail, nous avons démontré l'activité anti-tumorale et anti-angiogénique de matrikines dérivées des collagènes de membrane basale, comme le fragment C-terminal de la tumstatine, le domaine NC1[α 4(IV)], ou le domaine NC1[α 1(XIX)], dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de mélanome murin et humain. A partir des résultats obtenus, nous avons développé des stratégies thérapeutiques suivant 2 axes parallèles. D'une part, un analogue structural, le cyclopeptide YSNSG, a été conçu. L'étude des mécanismes biochimiques de son activité anti-tumorale a révélé qu'il était un puissant agent anticancéreux, plus stable *in vivo* que le peptide natif, et capable d'inhiber l'expression et l'activation de diverses MMPs, notamment de la MT1-MMP. Il exerce son activité anti-angiogénique en induisant un phénotype non migratoire des cellules endothéliales. D'autre part, nous avons induit la surexpression de la tumstatine et du domaine NC1[α 4(IV)] *in vivo*, chez la souris, par électrotransfert de constructions plasmidiques. Nous avons montré que cette surexpression induit un net ralentissement de la progression tumorale, corrélé à un allongement de la survie des souris. Au cours de ces traitements, aucun effet secondaire au niveau de l'oeil et des reins n'a été constaté, même à long terme (sur une durée d'un an).

Le cyclopeptide YSNSG constitue un agent anticancéreux particulièrement intéressant à développer, dans la mesure où il s'est révélé être un puissant inhibiteur de l'expression et de l'activation des MMPs, ainsi qu'un antagoniste de l'intégrine α v β 3 et du récepteur uPAR. Sa courte séquence peptidique et sa conformation structurale contrainte le rendent moins sensibles à une dégradation précoce *in vivo*, d'où sa stabilité accrue. De plus, il ne contient pas l'épitope reconnu dans le cas du syndrome de Goodpasture.

Les domaines NC1[α 3(IV)] et NC1[α 4(IV)] représentent donc des agents anticancéreux endogènes potentiels. *In vivo*, par leur présence simultanée au sein des membranes basales, ils peuvent assurer une protection contre l'invasion locale de certains cancers, comme précédemment démontré pour la tumstatine (Polette et coll., 1997 ; Catusse et coll., 2000 ; Caudroy et coll., 2004).

F-Conclusions & Perspectives

Nous avons démontré que les domaines NC1[α 1(XIX)] et NC1[α 4(IV)] constituaient de nouvelles matrikines aux forts potentiels anti-tumoral et anti-angiogénique. L'étude de la structure tridimensionnelle de ces matrikines sera intéressante pour la suite des travaux. En effet, les données structurales concernant les domaines NC1[α 1(XIX)] et NC1[α 4(IV)], ainsi que l'identification de leur(s) récepteur(s) pourront mener au développement d'analogues peptidiques, grâce notamment à des études de "docking" moléculaire, afin d'optimiser leur activité biologique. En collaboration avec le Professeur D. Guillaume (IFR 53 Biomolécules), nous poursuivrons le développement du cyclopeptide YSNSG par l'élaboration d'un pseudopeptide cyclisé, conservant toujours la structure en coude β indispensable à l'activité biologique. D'autre part, nous modifierons les chaînes latérales de certains acides aminés constitutifs en respectant les différents groupements hydroxyle présents. Ces modifications pourront être la fixation d'acides gras à longues chaînes carbonées, comme l'acide élaïdique, pour finalement constituer un pseudo-lipopeptide. Ce dernier devrait ainsi être capable d'inhiber l'expression, l'activation et l'activité enzymatique des protéases impliquées dans la progression tumorale.

Le domaine NC1[α 4(IV)] exerce une puissante activité anti-tumorale, essentiellement localisée dans sa partie C-terminale, puisque le domaine α 4C reproduit en partie cette activité. Nous chercherons à déterminer la ou les séquence(s) responsable(s) de cette activité anti-tumorale, le ou les récepteur(s) impliqué(s), ainsi que les voies de signalisation induites par l'interaction des matrikines avec ces récepteurs. Qu'en est-il de son activité anti-angiogénique? Par utilisation de peptides synthétiques reproduisant les séquences actives, ou par transfection stable de cellules endothéliales humaines, nous étudierons l'effet de cette nouvelle matrikine sur l'angiogénèse, étape cruciale lors de la progression tumorale.

La tumstatine a été initialement identifiée pour son effet sur les cellules inflammatoires, en inhibant l'activation des polynucléaires neutrophiles, caractérisée par la production de radicaux libres oxygénés et l'exocytose de granules dans le cytoplasme (Monboisse et coll., 1994 ; Fawzi et coll., 2000). Nous étudierons donc l'effet des différentes matrikines sur la composante inflammatoire qui intervient lors d'un traitement. Pour cela, nous utiliserons le modèle de puces ADN, pour déterminer les gènes régulés et les cytokines impliquées, *in vivo*, chez des souris traitées par ces matrikines. Différentes cytokines inflammatoires (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN γ , TNF α , IL-12p70) seront dosées par méthode ELISA, ou par cytométrie de flux, et leur cinétique de production sera analysée.

Le devenir de ces matrikines *in vivo*, après leur administration, reste à étudier. Pour ce faire, nous pourrions les coupler à des substrats fluorescents, afin de suivre leur répartition, les cibles touchées, ainsi que leur durée de vie. Actuellement, l'utilisation d'un vecteur comme le raft-RGD représente un nouvel outil efficace pour suivre le devenir de molécules *in vivo*. Ce raft-RGD est constitué de 4 peptides RGD cycliques couplés à un radeau lipidique, et se fixe sur les intégrines $\alpha\beta_3$ avec une affinité supérieure à celle d'un peptide RGD simple (Garanger et coll., 2006 ; Jin et coll., 2006 ; Jin et coll., 2007). Cette méthode représente un moyen non invasif de suivre l'évolution des matrikines et pourrait être utilisée dans le cas de la tumstatine ou du cyclopeptide, pour lesquels l'intégrine $\alpha\beta_3$ sert de récepteur.

Afin d'améliorer l'action de ces matrikines en thérapeutique, nous envisageons de cibler leur expression *in vivo*, dans les cellules tumorales. De telles expériences ont été réalisées avec la tumstatine, dans un modèle où la séquence de cette matrikine est insérée dans un plasmide sous contrôle du promoteur hTERT, exprimé de manière spécifique dans les cellules tumorales (Myoshi et coll., 2006). D'autre part, le mode de délivrance *in vivo* est un élément clé pour l'action des molécules anti-cancéreuses. L'administration de l'endostatine intégrée dans des microcapsules a donné des résultats prometteurs (Joki et coll., 2001). Nous pourrions utiliser des nanocapsules contenant soit les domaines α_3C ou α_4C recombinants, soit des analogues structuraux.

A terme, ce travail permettra de proposer de nouvelles molécules et stratégies thérapeutiques permettant de limiter la progression tumorale et la dissémination métastatique, non seulement dans le cas du mélanome, mais aussi dans d'autres cancers.

G-Bibliographie

ABRAHA HD, FULLER LC, DU VIVIER AW, HIGGINS EM, SHERWOOD RA.
Serum S-100 protein: a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma.
Br J Dermatol 1997 ; 137 (3) : 381-385.

ACADEMIE NATIONALE DE MEDECINE

La thérapie génique : bilan et perspectives. Gene therapy : present situation and prospects.
Rapport adopté le 6 novembre 2001. [Consulté le 08/10/2007]. Disponible à partir de : URL
<http://www.academie-medecine.fr/detailPublication.cfm?idRub=26&idLigne=166>

ADATIA R, ALBINI A, CARLONE S, GIUNCIUGLIO D, BENELLI R, SANTI L, *et al.*
Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan
cDNA.
Ann Oncol 1997 ; 8 (12) : 1257-1261.

ALBELDA SM, METTE SA, ELDER DE, STEWART R, DAMJANOVICH L, HERLYN M, *et al.*
Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor
progression.
Cancer Res 1990 ; 50 (20) : 6757-6764.

AMENTA PS, HADAD S, LEE MT, BARNARD N, LI D, MYERS JC.
Loss of types XV and XIX collagen precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of
the female breast.
J Pathol 2003 ; 199 (3) : 298-308.

ANDRE F, MIR LM.

DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications.
Gene Ther 2004 ; 11 : S33-42.

ANDREASEN PA, KJOLLER L, CHRISTENSEN L, DUFFY MJ.
The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis.
Int J Cancer 1997 ; 72 (1) : 1-22.

ANDREASEN PA, EGELUND R, PETERSEN HH.

The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis.

Cell Mol Life Sci 2000 ; 57 (1) : 25-40.

ANDREASSI L, FLORI ML, RUBEGNI P.

Sun and skin. Role of phototype and skin colour.

Adv Exp Med Biol 1999 ; 455 : 469-475.

AUMAILLEY M, TIMPL R.

Attachment of cells to basement membrane collagen type IV.

J Cell Biol 1986 ; 103 (4) : 1569-1575.

AUMAILLEY M, KRIEG T.

Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes.

J Invest Dermatol 1996 ; 106 (2) : 209-214.

BARAMOVA EN, COUCKE P, LEPRINCE P, DE PAUW-GILLET MC, BASSLEER R, FOIDART JM.

Evaluation of matrix metalloproteinases and serine proteases activities in three B16 melanoma cell lines with distinct tumorigenic potential.

Anticancer Res 1994 ; 14 (3A) : 841-846.

BAUVOIS B.

Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis?

Oncogene 2004 ; 23 (2) : 317-329.

BENDER BL, JAFFE R, CARLIN B, CHUNG AE.

Immunolocalization of entactin, a sulfated basement membrane component, in rodent tissues, and comparison with GP-2 (laminin).

Am J Pathol 1981 ; 103 (3) : 419-426.

BERGER G, JAVAHERIAN K, LO KM, FOLKMAN J, HANAHAN D.

Effect of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice.

Science 1999 ; 284 : 808-812.

BERGER G, BENJAMIN LE.

Tumorigenesis and the angiogenic switch.

Nat Rev Cancer 2003 ; 6 : 401-410.

BESCH R, BERKING C, KAMMERBAUER C, DEGITZ K.

Inhibition of urokinase-type plasminogen activator receptor induces apoptosis in melanoma cells by activation of P53.

Cell Death Differ 2007 ; 14 (4) : 818-829.

BEZAKOVA G, RUEGG MA.

New insights into the roles of agrin.

Nat Rev Mol Cell Biol 2003 ; 4 (4) : 295-308.

BIX G, FU J, GONZALEZ EM, MACRO L, BARKER A, CAMPBELL S, *et al.*

Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin.

J Cell Biol 2004 ; 166 (1) : 97-109.

BIX G, IOZZO RV.

Matrix revolutions: "tails" of basement-membrane components with angiostatic functions.

Trends Cell Biol 2005 ; 15 (1) : 52-60.

BIX G, CASTELLO R, BURROWS M, ZOELLER JJ, WEECH M, IOZZO RA, *et al.*

Endorepellin *in vivo*: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism.

J Natl Cancer Inst 2006 ; 98 (22) : 1634-1646.

BLASI F, CARMELIET P.

uPAR: a versatile signalling orchestrator.

Nat Rev Mol Cell Biol 2002 ; 3 (12) : 932-943.

BODE W, FERNANDEZ-CATALAN C, GRAMS F, GOMIS-RUTH FX, NAGASE H, TSCHESCHE H, *et al.*

Insights into MMP-TIMP interactions.

Ann N Y Acad Sci 1999 ; 878 : 73-91.

BORDIER C.

Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution.

J Biol Chem 1981 ; 256 (4) : 1604-1607.

BORZA DB, NETZER KO, LEINONEN A, TODD P, CERVERA J, SAUS J, HUDSON BG.

The goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3(IV) collagen chain.

J Biol Chem 2000 ; 275 (8) : 6030-6037.

BOSMAN FT, STAMENKOVIC I.

Functional structure and composition of the extracellular matrix.

J Pathol 2003 ; 200 (4) : 423-428.

BRESLOW L.

Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.

Ann Surg 1970 ; 172 (5) : 902-908.

BROOKS PC, STROMBLAD S, SANDERS LC, VON SCHALSCHA TL, AIMES RT, STETLER-STEVENSON WG, *et al.*

Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.

Cell 1996 ; 85 (5) : 683-693.

BUTLER GS, BUTLER MJ, ATKINSON SJ, WILL H, TAMURA T, SCHADE VAN WESTRUM S, *et al.*

The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study.

J Biol Chem 1998 ; 273 (2) : 871-880.

BUTKOWSKI RJ, LANGEVELD JP, WIESLANDER J, HAMILTON J, HUDSON BG.

Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen.

J Biol Chem 1987 ; 262 (16) : 7874-7877.

BUTKOWSKI RJ, WIESLANDER J, KLEPPEL M, MICHAEL AF, FISH AJ

Basement membrane collagen in the kidney: regional localization of novel chains related to collagen IV.

Kidney Int 1989 ; 35 (5) : 1195-1202.

CAO Y, CHEN A, AN SS, JI RW, DAVIDSON D, LLINAS M.

Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth.

J Biol Chem 1997 ; 272 (36) : 22924-22928.

CAPON F, EMONARD H, HORNEBECK W, MAQUART FX, BERNARD P.

Expression and activation of pro-gelatinase A by human melanoma cell lines with different tumorigenic potential.

Clin Exp Metastasis 1999 ; 17 (6) : 463-469.

CAUDROY S, CUCHEROUSSET J, LORENZATO M, ZAHM JM, MARTINELLA-CATUSSE C, POLETTE M, *et al.*

Implication of tumstatin in tumor progression of human bronchopulmonary carcinomas.

Hum Pathol 2004 ; 35 (10) : 1218-1222.

CATUSSE C, POLETTE M, CORAUX C, BURLET H, BIREMBAUT P.

Modified basement membrane composition during bronchopulmonary tumor progression.

J Histochem Cytochem 2000 ; 48 (5) : 663-669.

CHANG JH, JAVIER JA, CHANG GY, OLIVEIRA HB, AZAR DT.

Functional characterization of neostatins, the MMP-derived, enzymatic cleavage products of type XVIII collagen.

FEBS Lett 2005 ; 579 (17) : 3601-3606.

CHANTRAIN C, DECLERCK Y.

Les métalloprotéinases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale.

Med Sciences 2002 ; 18 : 565-575.

CHAVAKIS E, DIMMELER S.

Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002 ; 22 (6) : 887-893.

CHELBERG MK, TSILIBARY EC, HAUSER AR, MCCARTHY JB.

Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration: involvement of multiple, distinct domains of the collagen molecule.

Cancer Res 1989 ; 49 (17) : 4796-4802.

CHELBERG MK, MCCARTHY JB, SKUBITZ AP, FURCHT LT, TSILIBARY EC.

Characterization of a synthetic peptide from type IV collagen that promotes melanoma cell adhesion, spreading, and motility.

J Cell Biol 1990 ; 111 (1) : 261-270.

CHERIE-CHALLINE L, HALNA JM, REMONTET L.

Situation épidémiologique du mélanome cutané en France et impact en termes de prévention

Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2004 ; 2.

CHOI KS, FOGG DK, YOON CS, WAISMAN DM.

p11 regulates extracellular plasmin production and invasiveness of HT1080 fibrosarcoma cells.

FASEB J 2003 ; 17 (2) : 235-246.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem 1987 ; 162 (1) : 156-159.

CLAMP AR, JAYSON GC.

The clinical potential of antiangiogenic fragments of extracellular matrix proteins.

Br J Cancer 2005 ; 93 (9) : 967-972.

CLARK WH JR, FROM L, BERNARDINO EA, MIHM MC.

The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.

Cancer Res 1969 ; 29 (3) : 705-727.

COHEN IR, MURDOCH AD, NASO MF, MARCHETTI D, BERD D, IOZZO RV.

Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas.

Cancer Res 1994 ; 54 (22) : 5771-5774.

COLLEN A, HANEMAAIJER R, LUPU F, QUAX PH, VAN LENT N, GRIMBERGEN J, *et al.*

Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix.

Blood 2003 ; 101 (5) : 1810-1817.

COLOGNATO H, YURCHENCO PD.

Form and function: the laminin family of heterotrimers.

Dev Dyn 2000 ; 218 (2) : 213-234.

COLORADO PC, TORRE A, KAMPHAUS G, MAESHIMA Y, HOPFER H, TAKAHASHI K, *et al.*

Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen.

Cancer Res 2000 ; 60 (9) : 2520-2526.

CORCORAN ML, HEWITT RE, KLEINER DE JR, STETLER-STEVENSON WG.

MMP-2: expression, activation and inhibition.

Enzyme Protein 1996 ; 49 (1-3) : 7-19.

CRUZ-MUNOZ W, KIM I, KHOKHA R.

TIMP-3 deficiency in the host, but not in the tumor, enhances tumor growth and angiogenesis.

Oncogene 2006 ; 25 (4) : 650-655.

CUNIASSE P, DEVEL L, MAKARITIS A, BEAU F, GEORGIADIS D, MATZIARI M, *et al.*

Future challenges facing the development of specific active-site-directed synthetic inhibitors of MMPs.

Biochimie 2005 ; 87 (3-4) : 393-402.

DAVIS GE, BAYLESS KJ, DAVIS MJ, MEININGER GA.

Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules.

Am J Pathol 2000 ; 156 (5) : 1489-1498.

DECLERCK YA.

Purification and characterization of a collagenase inhibitor produced by bovine vascular smooth muscle cells.

Arch Biochem Biophys 1988 ; 265 (1) : 28-37.

DECLERCK YA, PEREZ N, SHIMADA H, BOONE TC, LANGLEY KE, TAYLOR SM.

Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases.

Cancer Res 1992 ; 52 : 701-708.

DERYUGINA EI, RATNIKOV B, MONOSOV E, POSTNOVA TI, DISCIPIO R, SMITH JW, *et al.*

MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells.

Exp Cell Res 2001 ; 263 (2) : 209-223.

DE VRIES TJ, MOOY CM, VAN BALKEN MR, LUYTEN GP, QUAX PH, VERSPAGET HW, *et al.*

Components of the plasminogen activation system in uveal melanoma--a clinico-pathological study.

J Pathol 1995 ; 175 (1) : 59-67.

DE VRIES TJ, VAN MUIJEN GN, RUITER DJ.

The plasminogen activation system in melanoma cell lines and in melanocytic lesions.

Melanoma Res 1996 ; 6 (2) : 79-88.

DEVY L, BLACHER S, GRIGNET-DEBRUS C, BAJOU K, MASSON V, *et al.*

The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent.

FASEB J 2002 ; 16 (2) : 147-154.

DEVY J, DUCA L, CANTARELLI B, JOSEPH-PIETRAS D, PARENT L, THEVENARD J, *et al.*

Elastin-derived peptides enhanced melanoma progression *in vivo* by up-regulating the activation of Mcol-A (MMP-1) collagenase.

En préparation.

DHANABAL M, RAMCHANDRAN R, WATERMAN MJ, LU H, KNEBELMANN B, SEGAL M, *et al.*

Endostatin induces endothelial cell apoptosis.

J Biol Chem 1999a ; 274 (17) : 11721-11726.

DHANABAL M, RAMCHANDRAN R, VOLK R, STILLMAN IE, LOMBARDO M, IRUELA-ARISPE ML, *et al.*

Endostatin : yeast production, mutants, and antitumor effects in renal cell carcinoma.

Cancer Res 1999b ; 59 (1) : 189-197.

EGEBLAD M, WERB Z.

New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.

Nat Rev Cancer 2002 ; 2 : 161-174.

EITZMAN DT, KRAUSS JC, SHEN T, CUI J, GINSBURG.

Lack of plasminogen activator inhibitor-1 effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma.

Blood 1996 ; 87 (11) : 4718-4722.

EKLUND L, PIUHOLA J, KOMULAINEN J, SORMUNEN R, ONGVARRASOPONE C, FASSLER R, *et al.*

Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A 2001 ; 98 (3) : 1194-1199.

ELAMAA H, SORMUNEN R, REHN M, SOININEN R, PIHLAJANIEMI T.

Endostatin overexpression specifically in the lens and skin leads to cataract and ultrastructural alterations in basement membranes.

Am J Pathol 2005 ; 166 (1) : 221-229.

ENGBRING JA, HOFFMAN MP, KARMAND AJ, KLEINMAN HK.

The B16F10 cell receptor for a metastasis-promoting site on laminin-1 is a heparan sulfate/chondroitin sulfate-containing proteoglycan.

Cancer Res 2002 ; 62 (12) : 3549-3554.

- FAWZI A, ROBINET A, MONBOISSE JC, ZIAIE Z, KEFALIDES NA, BELLON G.
A peptide of the alpha 3(IV) chain of type IV collagen modulates stimulated neutrophil function via activation of cAMP-dependent protein kinase and Ser/Thr protein phosphatase.
Cell Signal 2000 ; 12 (5) : 327-335.
- FERRERAS M, FELBOR U, LENHARD T, OLSEN BR, DELAISSE J.
Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases.
FEBS Lett 2000 ; 486 (3) : 247-251.
- FLOQUET N, PASCO S, RAMONT L, DERREUMAUX P, LARONZE JY, NUZILLARD JM, *et al.*
The antitumor properties of the alpha3(IV)-(185-203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent.
J Biol Chem 2004 ; 279 (3) : 2091-2100.
- FLOQUET Nicolas
Etudes structurales de peptides d'élastine et de collagène ; structure, assemblage, propriétés mécaniques et biologiques de la matrice extracellulaire.
Thèse 3 cycle : Analyse des génomes et modélisation moléculaire : Paris 7 : 2004 ; 7072.
- FOLKMAN J.
Tumor angiogenesis: therapeutic implications.
N Engl J Med 1971 ; 285 (21) : 1182-1186.
- FOLKMAN J.
Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action.
Exp Cell Res 2006 ; 312 (5) : 594-607.
- GÁLVEZ BG, MATÍAS-ROMÁN S, ALBAR JP, SÁNCHEZ-MADRID F, ARROYO AG.
Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling.
J Biol Chem 2001 ; 276 (40) : 37491-37500.

GARANGER E, BOTURYN D, COLL JL, FAVROT MC, DUMY P.

Multivalent RGD synthetic peptides as potent α V β 3 integrin ligands.

Org Biomol Chem 2006 ; 4 (10) : 1958-1965.

GELSE K, POSCHL E, AIGNER T.

Collagens--structure, function, and biosynthesis.

Adv Drug Deliv Rev 2003 ; 55 (12) : 1531-1546.

GENIS L, GALVEZ BG, GONZALO P, ARROYO AG.

MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis?

Cancer Metastasis Rev 2006 ; 25 (1) : 77-86.

GERSHTEIN ES, MEDVEDEVA SV, BABKINA IV, KUSHLINSKII NE,
TRAPEZNIKOV NN.

Tissue- and urokinase-type plasminogen activators and type 1 plasminogen activator inhibitor in melanomas and benign skin pigment neoplasms.

Bull Exp Biol Med 2001 ; 132 (1) : 670-674.

GHOHESTANI RF, LI K, ROUSSELLE P, UITTO J.

Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone.

Clin Dermatol 2001 ; 19 (5) : 551-562.

GIANNELLI G, FALK-MARZILLIER J, SCHIRALDI O, STETLER-STEVENSON WG,
QUARANTA V.

Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5.

Science 1997 ; 277 (5323) : 225-228.

GILCHREST BA, ELLER MS, GELLER AC, YAAR M.

The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation.

N Engl J Med 1999 ; 340 (17) : 1341-1348.

GRANT DS, KINSELLA JL, FRIDMAN R, AUERBACH R, PIASECKI BA, YAMADA Y, *et al.*
Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) *in vitro* and induction of angiogenic behavior *in vivo*.
J Cell Physiol 1992 ; 153 (3) : 614-625.

HAGG PM, HAGG PO, PELTONEN S, AUTIO-HARMAINEN H, PIHLAJANIEMI T.
Location of type XV collagen in human tissues and its accumulation in the interstitial matrix of the fibrotic kidney.
Am J Pathol 1997 ; 150 (6) : 2075-2086.

HAIER J, GOLDMANN U, HOTZ B, RUNKEL N, KEILHOLZ U.
Inhibition of tumor progression and neoangiogenesis using cyclic RGD-peptides in a chemically induced colon carcinoma in rats.
Clin Exp Metastasis 2002 ; 19 (8) :665-672.

HAJITOU A, GRIGNET C, DEVY L, BERNDT S, BLACHER S, DEROANNE CF, *et al.*
The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells.
FASEB J 2002 ; 16 (13) : 1802-1804.

HALFTER W, DONG S, SCHURER B, COLE GJ.
Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan.
J Biol Chem 1998 ; 273 (39) : 25404-25412.

HAMANO Y, ZEISBERG M, SUGIMOTO H, LIVELY JC, MAESHIMA Y, YANG C, *et al.*
Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin.
Cancer Cell 2003 ; 3 (6) : 589-601.

HAMANO Y, KALLURI R.
Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth.
Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 333 (2) : 292-298.

HAN J, OHNO N, PASCO S, MONBOISSE JC, BOREL JP, KEFALIDES NA.

A cell binding domain from the alpha3 chain of type IV collagen inhibits proliferation of melanoma cells.

J Biol Chem 1997 ; 272 (33) : 20395-20401.

HAUTE AUTORITE DE SANTE.

Service évaluation médico-économique et santé publique 2006.

Stratégies de diagnostic précoce du mélanome. Recommandation en santé publique.

Rapport d'évaluation. [Consulté le 08/10/2007] Disponible à partir de : URL :

http://www.has-sante.fr/portail/display.jsp?id=c_452354

HE GA, LUO JX, ZHANG TY, WANG FY, LI RF.

Canstatin-N fragment inhibits *in vitro* endothelial cell proliferation and suppresses *in vivo* tumor growth.

Biochem Biophys Res Commun 2003 ; 312 (3) : 801-815.

HE GA, LUO JX, ZHANG TY, HU ZS, WANG FY.

The C-terminal domain of canstatin suppresses *in vivo* tumor growth associated with proliferation of endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun 2004 ; 318 (2) : 354-3560.

HEARING VJ, LAW LW, CORTI A, APPELLA E, BLASI F.

Modulation of metastatic potential by cell surface urokinase of murine melanoma cells.

Cancer Res 1988 ; 48 (5) : 1270-1278.

HELJASVAARA R, NYBERG P, LUOSTARINEN J, PARIKKA M, HEIKKILA P, REHN M, *et al.*

Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases.

Exp Cell Res ; 307 (2) : 292-304.

HEUSSEN C, DOWDLE EB.

Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates.

Anal Biochem 1980 ; 102 (1) :196-202.

HIEKEN TJ, RONAN SG, FAROLAN M, SHILKAITIS AL, DAS GUPTA TK.

Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma.

Cancer 1999 ; 85 (2) : 375-382.

HOFMANN UB, WESTPHAL JR, WAAS ET, ZENDMAN AJ, CORNELISSEN IM, RUITER DJ,
et al.

Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression.

Br J Cancer 1999 ; 81 (5) : 774-782.

HOFMANN UB, WESTPHAL JR, VAN MUIJEN GN, RUITER DJ.

Matrix metalloproteinases in human melanoma.

J Invest Dermatol 2000a ; 115 (3) : 337-344.

HOFMANN UB, WESTPHAL JR, VAN KRAATS AA, RUITER DJ, VAN MUIJEN GN.

Expression of integrin alpha (v) beta (3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells *in vitro* and *in vivo*.

Int J Cancer 2000b ; 87 (1) : 12-19.

HOFMANN UB, WESTPHAL JR, ZENDMAN AJ, BECKER JC, RUITER DJ, VAN MUIJEN GN.

Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression.

J Pathol 2000c ; 191 (3) : 245-256.

HOFMANN UB, EGGERT AA, BLASS K, BRÖCKER EB, BECKER JC.

Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation.

Cancer Res 2003 ; 63 (23) : 8221-8225.

HOFMANN UB, HOUBEN R, BROCKER EB, BECKER JC.

Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion.

Biochimie 2005 ; 87 (3-4) : 307-314.

HOLLMANN CA, KITTRELL FS, MEDINA D, BUTEL JS.

Wnt-1 and int-2 mammary oncogene effects on the beta-catenin pathway in immortalized mouse mammary epithelial cells are not sufficient for tumorigenesis.

Oncogene 2001 ; 20 (52) : 7645-7657.

HOOD JD, BEDNARSKI M, FRAUSTO R, GUCCIONE S, REISFELD RA, XIANG R, *et al.*

Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature.

Science 2002 ; 296 (5577) : 2404-2407.

HOPF M, GOHRING W, RIES A, TIMPL R, HOHENESTER E.

Crystal structure and mutational analysis of a perlecan-binding fragment of nidogen-1.

Nat Struct Biol 2001 ; 8 (7) : 634-640.

HUDSON BG, REEDERS ST, TRYGGVASON K.

Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis.

J Biol Chem 1993 ; 268 (35) : 26033-26036.

HYNES RO.

Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.

Cell 1992 ; 69 (1) : 11-25.

ITOH T, TANIOKA M, YOSHIDA H, YOSHIOKA T, NISHIMOTO H, ITOHARA S.

Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice.

Cancer Res 1998 ; 58 : 1048-1051.

ITOH T, TANIOKA M, MATSUDA H, NISHIMOTO H, YOSHIOKA T, SUZUKI R, *et al.*

Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice.

Clin Exp Metastasis 1999 ; 17 (2) : 177-181.

JAVELAUD D, BESANCON F.

P21^{WAF-1/CIP1} : un JAVELAUD D, BESANCON inhibiteur de l'apoptose.

Med Sci 2000 ; 16 : 265-266.

JIANG Y, GOLDBERG ID, SHI YE.

Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer.

Oncogene 2002 ; 21 (14) : 2245-2252.

JIN X, BOOKSTEIN R, WILLS K, AVANZINI J, TSAI V, LAFACE D, *et al.*

Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy *in vitro* and *in vivo*.

Cancer Gene Ther 2001 ; 8 (12) : 982-989.

JIN ZH, JOSSERAND V, RAZKIN J, GARANGER E, BOTURYN D, FAVROT MC, *et al.*

Noninvasive optical imaging of ovarian metastases using Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK-)4.

Mol Imaging 2006 ; 5 (3) : 188-197.

JIN ZH, JOSSERAND V, FOILLARD S, BOTURYN D, DUMY P, FAVROT MC, *et al.*

In vivo optical imaging of integrin alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors.

Mol Cancer 2007 ; 6 : 41.

JOHANSSON S.

Non-collagenous matrix proteins.

In : Extracellular matrix : Molecular components and interactions.

Ed Comper WD.

Amsterdam : Hardwood Academic Publishers ; 1996 : 60-94.

JOHN H, PREISSNER KT, FORSSMANN WG, STANDKER L.

Novel glycosylated forms of human plasma endostatin and circulating endostatin-related fragments of collagen XV.

Biochemistry 1999 ; 38 (32) : 10217-10224.

JOKI T, MACHLUF M, ATALA A, ZHU J, SEYFRIED NT, DUNN IF, *et al.*

Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy.

Nat Biotechnol 2001 ; 19 (1) : 35-39.

KALLURI R, COSGROVE D.

Assembly of type IV collagen. Insights from alpha3(IV) collagen-deficient mice.

J Biol Chem 2000 ; 275 (17) : 12719-12724.

KALLURI R.

Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis.

Nat Rev Cancer 2003 ; 3 (6) : 422-433.

KAMPHAUS GD, COLORADO PC, PANKA DJ, HOPFER H, RAMCHANDRAN R, TORRE A, *et al.*

Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth.

J Biol Chem 2000 ; 275 (2) : 1209-1215.

KARAGIANNIS ED, POPEL AS.

Identification of novel short peptides derived from the alpha 4, alpha 5, and alpha 6 fibrils of type IV collagen with anti-angiogenic properties.

Biochem Biophys Res Commun 2007 ; 354 (2) : 434-439.

KAWAGUCHI T, YAMASHITA Y, KANAMORI M, ENDERSBY R, BANKIEWICZ KS, BAKER SJ, *et al.*

The PTEN/Akt pathway dictates the direct alphaVbeta3-dependent growth-inhibitory action of an active fragment of tumstatin in glioma cells *in vitro* and *in vivo*.

Cancer Res 2006 ; 66 (23) : 11331-11340.

KEFALIDES N, BOREL J.

Basement membranes : cell and molecular biology.

In : Current topics in membranes.

Amsterdam, London : Elsevier Academic Press ; 2005 (56).

KELLEY PB, SADO Y, DUNCAN MK.

Collagen IV in the developing lens capsule.

Matrix Biol 2002 ; 21 (5) : 415-423.

KHATIB AM, NIP J, FALLAVOLLITA L, LEHMANN M, JENSEN G, BRODT P.

Regulation of urokinase plasminogen activator/plasmin-mediated invasion of melanoma cells by the integrin vitronectin receptor alphaVbeta3.

Int J Cancer 2001 ; 91 (3) : 300-308.

KIBBEY MC, GRANT DS, KLEINMAN HK.

Role of the SIKVAV site of laminin in promotion of angiogenesis and tumor growth: an *in vivo* Matrigel model.

J Natl Cancer Inst 1992 ; 84 (21) : 1633-1638.

KIM YM, JANG JW, LEE OH, YEON J, CHOI EY, KIM KW, *et al.*

Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase.

Cancer Res 2000 ; 60 (19) : 5410-5413.

KIM J, HONG SY, PARK HS, KIM DS, LEE W.

Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins.

Mol Cells 2005 ; 19 (2) : 205-211.

KLEINMAN HK, GRAF J, IWAMOTO Y, SASAKI M, SCHASTEEN CS, YAMADA Y, *et al.*

Identification of a second active site in laminin for promotion of cell adhesion and migration and inhibition of *in vivo* melanoma lung colonization.

Arch Biochem Biophys 1989 ; 272 (1) : 39-45.

KOIKE T, VERNON RB, HAMNER MA, SADOON E, REED MJ.

MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels.

J Cell Biochem 2002 ; 86 (4) : 748-758.

KOSHIKAWA N, SCHENK S, MOECKEL G, SHARABI A, MIYAZAKI K, GARDNER H, *et al.*

Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial cell morphology.

FASEB J 2004 ; 18 (2) : 364-366.

KUENG W, SILBER E, EPPENBERGER U.

Quantification of cells cultured on 96 wells plates.

Anal Biochem 1989 ; 182 : 16-19.

KUO CJ, LAMONTAGNE KR JR, GARCIA-CARDEÑA G, ACKLEY BD, KALMAN D, PARK S, *et al.*

Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain.

J Cell Biol 2001 ; 152 (6) : 1233-1246.

KURATOMI Y, NOMIZU M, NIELSEN PK, TANAKA K, SONG SY, KLEINMAN HK, *et al.*

Identification of metastasis-promoting sequences in the mouse laminin alpha 1 chain.

Exp Cell Res 1999 ; 249 (2) : 386-395.

KURATOMI Y, NOMIZU M, TANAKA K, PONCE ML, KOMIYAMA S, KLEINMAN HK, *et al.*

Laminin gamma 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16-F10 mouse melanoma cells.

Br J Cancer 2002 ; 86 (7) : 1169-1173.

KURCHAT P, ZIGRINO P, NISCHT R, BREITKOPF K, STEURER P, KLEIN CE, *et al.*

Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines.

J Biol Chem 1999 ; 274 (30) : 21056-21062.

LAFLEUR MA, HANDSLEY MM, KNAUPER V, MURPHY G, EDWARDS DR.

Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs).

J Cell Sci 2002 ; 115 : 3427-3438.

LAKKA SS, RAJAGOPAL R, RAJAN MK, MOHAN PM, ADACHI Y, DINH DH, *et al.*

Adenovirus-mediated antisense urokinase-type plasminogen activator receptor gene transfer reduces tumor cell invasion and metastasis in non-small cell lung cancer cell lines.

Clin Cancer Res 2001 ; 7 (4) : 1087-1093.

LANGLOIS S, NYALENDO C, DI TOMASSO G, LABRECQUE L, ROGHI C, MURPHY G, *et al.*

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation.

Mol Cancer Res 2007; 5 (6) : 569-583.

LEE SJ, JANG JW, KIM YM, LEE HI, JEON JY, KWON YG, LEE ST.

Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2.

FEBS Lett 2002 ; 519 (1-3) : 147-152.

LI H, LU H, GRISCELLI F, OPOLON P, SUN LQ, RAGOT T, *et al.*

Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice.

Gene Ther 1998 ; 5 (8) : 1105-1113.

LINDBLOM A, PAULSSON M.

Basement membranes.

In : Extracellular matrix : Tissue functions.

Ed Comper WD.

Amsterdam : Hardwood Academic Publishers ; 1996 : 132-174

MAESHIMA Y, COLORADO PC, TORRE A, HOLTHAUS KA, GRUNKEMEYER JA, ERICKSEN MB, *et al.*

Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane.

J Biol Chem 2000a ; 275 (28) : 21340-21348.

MAESHIMA Y, COLORADO PC, KALLURI R.

Two RGD-independent alpha ν beta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties.

J Biol Chem 2000b ; 275 (31) : 23745-23750.

MAESHIMA Y, MANFREDI M, REIMER C, HOLTHAUS KA, HOPFER H, CHANDAMURI BR, *et al.*

Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin.

J Biol Chem 2001a ; 276 (18) : 15240-15248.

MAESHIMA Y, YERRAMALLA UL, DHANABAL M, HOLTHAUS KA, BARBASHOV S, KHARBANDA S, *et al.*

Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha ν beta(3) integrin and inhibits angiogenesis.

J Biol Chem 2001b ; 276 (34) : 31959-21968.

MAESHIMA Y, SUDHAKAR A, LIVELY JC, UEKI K, KHARBANDA S, KAHN CR, *et al.*

Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis.

Science 2002 ; 295 (5552) : 140-143.

MAGNON C, GALAUP A, MULLAN B, ROUFFIAC V, BOUQUET C, BIDART JM, *et al.*

Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with alpha ν beta3 and alpha ν beta5 integrins.

Cancer Res 2005 ; 65 (10) : 4353-4361.

MAQUART FX, SIMEON A, PASCO S, MONBOISSE JC.

Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines.

J Soc Biol 1999 ; 193 (4-5) : 423-428.

MAQUART FX, PASCO S, RAMONT L, HORNEBECK W, MONBOISSE JC.

An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity.

Implication in tumor invasion.

Crit Rev Oncol Hematol 2004 ; 49 (3) : 199-202.

MAQUOI E, FRANKENNE F, NOEL A, KRELL HW, GRAMS F, FOIDART JM.

Type IV collagen induces matrix metalloproteinase 2 activation in HT1080 fibrosarcoma cells.

Exp Cell Res 2000 ; 261 (2) : 348-359.

MARNEROS AG, OLSEN BR

The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis.

Matrix Biol 2001 ; 20 (5-6) : 337-3345.

MARNEROS AG, KEENE DR, HANSEN U, FUKAI N, MOULTON K, GOLETZ PL, *et al.*

Collagen XVIII/endostatin is essential for vision and retinal pigment epithelial function.

EMBO J 2004 ; 23 (1) : 89-99.

MARNEROS AG, OLSEN BR.

Physiological role of collagen XVIII and endostatin.

FASEB J 2005 ; 19 (7) : 716-728.

MARNEROS AG, OLSEN BR.

Physiological role of collagen XVIII and endostatin.

FASEB J 2005 ; 19 (7) : 716-728.

MARTINELLA-CATUSSE C, POLETTE M, NOEL A, GILLES C, DEHAN P, MUNAUT C, *et al.*

Down-Regulation of MT1-MMP expression by the alpha3 chain of type IV collagen inhibits bronchial tumor cell line invasion.

Lab Invest 2001 ; 81 (2) : 167-175.

MAZAR AP, HENKIN J, GOLDFARB RH.

The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis.

Angiogenesis 1999 ; 3 (1) : 15-32.

MENG J, MA N, YAN Z, HAN W, ZHANG Y.

NGR enhanced the anti-angiogenic activity of tum-5.

J Biochem (Tokyo) 2006 ; 140 (2) : 299-304.

MIN HY, DOYLE LV, VITT CR, ZANDONELLA CL, STRATTON-THOMAS JR, SHUMAN MA, *et al.*

Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice.

Cancer Res 1996 ; 56 (10) : 2428-2433.

MIOSGE N.

The ultrastructural composition of basement membranes *in vivo*.

Histol Histopathol 2001 ; 16 (4) : 1239-1248.

MIR LM.

Therapeutic perspectives of *in vivo* cell electropermeabilization.

Bioelectrochemistry 2001 ; 53 (1) : 1-10.

MIR LM, MOLLER PH, ANDRE F, GEHL J

Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues.

Adv Genet 2005 ; 54 : 83-114.

MIYOSHI T, HIROHATA S, OGAWA H, DOI M, OBIKA M, YONEZAWA T, *et al.*

Tumor-specific expression of the RGD-alpha3(IV)NC1 domain suppresses endothelial tube formation and tumor growth in mice.

FASEB J 2006 ; 20 (11) : 1904-1906.

MONBOISSE JC, GARNOTEL R, BELLON G, OHNO N, PERREAU C, BOREL JP, *et al.*

The alpha 3 chain of type IV collagen prevents activation of human polymorphonuclear leukocytes.

J Biol Chem 1994 ; 269 (41) : 25475-15482.

MONEA S, LEHTI K, KESKI-OJA J, MIGNATTI P.

Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism.

J Cell Physiol 2002 ; 192 (2) : 160-170.

MONGIAT M, SWEENEY SM, SAN ANTONIO JD, FU J, IOZZO RV.

Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan.

J Biol Chem 2003 ; 278 (6) : 4238-4249.

MONSKY WL, KELLY T, LIN CY, YEH Y, STETLER-STEVENSON WG, MUELLER SC, et al.

Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia.

Cancer Res 1993 ; 53 (13) : 3159-3164.

MUELLER BM, YU YB, LAUG WE.

Overexpression of plasminogen activator inhibitor 2 in human melanoma cells inhibits spontaneous metastasis in scid/scid mice.

Proc Natl Acad Sci U S A 1995 ; 92 (1) : 205-209.

MUSSO O, REHN M, SAARELA J, THERET N, LIETARD J, HINTIKKA, *et al.*

Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver.

Hepatology 1998 ; 28 (1) : 98-107.

MYERS JC, KIVIRIKKO S, GORDON MK, DION AS, PIHLAJANIEMI T.

Identification of a Previously Unknown Human Collagen Chain, $\alpha 1(XV)$, Characterized by Extensive Interruptions in the Triple-Helical Region.

Proc Natl Acad Sci U S A 1992 ; 89 (21) : 10144-10148.

MYERS JC, SUN MJ, D'IPPOLITO JA, JABS EW, NEILSON EG, DION AS.

Human cDNA clones transcribed from an unusually high-molecular-weight RNA encode a new collagen chain.

Gene 1993 ; 123 (2) : 211-217.

MYERS JC, YANG H, D'IPPOLITO JA, PRESENTE A, MILLER MK, DION AS.

The triple-helical region of human type XIX collagen consists of multiple collagenous subdomains and exhibits limited sequence homology to alpha 1(XVI).

J Biol Chem 1994 ; 269 (28) : 18549-18557.

MYERS JC, LI D, BAGERIS A, ABRAHAM V, DION AS, AMENTA PS.

Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens.

Am J Pathol 1997 ; 151 (6) : 1729-1740.

MYERS JC, LI D, RUBINSTEIN NA, CLARK CC.

Up-regulation of type XIX collagen in rhabdomyosarcoma cells accompanies myogenic differentiation.

Exp Cell Res 1999 ; 253 (2) : 587-598.

MYERS JC, LI D, AMENTA PS, CLARK CC, NAGASWAMI C, WEISEL JW.

Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini.

J Biol Chem 2003 ; 278 (34) : 32047-33057.

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI.

Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms.

Trends Genet 2004 ; 20 (1) : 33-43.

NAGASE H, WOESSNER JF.

Matrix Metalloproteinases.

J Biol Chem 1999 ; 274 : 21491-21494.

NAYAK BR, SPIRO RG.

Localization and structure of the asparagine-linked oligosaccharides of type IV collagen from glomerular basement membrane and lens capsule.

J Biol Chem 1991 ; 266 (21) : 13978-13987.

NEUMANN E, SCHAEFER-RIDDER M, WANG Y, HOFSCHEIDER PH.

Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields.

EMBO J 1982 ; 1 (7) : 841-845.

NOMIZU M, YAMAMURA K, KLEINMAN HK, YAMADA Y.

Multimeric forms of Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) peptide enhance the inhibition of tumor growth and metastasis.

Cancer Res 1993 ; 53 (15) : 3459-3461.

NOONAN DM, FULLE A, VALENTE P, CAI S, HORIZAN E, SASAKI M, *et al.*

The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule.

J Biol Chem 1991 ; 266 (34) : 22939-22947.

NYBERG P, XIE L, KALLURI R.

Endogenous inhibitors of angiogenesis.

Cancer Res 2005 ; 65 (10) : 3967-3979.

NYKJAER A, CONESE M, CHRISTENSEN EI, OLSON D, CREMONA O, GLIEMANN J, *et al.*

Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA: serpin complexes.

EMBO J 1997 ; 16 (10) : 2610-2620.

O'REILLY MS, BOEHM T, SHING Y, FUKAI N, VASIOS G, LANE WS, *et al.*

Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.

Cell 1997 ; 88 (2) : 277-285.

O'REILLY MS, WIEDERSCHAIN D, STETLER-STEVENSON WG, FOLKMAN J, MOSES MA.

Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance.

J Biol Chem 1999 ; 274 (41) : 29568-29571.

ORTEGA N, WERB Z.

New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens.

J Cell Sci 2002 ; 115 : 4201-4214.

OSSOWSKI L, AGUIRRE-GHISO JA.

Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth.

Curr Opin Cell Biol 2000 ; 12 (5) : 613-620.

OVERALL CM, LOPEZ-OTIN C.

Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era.

Nat Rev Cancer 2002 ; 2 (9) : 657-672.

PANKA DJ, MIER JW.

Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells.

J Biol Chem 2003 ; 278 (39) : 37632-37636.

PASCO S, HAN J, GILLERY P, BELLON G, MAQUART FX, BOREL JP, *et al.*

A specific sequence of the noncollagenous domain of the alpha3(IV) chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells.

Cancer Res 2000a ; 60 (2) : 467-473.

PASCO S, MONBOISSE JC, KIEFFER N.

The alpha 3(IV)185-206 peptide from noncollagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the beta 3 subunit of integrin alphaVbeta 3 and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation.

J Biol Chem 2000b ; 275 (42) : 32999-33007.

PASCO S, RAMONT L, MAQUART FX, MONBOISSE JC.

Biological effects of collagen I and IV peptides.

J Soc Biol 2003 ; 197 (1) : 31-39.

PASCO S, RAMONT L, MAQUART FX, MONBOISSE JC.

Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules.

Crit Rev Oncol Hematol 2004a ; 49 (3) : 221-233.

PASCO S, RAMONT L, VENTEO L, PLUOT M, MAQUART FX, MONBOISSE JC.

In vivo overexpression of tumstatin domains by tumor cells inhibits their invasive properties in a mouse melanoma model.

Exp Cell Res 2004b ; 301 (2) : 251-265.

PASCO S, BRASSART B, RAMONT L, MAQUART FX, MONBOISSE JC.

Control of melanoma cell invasion by type IV collagen.

Cancer Detect Prev 2005 ; 29 (3) : 260-266.

PAULSSON M, YURCHENCO PD, RUBEN GC, ENGEL J, TIMPL R.

Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane.

J Mol Biol 1987 ; 197 (2) : 297-313.

PAULSSON M.

Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions.

Crit Rev Biochem Mol Biol 1992 ; 27 (1-2) : 93-127.

PEPPER MS, SAPPINO AP, STÖCKLIN R, MONTESANO R, ORCI L, VASSALLI JD.

Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells.

J Cell Biol 1993 ; 122 (3) : 673-684.

PETITCLERC E, BOUTAUD A, PRESTAYKO A, XU J, SADO Y, NINOMIYA Y, *et al.*

New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth *in vivo*.

J Biol Chem 2000 ; 275 (11) : 8051-8061.

PLOUG M, RONNE E, BEHRENDT N, JENSEN AL, BLASI F, DANO K.

Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol.

J Biol Chem 1991 ; 266 (3) : 1926-1933.

POLETTE M, THIBLET J, PLOTON D, BUISSON AC, MONBOISSE JC, TOURNIER JM, *et al.*

Distribution of $\alpha 1(IV)$ and $\alpha 3(IV)$ chains of type IV collagen in lung tumours.

J Pathol 1997 ; 2 (2) : 185-191.

QUAX PH, VAN MUIJEN GN, WEENING-VERHOEFF EJ, LUND LR, DANO K, RUITER DJ, *et al.*

Metastatic behavior of human melanoma cell lines in nude mice correlates with urokinase-type plasminogen activator, its type-1 inhibitor, and urokinase-mediated matrix degradation.

J Cell Biol 1991 ; 115 (1) : 191-199.

RAGNO P.

The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule.

Cell Mol Life Sci 2006 ; 63 (9) : 1028-1037.

RAMCHANDRAN R, DHANABAL M, VOLK R, WATERMAN MJ, SEGAL M, LU H, *et al.*

Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin.

Biochem Biophys Res Commun 1999 ; 255 (3) : 735-739.

RAY JM, STETLER-STEVENSON WG.

The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis.

Eur Respir J 1994 ; 7 (11) : 2062-2072.

REHN M, PIHLAJANIEMI T.

Alpha 1(XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen.

Proc Natl Acad Sci U S A 1994 ; 91 (10) : 4234-4238.

REHN M, VEIKKOLA T, KUKK-VALDRE E, NAKAMURA H, ILMONEN M, LOMBARDO C, *et al.*

Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A 2001 ; 98 (3) : 1024-1029.

REMACLE AG, ROZANOV DV, FUGERE M, DAY R, STRONGIN AY.

Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP.

Oncogene 2006 ; 25 (41) : 5648-5655.

REMONTET L, ESTEVE J, BOUVIER AM, GROSCLAUDE P, LAUNOY G, MENEGOZ F, *et al.*

Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000.

Rev Epidémiol Santé Publique 2003 ; 51 : 3-30.

RICARD-BLUM S, FERAUD O, LORTAT-JACOB H, RENCUROSÌ A, FUKAI N, DKHISSI F, *et al.*

Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations.

J Biol Chem 2004 ; 279 (4) : 2927-2936.

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F.

The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.

Pathol Biol 2005 ; 53 (7) : 430-442.

ROBINET A, FAHEM A, CAUCHARD JH, HUET E, VINCENT L, LORIMIER S, *et al.*

Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP.

J Cell Sci 2005 ; 118 : 343-356.

ROTH JM, AKALU A, ZELMANOVICH A, POLICARPIO D, NG B, MACDONALD S, *et al.*

Recombinant alpha2(IV)NC1 domain inhibits tumor cell-extracellular matrix interactions, induces cellular senescence, and inhibits tumor growth *in vivo*.

Am J Pathol 2005 ; 166 (3) : 901-911.

ROUSSELLE P.

Laminin-5, cell migration and cancer.

Med Sci 2002 ; 18 : 989-994.

SASAKI T, LARSSON H, TISI D, CLAEISSON-WELSH L, HOHENESTER E, TIMPL R.

Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity.

J Mol Biol 2000 ; 301 (5) : 1179-1190.

SATO H, TAKINO T, MIYAMORI H.

Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis.

Cancer Sci 2005 ; 96 (4) : 212-217.

SAUS J, WIESLANDER J, LANGEVELD JP, QUINONES S, HUDSON BG.

Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV.

J Biol Chem 1988 ; 263 (26) : 13374-13380.

SCHVARTZ I, SEGER D, SHALTIEL S.

Vitronectin.

Int J Biochem Cell Biol 1999 ; 31 (5) : 539-544.

SEIKI M, YANA I.

Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis.

Cancer Sci 2003 ; 94 (7) : 569-574.

SHAHAN TA, ZIAIE Z, PASCO S, FAWZI A, BELLON G, MONBOISSE JC, *et al.*

Identification of CD47/integrin-associated protein and alpha(v)beta3 as two receptors for the alpha3(IV) chain of type IV collagen on tumor cells.

Cancer Res 1999a ; 59 (18) : 4584-4590.

SHAHAN TA, OHNO N, PASCO S, BOREL JP, MONBOISSE JC, KEFALIDES NA.

Inhibition of tumor cell proliferation by type IV collagen requires increased levels of cAMP.

Connect Tissue Res 1999b ; 40 (3) : 221-232.

SHAHAN T, GRANT D, TOOTELL M, ZIAIE Z, OHNO N, MOUSA S, *et al.*

Oncothanin, a peptide from the alpha3 chain of type IV collagen, modifies endothelial cell function and inhibits angiogenesis.

Connect Tissue Res 2004 ; 45 (3) : 151-163.

SHARMA B, HANDLER M, EICHSTETTER I, WHITELOCK JM, NUGENT MA, IOZZO RV.

Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis *in vivo*.

J Clin Invest 1998 ; 102 (8) : 1599-1608.

SMITH MA, YAO YM, REIST NE, MAGILL C, WALLACE BG, MCMAHAN UJ.

Identification of agrin in electric organ extracts and localization of agrin-like molecules in muscle and central nervous system.

J Exp Biol 1987 ; 132 : 223-230.

SOMERVILLE RP, OBLANDER SA, APTE SS.

Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.

Genome Biol 2003 ; 4 (6) : 216.

SOUNNI NE, DEVY L, HAJITOU A, FRANKENNE F, MUNAUT C, GILLES C, *et al.*

MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression.

FASEB J 2002 ; 16 (6) : 555-564.

SOUNNI NE, JANSSEN M, FOIDART JM, NOEL A.

Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis.

Matrix Bio 2003 ; 22 (1) : 55-61.

SOUNNI NE, ROGHI C, CHABOTTAUX V, JANSSEN M, MUNAUT C, MAQUOI E, *et al.*

Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases.

J Biol Chem 2004 ; 279 (14) : 13564-13574.

SOUNNI NE, NOEL A.

Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression.

Biochimie 2005 ; 87 (3-4) : 329-342.

STACK MS, GATELY S, BAFETTI LM, ENGHILD JJ, SOFF GA.

Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation.

Biochem J 1999 ; 340 : 77-84.

STANDKER L, SCHRADER M, KANSE SM, JURGENS M, FORSSMANN WG, PREISSNER KT.

Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin.

FEBS Lett 1997 ; 420 (2-3) : 129-133.

STETLER-STEVENSON WG, LIOTTA LA, KLEINER DE JR.

Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.

FASEB J 1993 ; 7 : 1434-1441.

SUDHAKAR A, SUGIMOTO H, YANG C, LIVELY J, ZEISBERG M, KALLURI R.

Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins.

Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ; 100 (8) : 4766-4771.

SUDHAKAR A, SUGIMOTO H, YANG C, LIVELY J, ZEISBERG M, KALLURI R.

Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins.

Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ; 100 (8) : 4766-4771.

SUDHAKAR A, NYBERG P, KESHAMOUNI VG, MANNAM AP, LI J, SUGIMOTO H, *et al.*

Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1beta1 integrin.

J Clin Invest 2005 ; 115 (10) : 2801-2810.

SUMIYOSHI H, INOBUCHI K, KHALEDUZZAMAN M, NINOMIYA Y, YOSHIOKA H.
Ubiquitous expression of the alpha1(XIX) collagen gene (Col19a1) during mouse embryogenesis becomes restricted to a few tissues in the adult organism.
J Biol Chem 1997 ; 272 (27) : 17104-17111.

SUMIYOSHI H, LAUB F, YOSHIOKA H, RAMIREZ F.
Embryonic expression of type XIX collagen is transient and confined to muscle cells.
Dev Dyn 2001 ; 220 (2) : 155-162.

SUMIYOSHI H, MOR N, LEE SY, DOTY S, HENDERSON S, TANAKA S, *et al.*
Esophageal muscle physiology and morphogenesis require assembly of a collagen XIX-rich basement membrane zone.
J Cell Biol 2004 ; 166 (4) : 591-600.

SUND M, HAMANO Y, SUGIMOTO H, SUDHAKAR A, SOUBASAKOS M, YERRAMALLA U, *et al.*
Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors.
Proc Natl Acad Sci U S A 2005 ; 102 (8) : 2934-2939.

SWEENEY TM, KIBBEY MC, ZAIN M, FRIDMAN R, KLEINMAN HK.
Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases.
Cancer Metastasis Rev 1991 ; 10 (3) : 245-254.

SWERDLOW AJ, ENGLISH JS, QIAO Z.
The risk of melanoma in patients with congenital nevi: a cohort study.
J Am Acad Dermatol 1995 ; 32 (4) : 595-599.

TABRUYN SP, GRIFFIOEN AW.
Molecular pathways of angiogenesis inhibition.
Biochem Biophys Res Commun 2007 ; 355 (1) :1-5.

TANDLE A, BLAZER DG 3RD, LIBUTTI SK.

Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments.

J Transl Med 2004 ; 2 (1) : 22.

TANG H, KERINS DM, HAO Q, INAGAMI T, VAUGHAN DE.

The urokinase-type plasminogen activator receptor mediates tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and activation of mitogen-activated protein kinase in cultured endothelial cells.

J Biol Chem 1998 ; 273 (29) : 18268-18272.

THOMAS L.

Tumeurs cutanées, épithéliales et mélaniques.

La revue du praticien 1998 ; 16 : 437-445.

TIMAR J, LAPIS K, DUDAS J, SEBESTYEN A, KOPPER L, KOVALSZKY I.

Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer.

Semin Cancer Biol 2002 ; 12 (3) : 173-186.

TIMPL R, WIEDEMANN H, VAN DELDEN V, FURTHMAYR H, KUHN K.

A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes.

Eur J Biochem 1981 ; 120 (2) : 203-211.

TIMPL R.

Structure and biological activity of basement membrane proteins.

Eur J Biochem 1989 ; 180 (3) : 487-502.

TOMONO Y, NAITO I, ANDO K, YONEZAWA T, SADO Y, HIRAKAWA S, *et al.*

Epitope-defined monoclonal antibodies against multiplexin collagens demonstrate that type XV and XVIII collagens are expressed in specialized basement membranes.

Cell Struct Funct 2002 ; 27 (1) : 9-20.

TRAN KT, LAMB P, DENG JS.

Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair.

J Dermatol Sci 2005 ; 40 (1) : 11-20.

TRIKHA M, TIMAR J, LUNDY SK, SZEKERES K, CAI Y, PORTER AT, *et al.*

The high affinity alphaIIb beta3 integrin is involved in invasion of human melanoma cells.
Cancer Res 1997 ; 57 (12) : 2522-2528.

TSUJI T, KAWADA Y, KAI-MUROZONO M, KOMATSU S, HAN SA, TAKEUCHI K, *et al.*

Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3).

Clin Exp Metastasis 2002 ; 19 (2) : 127-134.

VANDENBERG P, KERN A, RIES A, LUCKENBILL-EDDS L, MANN K, KUHN K.

Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins.

J Cell Biol 1991 ; 113 (6) : 1475-1483.

VAN DEN OORD JJ, PAEMEN L, OPDENAKKER G, DE WOLF-PEETERS C.

Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin.

Am J Pathol 1997 ; 151, (3) : 665-670.

VAN WART HE, BIRKEDAL-HANSEN H.

The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.

Proc Natl Acad Sci USA 1990 ; 87 (14) : 5578-5582.

VASSALLI JD, SAPPINO AP, BELIN D.

The plasminogen activator/plasmin system.

J Clin Invest 1991 ; 88 (4) : 1067-1072.

VENESS MJ, QUINN DI, ONG CS, KEOGH AM, MACDONALD PS, COOPER SG, *et al.*

Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience.

Cancer 1999 ; 85 (8) : 1758-1764.

VISSE R, NAGASE H.

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.

Circ Res 2003 ; 92 (8) : 827-839.

WALD M, OLEJAR T, SEBKOVA V, ZADINOVA M, BOUBELIK M, POUCKOVA P.

Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16.

Cancer Chemother Pharmacol 2001 ; 47 : 16-22.

WANDEL E, GRASSHOFF A, MITTAG M, HAUSTEIN UF, SAALBACH A.

Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) *in vitro*.

Exp Dermatol 2000 ; 9 (1) : 34-41.

WEN W, MOSES MA, WIEDERSCHAIN D, ARBISER JL, FOLKMAN J.

The generation of endostatin is mediated by elastase.

Cancer Res 1999 ; 59 (24) : 6052-6056.

WEI Y, EBLE JA, WANG Z, KREIDBERG JA, CHAPMAN HA.

Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1.

Mol Biol Cell 2001 ; 12 (10) : 2975-2986.

WHITELOCK JM, MURDOCH AD, IOZZO RV, UNDERWOOD PA.

The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases.

J Biol Chem 1996 ; 271 (17) : 10079-10086.

WISDOM BJ JR, GUNWAR S, HUDSON MD, NOELKEN ME, HUDSON BG.

Type IV collagen of Engelbreth-Holm-Swarm tumor matrix: identification of constituent chains.

Connect Tissue Res 1992 ; 27 (4) : 225-234.

WOLLINA U, HIPLER UC, KNOLL B, GRAEFE T, KAATZ M, KIRSCH K.

Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma.

J Cancer Res Clin Oncol 2001 ; 127 (10) : 631-5.

XU R, XIN L, FAN Y, MENG HR, LI ZP, GAN RB.

Mouse restin inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes cell apoptosis.

Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 2002 ; 34 (2) : 138-142.

YAO B, HE QM, TIAN L, XIAO F, JIANG Y, ZHANG R, *et al.*

Enhanced antitumor effect of the combination of tumstatin gene therapy and gemcitabine in murine models.

Hum Gene Ther 2005 ; 16 (9) : 1075-1086.

YOKOYAMA Y, RAMAKRISHNAN S.

Addition of an aminopeptidase N-binding sequence to human endostatin improves inhibition of ovarian carcinoma growth.

Cancer 2005 ; 104 (2) : 321-331.

YURCHENCO PD, SCHITTY JC.

Molecular architecture of basement membranes.

FASEB J 1990 ; 4 (6) : 1577-15590.

ZHOU J, DING M, ZHAO Z, REEDERS ST.

Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV).

Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains.

J Biol Chem 1994 ; 269 (18) : 13193-13199.

ZORICK TS, MUSTACCHI Z, BANDO SY, ZATZ M, MOREIRA-FILHO CA, OLSEN B, *et al.*

High serum endostatin levels in Down syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumours.

Eur J Hum Genet 2001 ; 9 (11) : 811-814.

H-Annexes

The NC1 domain of type XIX collagen inhibits *in vivo* melanoma growth

Laurent Ramont,¹ Sylvie Brassart-Pasco,¹
 Jessica Thevenard,¹ Aurélie Deshorgue,¹
 Lydie Venteo,² Jean Yves Laronze,³ Michel Pluot,²
 Jean-Claude Monboisse,¹
 and François-Xavier Maquart¹

¹Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6198 ²Laboratoire d'Anatomie Pathologie, Faculté de Médecine; and ³Centre National de la Recherche Scientifique; Formation de Recherche en Evolution (FRE) 2715: Isolation, Structure, Transformation et Synthèse de Substance Naturelles, Institut Fédératif de Recherche 53 Biomolécules, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

Abstract

Type XIX collagen is a minor collagen that localizes to basement membrane zones, together with types IV, XV, and XVIII collagens. Because several NC1 COOH-terminal domains of other chains from basement membrane collagens were reported to exhibit antitumor activity, we decided to study the effects of the NC1(XIX) collagen domain on tumor progression using an experimental *in vivo* model of mouse melanoma. We observed a 70% reduction in tumor volume in NC1(XIX)-treated mice compared with the corresponding controls. Histologic examination of the tumors showed a strong decrease in tumor vascularization in treated mice. *In vitro*, NC1(XIX) inhibited the migrating capacity of tumor cells and their capacity to invade Matrigel. It also inhibited the capacity of human microvascular endothelial cells to form pseudotubes in Matrigel. This effect was accompanied by a strong inhibition of membrane type-1 matrix metalloproteinase (matrix metalloproteinase-14) and vascular endothelial growth factor expression. Collectively, our data indicate that the NC1 domain of type XIX collagen

exerts antitumor activity. This effect is mediated by a strong inhibition of the invasive capacities of tumor cells and antiangiogenic effects. NC1(XIX) should now be considered as a new member of the basement membrane collagen-derived matrikine family with antitumor and antiangiogenic activity. [Mol Cancer Ther 2007;6(2):506–14]

Introduction

Type XIX collagen is a minor collagen initially isolated from human rhabdomyosarcoma libraries (1, 2). It belongs to the fibril-associated collagens with interrupted triple helix collagen family (3). It is localized in the basement membrane zone of vascular, neuronal, mesenchymal, and epithelial tissues, associated with types IV, XV, and XVIII collagens (4, 5). The $\alpha 1$ (XIX) chain is constituted of a 268-residue NH₂-terminal domain, an 858-residue discontinuous collagenous domain, and a short 19-residue COOH-terminal noncollagenous NC1 domain. It seems to be involved in muscle differentiation, esophageal muscle physiology, and morphogenesis, but other functions cannot be excluded (6, 7).

COOH-terminal NC1 domains of other basement membrane collagen chains were reported to exhibit antitumor activity and antiangiogenic properties. For instance, endostatin, the NC1 domain of $\alpha 1$ (XVIII), restin, the NC1 domain of $\alpha 1$ (XV), tumstatin, the NC1 domain of $\alpha 3$ (IV), canstatin, the NC1 domain of $\alpha 2$ (IV), and arresten, the NC1 domain of $\alpha 1$ (IV) collagen chains were shown to control tumor development and/or angiogenesis in several experimental models (for review, see ref. 8).

Angiogenesis constitutes a crucial step for the development of solid tumors (9). The new vessels bring the nutrients necessary to tumor development. Tumor angiogenesis depends on an imbalance between proangiogenic and antiangiogenic factors (10, 11). In addition, peptides generated by partial proteolysis of extracellular matrix macromolecules, also called matrikines or matri-cryptines, may be implied in this control (12, 13).

Extracellular matrix remodeling is essential for tumor cell migration and angiogenesis in tumor progression. Matrix metalloproteinases (MMP) are the main enzymes implicated in this process (14). Membrane type-1 MMP (MT1-MMP or MMP-14), a membrane-anchored protease expressed by tumor and endothelial cells, plays a crucial role in cell migration (15). MT1-MMP not only degrades extracellular matrix but also controls the activation of other MMPs, particularly pro-MMP-2 (16, 17). MT1-MMP promotes tumor invasion and growth (18, 19). Moreover, this enzyme controls the migration of endothelial cells and promotes angiogenesis during tumor development (20, 21). Recently, MT1-MMP was shown to be involved in the control of neovascularization in physiologic conditions or in tumor

Received 4/14/06; revised 11/14/06; accepted 12/21/06.

Grant support: Université de Reims-Champagne-Ardenne, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de la Haute Marne), the Association pour la Recherche sur le Cancer, and the Cancéropole Grand Est.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Laurent Ramont, Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6198, Institut Fédératif de Recherche 53 Biomolécules, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, F-51095 Reims Cedex, France. Phone: 33-3-26-78-31-81; Fax: 33-3-26-78-85-39. E-mail: lramont@chu-reims.fr

Copyright © 2007 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0207

invasion, independently of pro-MMP-2 activation (22). Overexpression of MT1-MMP was associated with an increase in *in vivo* tumor growth and vascularization in a melanoma model (23).

In this article, we decided to study the effects of the NC1(XIX) domain on tumor progression and angiogenesis in a mouse melanoma model. We showed that NC1(XIX) domain decreased *in vivo* tumor growth through an inhibition of melanoma cell invasive properties and tumor angiogenesis.

Materials and Methods

Reagents

Culture medium and molecular biology products were from Life Technologies (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Bovine serum albumin (BSA) and Matrigel (ECM gel) were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Rat anti-mouse CD31 was from PharMingen (distributed by BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Goat anti-mouse MT1-MMP, goat anti-mouse vascular endothelial growth factor (VEGF), and goat anti-mouse actin (I-19) were from Santa Cruz Biotechnology (distributed by Tebu, Le Perray-en-Yvelines, France). Rabbit anti-human MT1-MMP was from Chemicon (distributed by Euromedex, Souffelweyersheim, France).

Cell Cultures

B16F1 cells, a lung metastatic subline of murine B16 melanoma, were a generous gift from Dr. M. Grégoire (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale Unité Mixte de Recherche Scientifique 419, Nantes, France). They were grown in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum in 25-cm² flasks (Nunclon, Dutscher, Brumath, France) at 37°C in a humid atmosphere (5% CO₂, 95% air).

Human microvascular endothelial cells-1 (HMEC-1) were obtained from E.W. Ades (Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA). They were cultured in endothelial cell growth medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 0.4% (w/v) endothelial cell growth supplement/heparin, 5% (v/v) FCS, 10 ng/mL epidermal growth factor, 1 µg/mL hydrocortisone, and 50 ng/mL amphotericin B.

Peptides

The NC1(XIX) peptide, NPEDCLYPVSHAHQRTGGN, and the corresponding scrambled peptide, AGNEQP-NYHSDPGTHLCRV, were obtained by solid-phase synthesis using an *N*-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl derivative procedure. They were further purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography with a C18 column eluted by a gradient of acetonitrile in trifluoroacetic acid and then lyophilized (24).

Animals

C57Bl6 mice (average body weight, 16–18 g) were purchased from Harlan France (Gannat, France). Animals were individually caged and given food and water *ad libitum*. They were kept in a room with constant temperature and humidity. All mice were acclimatized to

our laboratory conditions for 1 week before starting the experiments. The *in vivo* experiments were conducted according to the ethical guidelines of the Centre National de la Recherche Scientifique.

In vivo Tumor Growth Measurement

A suspension of B16F1 cells (2.5×10^5 in 0.1 mL RPMI 1640) was s.c. injected into the left side of syngeneic C57Bl6 mice. Four types of experiments were done. In the first set of experiments, B16F1 cells were preincubated for 15 min with either RPMI (control), NC1(XIX) peptide (30 µmol/L), or the corresponding scrambled peptide at the same concentration before the initial injection. Control medium, NC1(XIX) peptide (2.5 mg/kg mouse weight), or scrambled peptide (2.5 mg/kg mouse weight) was then reinjected around the tumor at days 7 and 14. In the second set of experiments, preincubation of cells with NC1(XIX) was done but peritumoral injections at days 7 and 14 were omitted. In the third set of experiments, preincubation of B16F1 cells with NC1(XIX) was omitted and only peritumoral injection at days 7 and 14 were done. Finally, in the fourth set of experiments, control medium, NC1 1(XIX) (10 mg/kg mouse weight), or scrambled peptide (10 mg/kg mouse weight) was injected i.p. at days 10 and 15 after appearance of the tumor. In all these experiments, the groups contained six or seven mice. Tumor volumes were determined according to $V = 1/2 A \times B^2$, where *A* denotes the largest dimension of the tumor and *B* represents the smallest dimension (25). Tumor volume was measured on days 7, 14, 18, and 21. At day 21, mice were sacrificed and tumors were surgically extracted for morphologic and biochemical studies.

Tumor Extract Preparation

Tumors were surgically extracted at day 21 and homogenized in a Tris buffer [50 mmol/L Tris (pH 7.6), 0.5 mol/L NaCl, 0.1% SDS, 0.02% NaN₃, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L iodoacetamide] and proteins were quantified by the Bradford method (26).

Morphologic Studies

Tissue sections were cut at 5 µm and stained with hematein-erythrosin-safran for routine histologic analysis and by Masson trichrome for evaluating angiogenesis.

Immunohistochemical analysis for VEGF and MT1-MMP was done on paraffin-embedded 3-µm tissue sections from tumor specimens. The sections were deparaffinized, rehydrated, and treated in citrate buffer (pH 6.0), for antigen retrieval. They were treated for 10 min with 3% H₂O₂ in PBS to block endogenous peroxidases. For CD31 labeling, frozen tumor specimens were cut in 5-µm sections using a cryostat apparatus, put on a coated glass slide, and fixed in acetone. Sections were preincubated for 20 min with goat serum and incubated overnight at 4°C with a rat anti-mouse CD31, goat anti-mouse MT1-MMP antibody, or goat anti-mouse VEGF antibody followed by biotinylated rabbit anti-goat or anti-rat, peroxidase-labeled streptavidin, the peroxidase substrate 3-amino-9-ethyl-carbazole (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and H₂O₂, which gives a dark red reaction product. Tumor sections were counterstained with

hematoxylin. Semiquantitative evaluation of VEGF and MT1-MMP expression was done by two independent pathologists. At least three different fields were counted in six or seven different tumors per group [control, NC1(XIX), or scrambled peptide]. Expression was graded from 0 to 3 according to the patterns as follows: 0, no positivity; +, faint labeling; ++, strong labeling; and +++, intense labeling. The number of fields classified in each group was considered for analysis of the data.

Cell Proliferation

For measuring cell proliferation, 10,000 cells were plated into 96-well plates and incubated for 24, 48, or 72 h with NC1(XIX) peptides in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum for B16F1 cell or in endothelial cell growth medium for HMEC-1. Cell proliferation was measured with colorimetric assay WST-1 (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Cell Adhesion

For measuring cell adhesion, two types of experiments were done. In the first set of experiments, non-tissue culture plates were coated with Matrigel. Fifty thousand B16F1 cells per well were seeded into 96-well plates and incubated for 30 min. NC1(XIX) peptide (30 $\mu\text{mol/L}$) was added to the culture medium during the adhesion assay. In the second set of experiments, NC1(XIX) peptide or scrambled peptide was immobilized on 96-well plates at different concentrations (200 ng, 1 μg , and 10 μg per well). Fifty thousand B16F1 cells per well were seeded and incubated for 30 min. In all experiments, plastic was used as a positive control and BSA (1 or 10 μg per well) was used as a negative control. After several rinses, adhered cells were measured with colorimetric assay WST-1.

Apoptosis

Apoptosis was determined by fluorescent microscopy using cell staining with Hoechst 33342. After 4 h of exposure to NC1(XIX) or scrambled peptide (30 $\mu\text{mol/L}$), cell morphologic changes typical of apoptosis, such as chromatin condensation or fragmentation and nuclear shrinkage, were studied.

In vitro Migration and Invasion Assays

Migration and invasion were assayed in Transwell devices (Costar, distributed by Dutscher, Brumath, France). RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 2% BSA was used as a chemoattractant. Briefly, 40,000 cells were suspended in serum-free RPMI 1640 containing 0.2% BSA and seeded onto the Transwell membranes (6.5 mm in diameter and 8- μm pores) coated (invasion assay) or not (migration assay) with Matrigel (30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). After 24 or 48 h of incubation period for migration or invasion studies, respectively, cells were fixed with methanol and stained with crystal violet for 15 min. Cells remaining on the upper face of the membranes were scrapped and those on the lower face were counted using an inverted microscope.

Capillary Tube Formation on Matrigel

Matrigel (10 mg/mL) was added to a 24-well culture plate (200 μL per well). After 30 min of incubation at 37°C, 50,000 HMEC-1 cells were suspended in serum-free endothelial cell growth medium and seeded onto the gel.

They were incubated with either control medium, NC1(XIX), or the corresponding scrambled peptide (30 $\mu\text{mol/L}$). Capillary tube formation was observed after 48 h. Semiquantitative evaluation of the capillary tubes was done after pixelization by determining the ratio of black pixels relative to the total pixels. Quantitative evaluation of the capillary tubes was further done by a second method using computer analysis ImageJ software for Windows (NIH, Bethesda, MD; ref. 27).

MT1-MMP Expression and Quantification

Western blot analysis was used to evaluate MT1-MMP expression by HMEC-1 and B16F1 cells. For that purpose, 50 μg proteins from cell membrane extracts were deposited into the gels, subjected to SDS-PAGE, and then transferred onto Immobilon-P membranes. Membranes were blocked by incubation with 5% nonfat dry milk, 0.1% Tween 20 in 50 mmol/L Tris-HCl buffer, and 150 mmol/L NaCl (pH 7.5) for 2 h at room temperature. They were incubated overnight with a rabbit anti-human MT1-MMP antibody and then for 1 h with the corresponding peroxidase-conjugated second antibody at room temperature. Immune complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, Orsay, France).

Quantification of MT1-MMP activity was done using the Biotrak MT1-MMP activity assay (Amersham) according to the manufacturer's instruction.

Western Blot Analysis of VEGF Expression *In vivo*

Western blot analysis was used to evaluate VEGF expression in tumor extract preparation. For that purpose, tumors were surgically collected, and tumor extracts were prepared as described above. Fifty micrograms of proteins from tumor extracts were deposited on the gels, subjected to SDS-PAGE, then transferred onto Immobilon-P membranes. Membranes were blocked and incubated overnight with goat anti-mouse VEGF antibody or actin antibody and then for 1 h with the corresponding peroxidase-conjugated second antibody at room temperature. Immune complexes were visualized with the enhanced chemiluminescence detection kit.

Real-time Reverse Transcription-PCR Analyses

RNA isolation was done using the Qiagen RNeasy kit (Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared from 1 μg of total RNA by reverse transcription. FastStart DNA Master Hybridization kit (Roche Diagnostics) was used for the PCR. The Roche Diagnostics LightCycler was used for amplification and data collection. The primers were 5'-cgggtgaggaataacaagt-3' and 3'-ccagaagagagcagcatcaa-5' for MT1-MMP; 5'-attctatgtggggcagcag-3' and 3'-atggctgggtgtgaag-5' for β -actin; and 5'-acgatttggctgtattggg-3' and 3'-tgatttggagg-gatctgc-5' for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. The denaturation step was 8 min at 94°C. The amplification step was 50 cycles of 95°C for 0 s, 60°C for 10 s, and 72°C for a time depending on the fragment length. Fluorescence acquisition was carried out at 72°C in single mode at the end of the elongation step. The fusion step was done at 65°C to 95°C (temperature transition 0.2°C/s) with stepwise fluorescence acquisition. Product specificity was

evaluated by melting curve analysis and by electrophoresis in 2% agarose gel. Fluorescence was analyzed by the LightCycler Data Analysis software (Roche Diagnostics). Crossing points were established using the second derivative method. Results were expressed as the target/internal standard (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) concentration ratio of the sample divided by the target/internal standard concentration ratio of the calibrator.

Statistical Analyses

For *in vitro* experiments, statistical analyses were done by Student's *t* test and results expressed as mean \pm SD. For *in vivo* experiments, volumes of primary tumors were statistically analyzed using the nonparametric *U* test of Mann and Whitney. Statistical analysis of the immunohistochemistry data was done using the χ^2 test.

Results

NC1(XIX) Inhibits *In vivo* Tumor Growth

S.c. injection of B16F1 melanoma cells in C57Bl6 mice resulted in the development of a tumor at the injection site. Preincubation of melanoma cells with NC1(XIX) (30 μ mol/L) followed by peritumoral injections of the peptide (2.5 mg/kg mouse weight) at days 7 and 14 significantly decreased tumor growth (Fig. 1A). Tumor volume was significantly decreased as soon as day 14 compared with untreated (control) mice or with scrambled

peptide-treated mice. The difference between control or scrambled-treated mice and NC1(XIX)-treated mice increased with time, so that tumor volume was decreased by 70% ($P < 0.01$) at day 21. Preincubation of melanoma cells with NC1(XIX) (30 μ mol/L) without reinjections had no significant effect on tumor growth (Fig. 1B). When the preincubation of tumor cells with NC1(XIX) was omitted and only NC1(XIX) injections at days 7 and 14 were done, a strong inhibition of tumor growth was observed, nearly as intense as the full course treatment (-69% ; $P < 0.01$; Fig. 1C). When the peptide was injected *i.p.* on days 10 and 15 after the appearance of the tumor, we also observed a strong reduction in tumor growth (-67% ; $P < 0.01$) compared with the scrambled peptide or control medium (Fig. 1D).

NC1(XIX) Has No Effects on *In vitro* Melanoma Cell Growth and Cell Adhesion

To check if NC1(XIX) was able to inhibit *in vitro* melanoma cell growth, 10,000 B16F1 cells per well were seeded into 96-well plates and incubated for 24, 48, or 72 h with increasing concentrations of the peptides. No significant effect on cell proliferation was found (Fig. 2A). For adhesion assay, non-tissue culture plates were coated with matrix proteins. Fifty thousand B16F1 cells per well were seeded into 96-well plates and incubated for 30 min. NC1(XIX) peptide (30 μ mol/L) was added to the culture medium during the adhesion assay. No effect of NC1(XIX) was found under these conditions (Fig. 2B). In the second set of

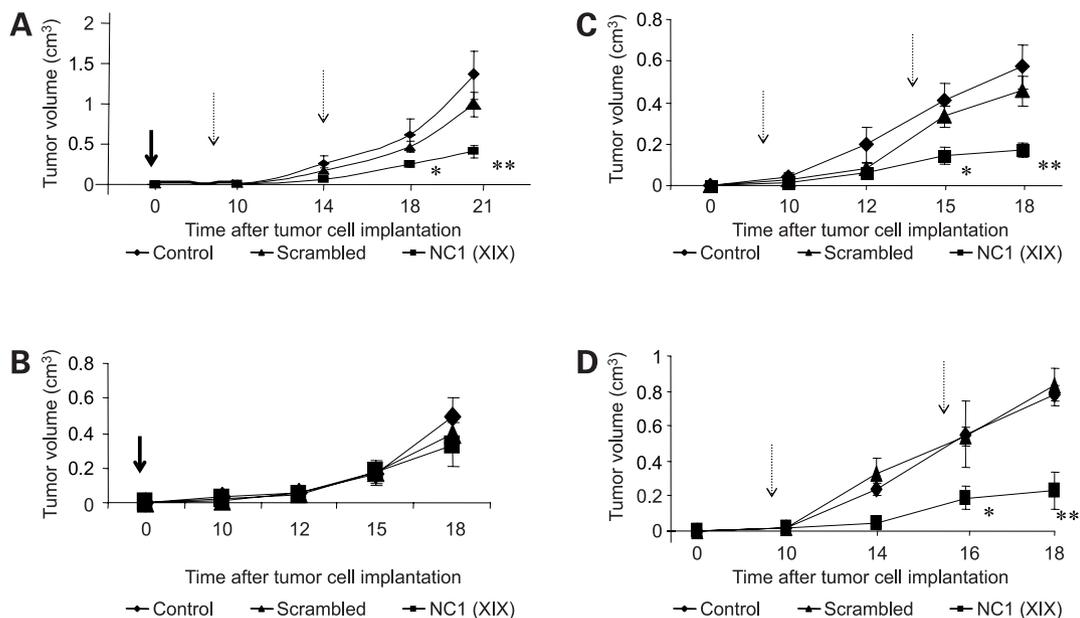


Figure 1. Inhibition of *in vivo* melanoma tumor growth by NC1(XIX) peptide. B16F1 cells (2.5×10^5 per mouse) were s.c. injected to syngeneic C57Bl6 mice. Tumor size was measured at days 7, 10, 14, 18, and 21. Kinetics of tumor growth in C57Bl6 mice treated with the NC1(XIX) peptide (■), the scrambled peptide (▲), or RPMI 1640 alone (controls; ○). **A**, B16F1 cells were preincubated for 15 min with either control medium, NC1(XIX) peptide (30 μ mol/L), or the scrambled peptide (30 μ mol/L) before s.c. injection. Control medium, NC1(XIX) peptide (2.5 mg/kg mouse weight), or scrambled peptide (2.5 mg/kg mouse weight) was reinjected around the tumor at days 7 and 14. **B**, B16F1 cells were only preincubated for 15 min with either control medium, NC1(XIX) peptide (30 μ mol/L), or the scrambled peptide (30 μ mol/L) before s.c. injection. No reinjections were done. **C**, control medium, NC1(XIX) peptide (2.5 mg/kg mouse weight), or scrambled peptide (2.5 mg/kg mouse weight) was injected around the tumor at days 7 and 14. No preincubation of tumor cells with the peptide was done. **D**, control medium, NC1(XIX) peptide (10 mg/kg mouse weight), or scrambled peptide (10 mg/kg mouse weight) was injected *i.p.* at days 10 and 15 after appearance of the tumor nodules. No preincubation of tumor cells was done. ↓, cell preincubation; ⌋, peptide injection. Points, mean; bars, SD; *, $P < 0.01$, significantly different from control; **, $P < 0.001$ significantly different from control.

experiments, NC1(XIX) or scrambled peptides were immobilized on the plates. Fifty thousand B16F1 cells per well were seeded into 96-well plates and incubated for 30 min. Cells were found to adhere to the peptide as well as to Matrigel (Fig. 2B).

NC1(XIX) Decreases *In vitro* Cell Migration and Matrigel Invasion

For testing the capacity of NC1(XIX) to inhibit tumor cell migration and their invasive properties, 40,000 B16F1 cells were seeded onto Transwell membranes coated (invasion assay) or not (migration assay) with Matrigel.

After 24 h (migration assay) or 48 h (invasion assay) in the absence (control) or presence of NC1(XIX) in the culture medium (30 $\mu\text{mol/L}$), migrated cells on the lower face of the membrane were counted. As shown in Fig. 3, NC1(XIX) induced a significant reduction in tumor cell migration (-38% ; $P < 0.01$) and Matrigel invasion (-48% ; $P < 0.002$), whereas scrambled peptide at the same concentration had no significant effect.

NC1(XIX) Decreases Tumor *In vivo* Vascularization

Histologic examination of tumor sections after staining with anti-CD31 antibody showed a strong decrease in tumor vascularization in mice treated with NC1(XIX) versus control or scrambled peptide-treated mice. Whereas many large vascular structures were observed in control and scrambled peptide-treated tumors, only very small vessels were observed in NC1(XIX)-treated tumors (Fig. 4A). In addition, counting of the CD31-labeled structures showed a highly significant decrease in the vessel number in NC1(XIX)-treated tumors: 12.0 ± 1.4 (mean \pm SD) per field in the control tumors; 13.0 ± 2.9 per field in the scrambled peptide-treated tumors; and 8.0 ± 1.6 per field in the NC1(XIX)-treated tumors ($P < 0.001$).

NC1(XIX) Decreases VEGF Expression in the Tumors

Because the expression of angiogenic growth factors is of paramount importance for tumor angiogenesis, we investigated the expression of VEGF in our experimental model. Immunohistochemical analysis of the tumors using a specific monoclonal anti-VEGF antibody (Fig. 4B) showed a strong (++) or an intense (+++) VEGF expression in the majority of control (13 of 21) or scrambled peptide-treated (12 of 20) tumors. On the contrary, VEGF expression was faint or absent in most of the NC1(XIX)-treated tumors (17 of 21). The differences were statistically significant when tested by the χ^2 test ($P < 0.001$).

Western blot analysis of the VEGF protein in tumor extracts showed a 65% ($P < 0.01$) decrease in the tumors treated with NC1(XIX) compared with control or scrambled peptide-treated tumors (Fig. 4C).

NC1(XIX) Decreases *In vitro* Pseudotube Formation by Endothelial Cells

To test the effects of NC1(XIX) on angiogenesis *in vitro*, HMEC-1 endothelial cells were seeded onto Matrigel and incubated for 24 h in serum-free endothelial cell growth medium supplemented or not with NC1(XIX) peptide or the scrambled peptide (30 $\mu\text{mol/L}$ each).

The presence of NC1(XIX) strongly inhibited pseudotube formation compared with control or scrambled

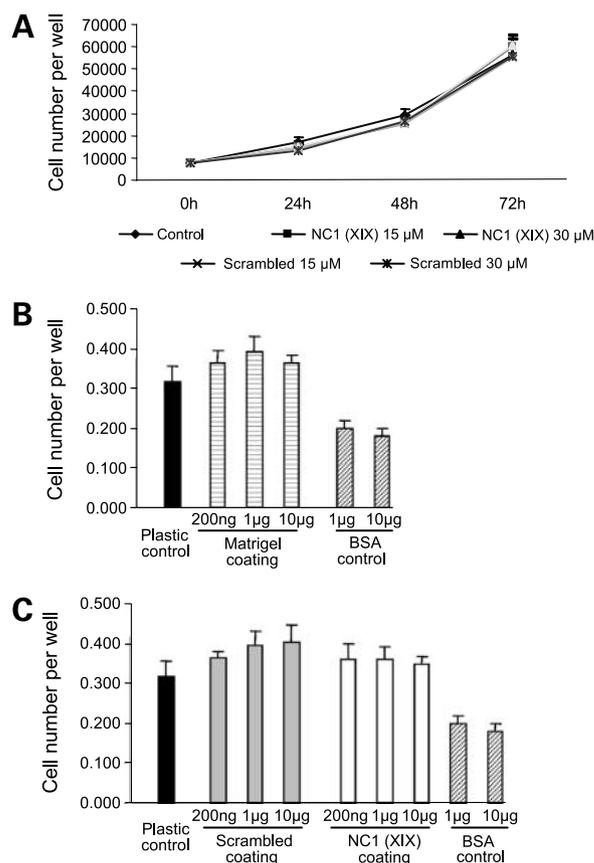


Figure 2. NC1(XIX) does not affect *in vitro* melanoma cell proliferation or adhesion. **A**, for proliferation assay, B16F1 cells were plated into 96-wells plates (10,000 per well) in RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum and increasing concentrations of NC1(XIX) peptide. After 24, 48, or 72 h at 37°C, cell proliferation was evaluated using the WST-1 colorimetric assay. **B**, non-tissue culture plates were coated with Matrigel. Fifty thousand B16F1 cells per well were seeded and incubated for 30 min. Plates coated with BSA (1 or 10 μg per well) were used as controls in addition to plastic controls. NC1(XIX) (30 $\mu\text{mol/L}$) was added to the culture medium during the adhesion assay. The number of adhered cells was then counted. **C**, NC1(XIX) or the scrambled peptide (200 ng, 1 μg , and 10 μg per well) was immobilized on the plates and 50,000 B16F1 cells per well were seeded. Plates coated with BSA (1 or 10 μg per well) were used as control in addition to plastic controls. The number of adhered cells was counted after 30 min. Points and columns, mean; bars, SD.

peptide-treated cultures (Fig. 5A). Quantitative evaluation of the capillary tube number by two different methods (Fig. 5B) showed a 59% and 85% decrease ($P < 0.01$) in NC1(XIX)-incubated cultures compared with the control. The scrambled peptide had no significant effect. On the other hand, NC1(XIX) had no effect on endothelial cell proliferation *in vitro* (Fig. 5C). No morphologic changes typical of cell apoptosis, such as chromatin condensation or fragmentation and nuclear shrinkage, were observed in endothelial cells incubated with NC1(XIX) (data not shown).

NC1(XIX) Inhibits MT1-MMP Expression and Activity

Because MT1-MMP plays a crucial role in angiogenesis, we investigated the effects of NC1(XIX) on its expression both *in vivo* and *in vitro*.

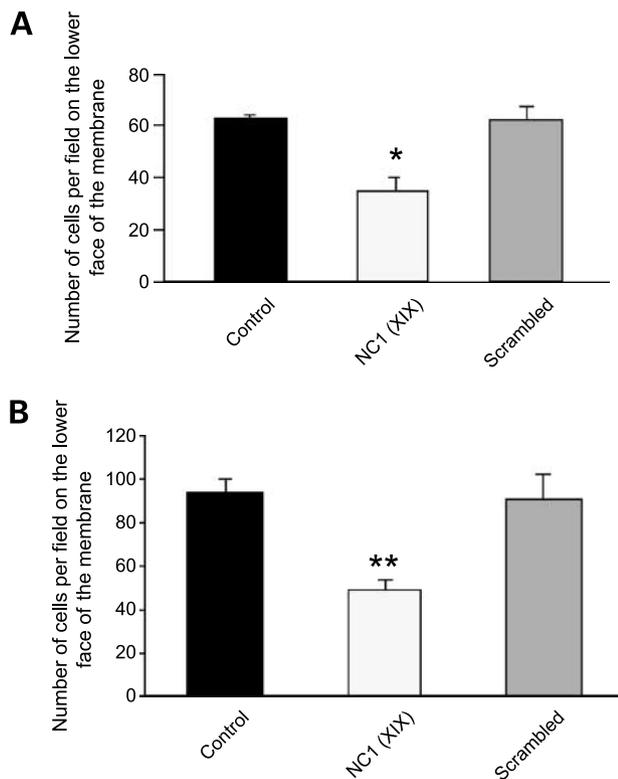


Figure 3. NC1(XIX) inhibits *in vitro* melanoma cell migration and Matrigel invasion. Migration and invasion were assayed in Transwell devices in the absence (control) or presence of NC1(XIX) or the scrambled peptide (30 $\mu\text{mol/L}$ each). Forty thousand cells were suspended in serum-free RPMI and seeded onto the Transwell membranes coated (invasion assay) or not (migration assay) with Matrigel (30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). At the end of the incubation period, cells were fixed with methanol and stained with crystal violet for 15 min. Cells remaining on the upper face of the membranes were scrapped and those on the lower face were counted. **A**, migration assay (24 h of incubation). **B**, Matrigel invasion assay (48 h of incubation). Columns, number of cells per field on the lower face of the Transwell membrane at the end of the incubation period (mean); bars, SD. *, $P < 0.01$, significantly different from control; **, $P < 0.001$, significantly different from control.

In vivo, immunohistochemical analysis of the tumors, using a specific anti-mouse MT1-MMP antibody (Fig. 6), showed a strong (++) or intense (+++) MT1-MMP expression in most of the control (14 of 22) or scrambled peptide-treated (10 of 18) tumors. On the contrary, MT1-MMP expression was faint or absent in most of the NC1(XIX)-treated tumors (20 of 21). The differences were statistically significant when tested by the χ^2 test ($P < 0.001$). On the other hand, NC1(XIX) did not modify MT1-MMP expression by tumor cells *in vitro* (data not shown).

For studying the effects of NC1(XIX) on MT1-MMP expression by endothelial cells *in vitro*, HMEC-1 cells were incubated for 24 h with or without NC1(XIX) or the scrambled peptide (30 $\mu\text{mol/L}$ each). Real-time reverse transcription-PCR showed a strong decrease (90%; $P < 0.01$) of MT1-MMP mRNA levels in NC1(XIX)-treated endothelial cells (Fig. 7A), whereas scrambled peptide had no effect. Western blot analysis of the MT1-MMP protein

showed a 36% ($P < 0.01$) decrease in endothelial cells incubated with NC1(XIX) compared with control or scrambled peptide-incubated cells (Fig. 7B). Similar data were obtained by using the Biotrak MT1-MMP activity

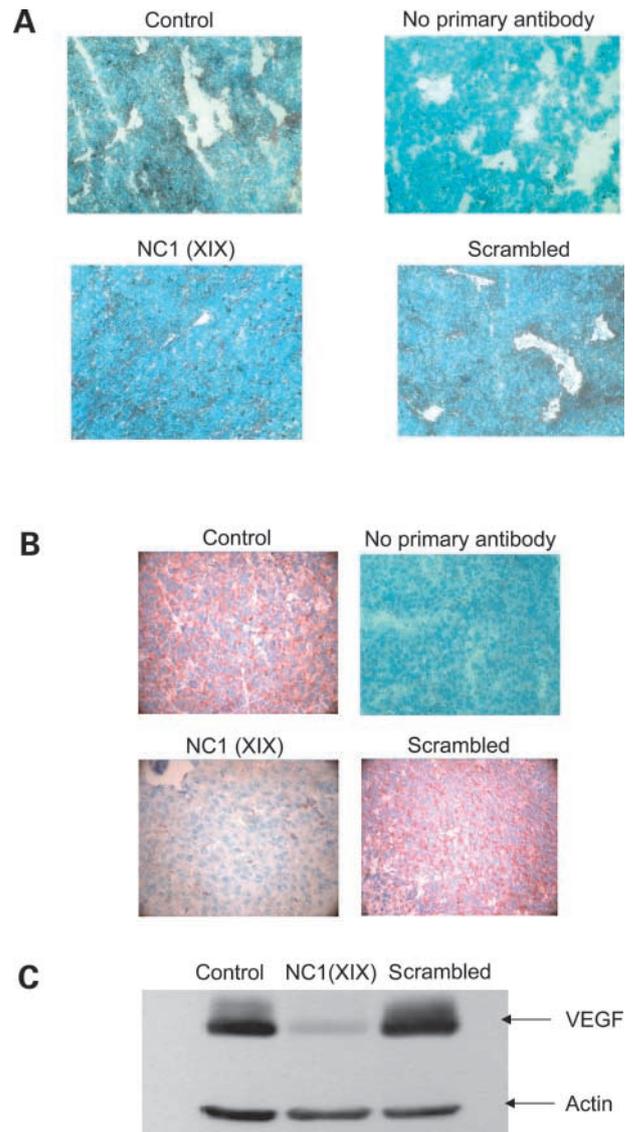


Figure 4. NC1(XIX) decreases *in vivo* tumor vascularization and VEGF expression. **A**, mice were sacrificed at day 21 and tumors were surgically extracted for morphologic studies. Tissue sections were cut at 5 μm and stained with an anti-CD31 antibody. Numerous and large vessels were seen in control and scrambled peptide-treated tumors (arrowheads), whereas very few large vessels were observed in NC1(XIX)-treated tumors. Representative examples of tissue sections. **B**, tumors from control, NC1(XIX)-, or scrambled peptide-treated mice were surgically extracted at day 21 for immunohistologic analysis. Tumor sections were stained with anti-VEGF antibody as described in Materials and Methods. VEGF appears as dark red staining. Tumor sections were counterstained with hematoxylin. Original magnification, $\times 200$. **C**, Western blot analysis of VEGF expression in tumor extracts. Tumors from controls, NC1(XIX)-, or scrambled peptide-treated mice were surgically collected at day 21, and tumor extracts were prepared as described in Materials and Methods. Fifty micrograms of proteins from the extracts were deposited on the gel and analyzed by Western blot, using anti-VEGF and anti-actin antibodies.

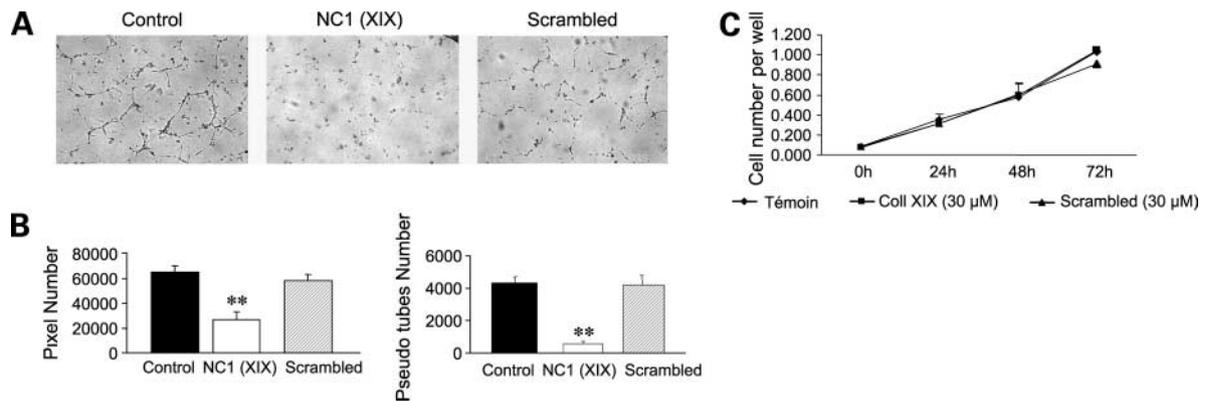


Figure 5. NC1(XIX) inhibits *in vitro* pseudotube formation but has no effect on *in vitro* endothelial cell proliferation. **A**, HMEC-1 cells (50,000 per well) were seeded on Matrigel-coated 24-well plates and incubated in the absence (control) or presence of NC1(XIX) or the scrambled peptide (30 $\mu\text{mol/L}$ each). After 48 h at 37°C, pseudotube formation was photographed. Original magnification, $\times 10$. **B**, semiquantitative evaluation of pseudotubes. Quantification was done by measuring the ratio of black pixels relative to the total pixels (*left*) and by computer analysis using the ImageJ software (*right*). Six different areas were measured for each sample. *Columns*, mean; *bars*, SD. **, $P < 0.001$, significantly different from control. **C**, HMEC-1 cells were incubated in 96 well-culture plates for 24, 48, or 72 h with either the culture medium alone (controls), NC1(XIX) (30 $\mu\text{mol/L}$), or the scrambled peptide at the same concentration. Cell proliferation was determined by the WST-1 colorimetric assay. Results were expressed as a kinetic measurement of the cell number. *Points*, mean; *bars*, SD.

assay, showing a 35% ($P < 0.01$) decrease in MT1-MMP activity in NC1(XIX)-treated HMEC-1 (Fig. 7C).

Discussion

Type XIX collagen is a minor collagen associated with the basement membrane area, together with types IV, XV, and XVIII collagens (4). It was initially characterized by its implication in muscle differentiation and morphogenesis (6,7). This role, however, does not exclude other functions. Its basement membrane localization prompted us to hypothe-

size that, as it is the case for other basement membrane collagens, it might be involved in the control of tumor invasion and angiogenesis (4). In most of the already known basement membrane collagen chains, the COOH-terminal NC1 domain was shown to exhibit antitumor and/or antiangiogenic activity. This is the case for endostatin, restin, tumstatin, canstatin, and arresten, the NC1 domains of $\alpha 1(XVIII)$, $\alpha 1(XV)$, $\alpha 3(IV)$, $\alpha 2(IV)$, and $\alpha 1(IV)$ collagen chains, respectively (8, 13). Considering these elements, we speculated that the NC1 domain of the $\alpha 1(XIX)$ collagen

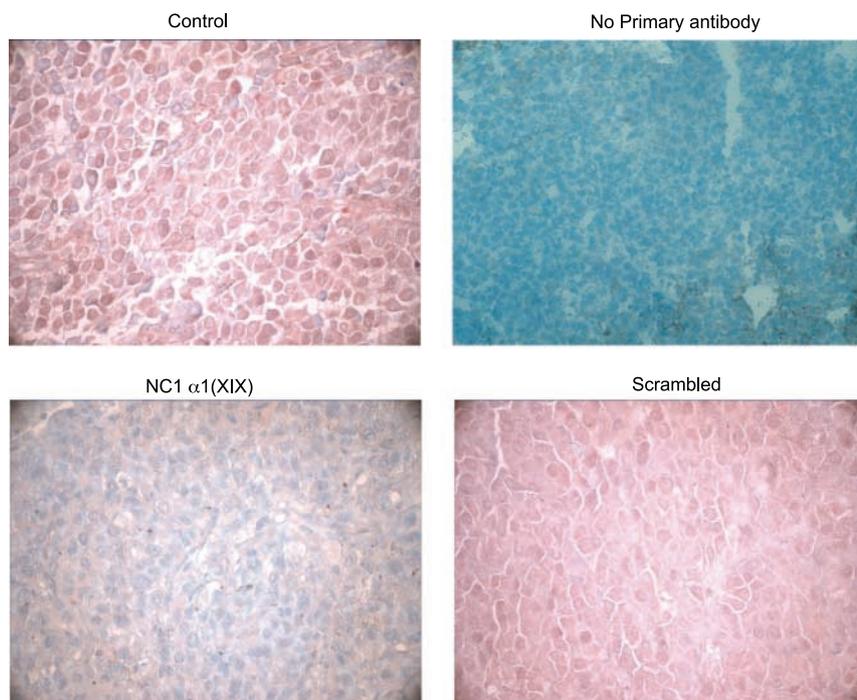


Figure 6. NC1(XIX) inhibits MT1-MMP expression in tumors. Tumors from control, NC1(XIX)-, and scrambled peptide-treated mice were extracted at day 21. Tumor sections were stained with an antmouse MT1-MMP antibody. MT1-MMP appears as dark red staining. Tumor sections were counterstained with hematoxylin. Original magnification, $\times 200$.

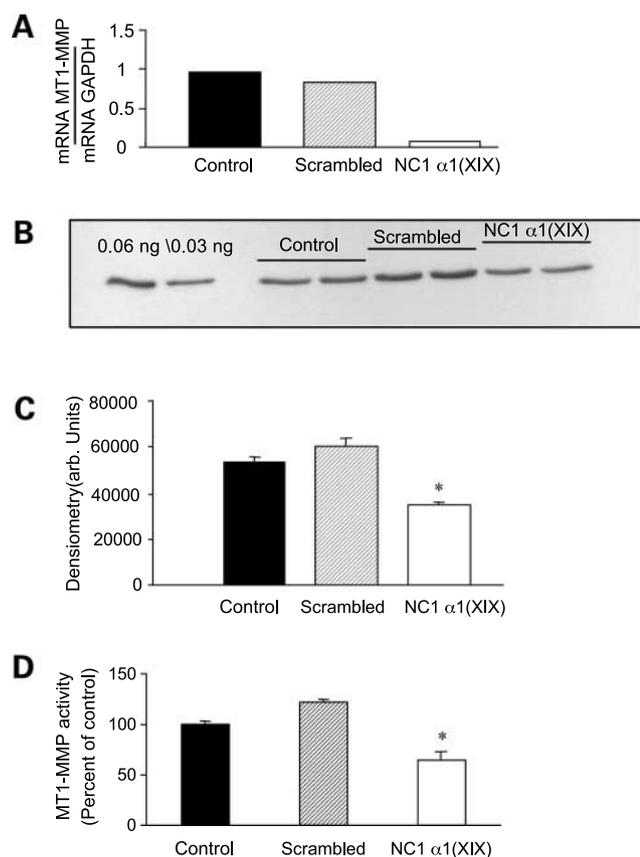


Figure 7. NC1(XIX) inhibits MT1-MMP expression by endothelial cells *in vitro*. Endothelial cells (HMEC-1) were incubated for 24 h with control medium, NC1(XIX) peptide, or the scrambled peptide (30 μ mol/L) and MT1-MMP expression and activity were studied. **A**, MT1-MMP mRNA levels were measured using real-time reverse transcription-PCR analysis. Results were expressed as the target/internal standard (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GAPDH*) concentration ratio of the sample divided by the target/internal standard concentration ratio of the calibrator. **B**, Western blot analysis of MT1-MMP, using a specific anti-MT1-MMP antibody. Known amounts of purified MT1-MMP (0.06 and 0.03 ng) were deposited on the first two lanes as loading controls. **C**, Western blot analysis quantification. *Columns*, mean; *bars*, SD. *, $P < 0.01$, significantly different from control; **D**, quantification of MT1-MMP activity, using the Biotrak MT1-MMP activity assay system.

chain could also be able to control tumor growth and/or angiogenesis.

To test this hypothesis, we used an experimental melanoma model obtained by s.c. injection of B16F1 melanoma cells in syngeneic C57Bl6 mice (28). In this model, injected mice develop a s.c. melanoma tumor whose volume may be easily measured. Our results show that a preincubation of melanoma cells with the NC1(XIX) peptide, followed by peritumoral reinjection of the peptide at days 7 and 14, strongly reduced tumor growth. The effect was at least as intense as that of tumstatin under the same conditions. Preincubation of melanoma cells with NC1(XIX) without peritumoral reinjections had no significant effect on tumor growth. When the initial preincubation between NC1(XIX) and tumor cells was omitted and only NC1(XIX) reinjections at days 7 and 14 were done, a

strong inhibition of tumor growth was observed, nearly as intense as the full-course treatment. These results show that NC1(XIX) injections were more important than the initial preincubation for triggering tumor growth inhibition. We also observed a significant reduction in tumor growth in mice injected i.p. with 10 mg/kg NC1(XIX), without initial preincubation B16F1 cells with the peptide, showing that NC1(XIX) may also act systemically.

The antitumor activity of NC1(XIX) did not depend on an inhibition of tumor cell proliferation *in vitro*. Nevertheless, NC1(XIX) strongly inhibited *in vitro* invasive properties of B16F1 melanoma cells, as shown by migration and invasion experiments. Similar effects were observed previously for the NC1 domain of α 3(IV) collagen chain (29). Histologic examination of tumor sections showed that tumor angiogenesis was significantly decreased in treated mice. This effect might depend on a direct inhibition of neoangiogenesis by NC1(XIX), as suggested by its capacity to inhibit *in vitro* pseudotube formation by human microvascular endothelial cells. Similar effects were reported previously for endostatin and canstatin (30, 31). It does not seem, however, that NC1(XIX) is able to induce endothelial cell apoptosis, as it was reported previously for other angiogenesis inhibitors because no decrease of cell number was observed when human endothelial cells were cultured in the presence of the peptide (32). On the other hand, NC1(XIX) was able to decrease VEGF expression in tumors, which may contribute to the decreased tumor vascularization that we observed.

The inhibition of MT1-MMP expression and activity by NC1(XIX) is of particular interest. MT1-MMP is up-regulated in many tumor types and is critical for pericellular degradation of the extracellular matrix, both by direct degradation of several of its components and by activating pro-MMP-2 (17, 33). In addition, MT1-MMP seems to play a central role in tumor angiogenesis and its inhibition by specific antibodies or small interfering RNA is sufficient to inhibit angiogenesis (14, 20, 21, 34, 35). Moreover, MT1-MMP was shown to be able to up-regulate VEGF expression by human breast adenocarcinoma cells and human glioma cells (36, 37). Consequently, the inhibition of MT1-MMP by NC1(XIX) might, at least partially, explain its inhibitory effects on tumor cell invasion and angiogenesis (38).

The question may be asked how NC1(XIX) may affect the expression of MT1-MMP and VEGF. Previous works have shown that other peptides from the NC1 domain of basement membrane-associated collagens may bind to specific receptor(s) of endothelial or tumor cells and activate intracellular pathways that modulate the expression of specific genes. It was the case, for instance, for endostatin, which was shown to decrease VEGF expression at the transcriptional level (39). NC1(XIX) might act similarly to endostatin. Further experiments will be, however, necessary to elucidate the intracellular signaling triggered by NC1(XIX).

Collectively, our results show that the COOH-terminal NC1 domain of human type XIX collagen exhibits antitumor properties, both *in vitro* and *in vivo*. Explaining the physiologic significance of these findings will need

further investigation. We suggest, however, that the anticancer properties of the NC1(XIX) peptide could lead to the development of new therapeutic strategies in malignant diseases.

Acknowledgments

We thank Dominique Patigny, Hervé Kaplan, and Laurence Schneider for their technical expertise.

References

1. Yoshioka H, Zang H, Ramirez F, et al. Synteny between the loci from a novel FACIT-like collagen locus (D6S228E) and $\alpha 1(XIX)$ collagen (COL19A1) on 6912–14 in human. *Genomics* 1992;13:884–6.
2. Myers JC, Sun MJ, D'Ippolito JA, Jabs EJ, Neilson EG, Dion AS. Human cDNA clones transcribed from an unusually high-molecular weight encode a new collagen chain. *Gene* 1993;123:211–7.
3. Inoguchi K, Yoshioka H, Khaleduzzaman M, Ninomiya Y. The mRNA for $\alpha 1(XIX)$ collagen chain, a new member of FACITs, contains a long unusual 3' untranslated region and displays many unique splicing variants. *J Biochem* 1995;117:137–46.
4. Myers JC, Li D, Bageris A, Abraham V, Dion AS, Amenta PS. Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens. *Am J Pathol* 1997;151:1729–40.
5. Sumiyoshi H, Inoguchi K, Khaleduzzaman M, Ninomiya Y, Yoshioka H. Ubiquitous expression of the $\alpha 1(XIX)$ collagen gene (Col19a1) during mouse embryogenesis becomes restricted to a few tissues in the adult organism. *J Biol Chem* 1997;272:17104–11.
6. Sumiyoshi H, Laub F, Yoshioka H, Ramirez F. Embryonic expression of type XIX collagen is transient and confined to muscle cells. *Dev Dyn* 2001;220:155–62.
7. Sumiyoshi H, Mor N, Lee SY, et al. Esophageal muscle physiology and morphogenesis require assembly of a collagen XIX-rich basement membrane zone. *J Cell Biol* 2004;166:591–600.
8. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005;65:3967–79.
9. Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 2003;22:3172–9.
10. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327–36.
11. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401–10.
12. Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meining GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol* 2000;156:1489–98.
13. Maquart FX, Pasco S, Ramont L, Hornebeck W, Monboisse JC. An introduction to matrikines: Extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:199–202.
14. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161–74.
15. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–4.
16. Hofmann UB, Westphal JR, Van Kraats AA, Ruiter DJ, Van Muijen GN. Expression of integrin $\alpha v \beta 3$ correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase 2 in human melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* 2000;87:12–9.
17. Kurschat P, Zigrino P, Nischt R, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. *J Biol Chem* 1999;274:21056–62.
18. Lida J, Wilhelmson KL, Price MA, et al. Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth. *J Invest Dermatol* 2004;122:167–76.
19. Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett* 2003;194:1–11.
20. Bauvois B. Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene* 2004;23:317–29.
21. Seiki M, Yana I. Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. *Cancer Sci* 2003;94:569–74.
22. Koike T, Vernon RB, Hamner MA, Sadoun E, Reed MJ. MT1-MMP, but not secreted MMPs, influences the migration of human microvascular endothelial cells in 3-dimensional collagen gels. *J Cell Biochem* 2002;86:748–58.
23. Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, Noel A. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 2003;22:55–61.
24. Bouifraden S, Drouot C, el Hadrami M, et al. Some of the amino acid chemistry going on in the laboratory of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 1999;16:345–79.
25. Wald M, Olejar T, Sebkova V, Zadinova M, Boubelik M, Pouckova P. Mixture of trypsin, chymotrypsin, and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngenic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:16–22.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
27. Abramoff MD, Magelhaes PJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004;11:36–42.
28. Pasco S, Ramont L, Venteo L, Pluot M, Maquart FX, Monboisse JC. *In vivo* overexpression of tumstatin domains by tumor cells inhibits their invasive properties in a mouse melanoma model. *Exp Cell Res* 2004;301:251–65.
29. Pasco S, Han J, Gillery P, et al. A specific sequence of the noncollagenous domain of the $\alpha 3(IV)$ chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells. *Cancer Res* 2000;60:467–73.
30. Kuo CJ, LaMontagne KR, Garcia-Cardena G, et al. Oligomerization-dependent regulation of motility and morphogenesis by the collagen XVIII NC1/endostatin domain. *J Cell Biol* 2001;152:1233–46.
31. Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:37632–6.
32. Chavakis E, Dimmerler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:887–93.
33. Hofmann UB, Westphal JR, Zendman A, Becker JC, Ruiter DJ, Van Muijen GNP. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *J Pathol* 2000;19:1245–56.
34. Lafleur MA, Handsley MM, Knauper V, Murphy G, Edwards DR. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci* 2002;115:3427–38.
35. Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, et al. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2005;118:343–56.
36. Sounni NE, Roghi C, Chabottaux V, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2004;279:13564–74.
37. Sounni NE, Devy L, Hajitou A, et al. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* 2002;16:555–64.
38. Deryugina EI, Soroceanu L, Strongin AY. Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2002;62:580–8.
39. Hajitou A, Grignet-Debrus C, Devy L, et al. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J* 2002;16:1802–4.

Structural and Antitumor Properties of the YSNSG Cyclopeptide Derived from Tumstatin

Jessica Thevenard,^{1,4,7} Nicolas Floquet,^{2,5,7,8}
Laurent Ramont,^{1,4} Elise Prost,^{3,6}
Jean-Marc Nuzillard,^{3,6} Manuel Dauchez,^{1,4}
Hocine Yezid,^{2,5} Alain J.P. Alix,^{2,5}
François-Xavier Maquart,^{1,4}
Jean-Claude Monboisse,^{1,4}
and Sylvie Brassart-Pasco^{1,4,*}

¹Laboratoire de Biochimie Médicale
et Biologie Moléculaire

CNRS UMR 6198
IFR 53 Biomolécules
Université de Reims Champagne-Ardenne
51095 Reims
France

²Laboratoire de Spectroscopies et Structures
BioMoléculaires
IFR 53 Biomolécules
Université de Reims Champagne-Ardenne
51687 Reims Cedex 2
France

³Isolement, Structure, Transformations et Synthèse
de Substances Naturelles
CNRS FRE 2715
IFR 53 Biomolécules
Université de Reims Champagne-Ardenne
51096 Reims
France

Summary

We previously demonstrated that the NC1[α 3(IV)185–191] CNYYSNS peptide inhibited *in vivo* tumor progression. The YSNS motif formed a β turn crucial for biological activity. The aim of the present study was to design a YSNSG cyclopeptide with a constrained β turn on the YSNS residues more stable than CNYYSNS. By nuclear magnetic resonance and molecular modeling, we demonstrated that the YSNSG cyclopeptide actually adopted the expected β -turn conformation. It promoted melanoma cell adhesion and prevented their adhesion to the native peptide. It inhibited *in vitro* cell proliferation and migration through Matrigel by downregulating proteolytic cascades. Moreover, intraperitoneal administration of the YSNSG cyclopeptide inhibited melanoma progression far more efficiently than the native peptide. The increased solubility and stability at low pH of the

YSNSG cyclopeptide suggest this peptide as a potent antitumor therapeutic agent.

Introduction

Tumor invasion and metastasis require proteolytic degradation of extracellular matrix (ECM). This degradation involves various proteolytic cascades, such as matrix metalloproteinase (MMP) activation and the plasminogen activation system. MMPs belong to a zinc-dependent proteinase family with more than 25 members, secreted as inactive zymogens [1, 2]. Their activation, a major step in tumor invasion, results from an imbalance between levels of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and MMP activators, such as urokinase, plasmin, or membrane type MMPs (MT-MMPs). The latter constitutes an MMP subfamily containing an additional anchor domain which links the enzyme to the plasma membrane. MT-MMPs actively participate in the basement membrane degradation either directly or by activating latent pro-MMP-2 and pro-MMP-13 [3–5]. The plasminogen activation system, composed of two different plasminogen activators, urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type plasminogen activator (t-PA), both controlled by plasminogen activator inhibitors (PAI-1 and PAI-2), is also actively involved in basement membrane degradation either by direct breakdown of ECM macromolecules or by activating pro-MMPs [6, 7].

Basement membranes are essentially composed of type IV collagen, laminins, entactin/nidogen, and heparan sulfate proteoglycans. Type IV collagen is organized as a network of heterotrimers composed of three α (IV) chains among six possible, α 1(IV) to α 6(IV), each encoded by a specific gene [8]. Each chain comprises a 7S domain at its N terminus, a large central triple-helical domain of about 1400 amino acids, and a C-terminal noncollagenous (NC1) domain of about 240 amino acids. It is now recognized that NC1 domains from type IV collagen, but also from other collagen types, display several biological activities, mainly regulating tumor invasion and angiogenesis in various cancer types [9]. NC1 α 3(IV) chain, also called tumstatin, was first shown by Maeshima et al. to display antiangiogenic properties [10].

In previous studies, we demonstrated that the NC1[α 3(IV)185–203] peptide exhibits both *in vitro* and *in vivo* antitumor properties [11, 12]. A shorter CNYYSNS peptide, corresponding to residues 185–191, shared the same antitumor properties. The peptide adopts a β -turn conformation crucial for its biological activity. The aim of the present study was to design a peptide that contains both the four residues forming the YSNS β turn and a glycine residue allowing cyclization to constrain the β -turn conformation, to increase peptide stability and therefore to increase its biological activity. By nuclear magnetic resonance (NMR) and molecular modeling, we demonstrated that the YSNSG cyclopeptide actually adopts the expected β -turn conformation and exhibits antitumor properties.

*Correspondence: sylvie.brassart-pasco@univ-reims.fr

⁴Lab address: <http://helios.univ-reims.fr/Labos/LBMBM/>

⁵Lab address: <http://helios.univ-reims.fr/Labos/LSSB/>

⁶Lab address: <http://helios.univ-reims.fr/Labos/UPRESA6013/>

⁷These authors contributed equally to this work.

⁸Present address: Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

Results and Discussion

Structure of the YSNSG Linear Peptide

As a starting point of our study, a molecular dynamics simulation (MDS) was performed at 300K on the linear YSNSG peptide, either without or with an explicit representation of the solvent and starting from a fully extended conformation. The first MDS in implicit solvent lasted 50 ns. The main result obtained was the observation of stable β turns of type I (canonical or close) on YSNS and/or SNSG (50% of the conformations).

The second MDS in explicit solvent lasted 20 ns. As a final result, ten clusters (representative structures) were deduced from the trajectory (data not shown). Among these clusters, the presence of a YSNS β turn, an SNSG β turn, intermediate structures, and structures of extended or quasi-extended conformations could be noted. According to their ϕ/ψ , the YSNS and the SNSG β turns were found to be very close to two compatible type I β turns, in perfect agreement with standard prediction [13].

Structure of the YSNSG Cyclopeptide

First, an MDS of the YSNSG cyclopeptide was performed under the same conditions as the ones computed for the linear YSNSG peptide. The main result obtained was the observation, for the five residues, of dihedral angles characteristic of type I β turns (canonical or close) along all the 50 ns of the trajectory, indicating a stable conformation with a rather rigid backbone.

Second, the YSNSG cyclopeptide structure was analyzed by NMR. After assignment of all the proton signals on the TOCSY spectrum, some of the most interesting information came from the NOESY spectrum, which clearly indicated correlation between the backbone amide protons of sequential residues whereas no correlation was observed for nonsequential ones. A few other nuclear Overhauser effects (nOes) were also revealed by the spectra, in the NH-H α region (data not shown).

A random conformational search of the peptide structure was performed under NMR distance constraints (see [Experimental Procedures](#)). Interestingly, the three independent runs converged to the same conformation of lowest energy, with an rmsd on all atoms less than 0.2 Å. This structure ([Figure 1](#)) shared a β turn on the YSNS residues, with a C α (Y₁)-C α (S₄) distance less than 7.0 Å. This structure in implicit solvent was stabilized both by an H bond between the amide proton of tyrosine Y₁ and the C=O of serine S₄, forming a γ turn on the S₄GY₁ residues, and by an H bond between the hydroxyl group of Y₁ and the side chain amide function of asparagine N₃.

This conformation was further used as a starting point for an unconstrained MDS that was performed under the same conditions as those computed for the linear YSNSG peptide (explicit water, 300K). As expected, the cyclopeptide was observed as highly constrained, as indicated by a rmsd value less than 0.5 Å on its backbone atoms throughout the trajectory (data not shown). The γ turn described above quickly disappeared (during the heating phase) to reach another stable conformation. Flexibility of the peptide was further reduced to the exploration of the different rotamers of the tyrosine ([Figure 2A](#)). The corresponding conformation was char-

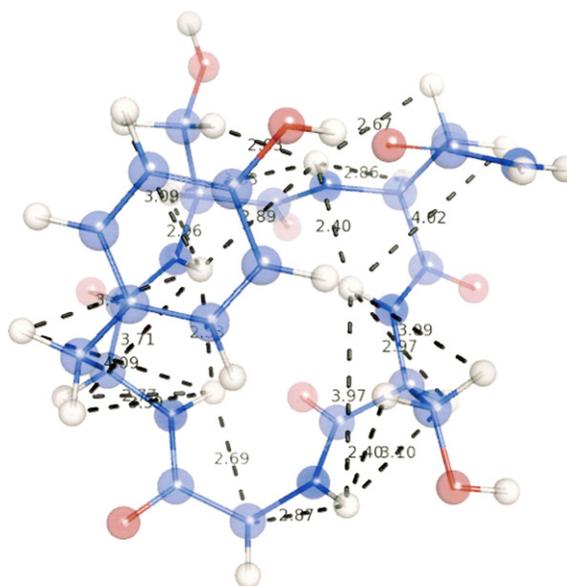


Figure 1. Minimal Energy Conformation of the YSNSG Cyclopeptide

This conformation shares the lowest potential energy and comes from the random conformational search of the YSNSG cyclopeptide in implicit solvent (using a distance-dependent dielectric constant). This structure is built in agreement with our NMR data (experimentally observed nOes that were included as constraints during the minimization process are reported as dashed lines).

acterized by a YSNS β turn along the entire trajectory ([Figure 2B](#)). Plotting the ϕ and ψ angles of the peptides versus time also showed that the five residues were often located in the α -helical region of the Ramachandran map, making the YSNS tetrapeptide close to a type I β turn ([Figure 2C](#)). However, *senso stricto*, this turn did not belong to any of the canonical types of β turn with mean ϕ/ψ of (-90° ; -66°) for both serine S₂ and asparagine N₃ residues.

This conformation was very close to a β turn spanning the YSNS sequence described for the linear YSNSG peptide with a mean rmsd of ~ 1.5 Å calculated on backbone atoms.

Comparison between Theoretical and Experimental Data of the YSNSG Cyclopeptide

To compare our theoretical and experimental results thoroughly, some proton-proton average distances extracted from the MDS were plotted ([Figure 3](#)). All the nOes observed experimentally, especially between the amide protons of sequential residues, corresponded to mean distances less than 4.0 Å; on the contrary, the amide protons of the backbone that did not correlate also corresponded to distances greater than 4.0 Å. Moreover, we observed that mean values of ϕ dihedral angles of the two serine residues were about -90° , in agreement with the NMR experiment ($-120^\circ \pm 30^\circ$).

One particular aspect of the conformation of the peptide observed along the molecular dynamics trajectory is that all the NHs of its backbone were grouped on the same side, whereas all the carbonyl groups were grouped on the other side ([Figure S1](#) in the [Supplemental Data](#) available with this article online). This specific

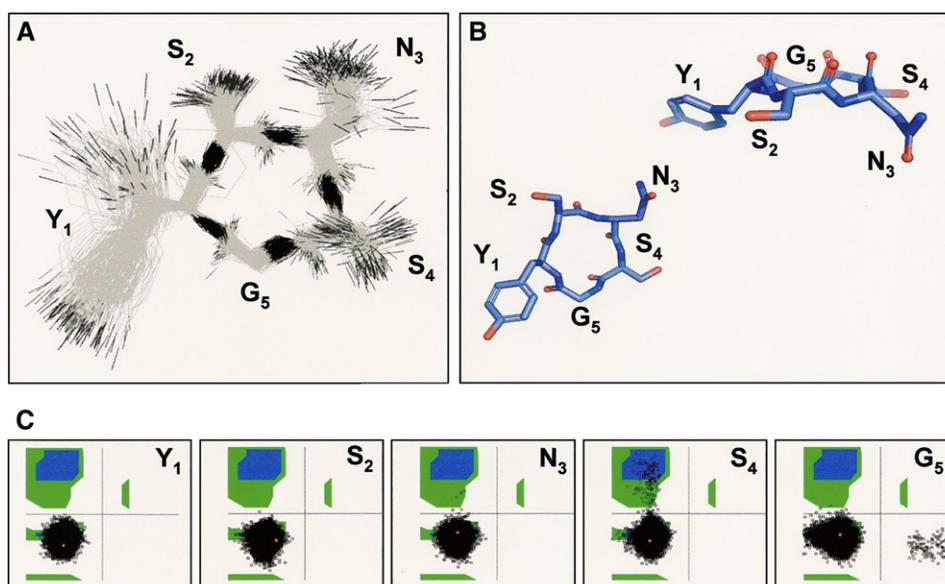


Figure 2. The Stable Structure of the YSNSG Cyclopeptide as Observed along the 20 ns Molecular Dynamics Trajectory

The simulation is performed in an explicit water box and shows a stable YSNS β turn.

(A) Flexibility of the peptide is reduced to the tyrosine side chain.

(B) The stable structure of the peptide, characterized by a YSNS β turn along the entire trajectory, presents the particularity to separate NH and C=O of its backbone on each of its sides, also preventing internal H bonds.

(C) Plotting the φ and ψ angles of the peptides shows that the five residues are often located in the α-helical region of the Ramachandran map, with mean φ/ψ of (−90°; −66°) for both serine S₂ and asparagine N₃ residues, making the YSNS tetrapeptide close to a type I β turn.

feature prevents the formation of backbone internal hydrogen bonds, in agreement with the NMR experimental data. The temperature coefficients of the amide protons of the peptide, which were recorded between 295K and 320K, failed to reveal any internal H bond, with values of −10.0, −4.6, −7.0, −4.6, and −6.1 ppb/K for Y₁, S₂, N₃,

S₄, and G₅, respectively (usually values < −4.5 ppb/K correspond to the absence of an H bond) (Figure S1). Thus, the peptide appears to be highly polarized, as shown by the electrostatic potential of the cyclopeptide (isovalues of +7.5 and −7.5 kT/e in blue and red, respectively). The charge distribution was computed by using

Distance (Å)

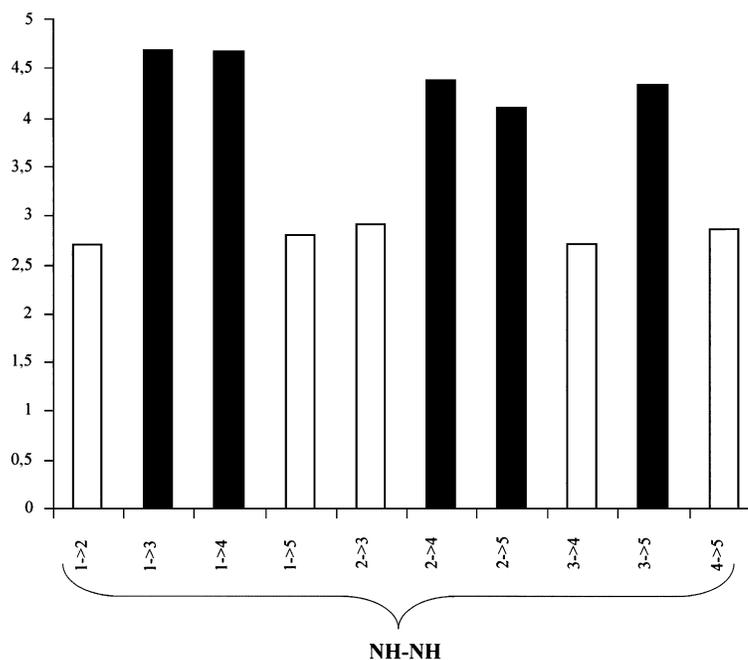


Figure 3. Comparison of Experimental and Theoretical Proton-Proton Distances of the YSNSG Cyclopeptide

The nOes experimentally obtained are reported in white and the theoretical in black. The mean proton-proton distances are extracted from trajectories of the molecular dynamic simulations performed on the YSNSG cyclopeptide.

the default parameters of the particle mesh Ewald method [14] as implemented in VMD [15]. Interestingly, the positive charges encompassed the side chains of the SNS residues that are known to be crucial for biological activity of the native peptide or its derivatives, a feature that may also be important for its binding to $\alpha V\beta 3$ integrin [16].

Secondary Structure Characterization by Electronic Circular Dichroism Spectroscopy

The circular dichroism (CD) spectra of the YSNSG cyclopeptide recorded at pH 7 and at various temperatures did not clearly demonstrate the presence of an ordered conformation. The same results were observed without adding any buffer, also keeping a pH of 3; this showed a poor sensitivity of the peptide to temperature and pH, probably due to its highly constrained conformation (data not shown). The observed CD shape is therefore not characteristic of any of the classical β -turn conformations (type I, type II, or type VIII); this is probably due to the distorted ϕ/ψ of the peptide as compared to a type I β turn.

NMR and molecular modeling results showed that the YSNSG cyclopeptide actually adopted the expected β -turn conformation on the YSNS residues. This conformation did not depend on temperature and pH, suggesting a higher stability than that of the native peptide. It also showed the particularity that all its peptide bonds are in *trans* conformation without any internal H bond; indeed, all its amine and carboxyl backbone groups were grouped on opposite sides of the peptide. This distribution pattern of electrostatic potential is an important feature that should be taken into consideration for the binding of the cyclopeptide to $\alpha V\beta 3$ integrin.

In the second part of the study, we compared YSNSG cyclopeptide biological activity to that of the native CNYYSNS peptide.

Effect of the YSNSG Cyclopeptide on UACC-903 Human Melanoma Cell Adhesion, Proliferation, and Migration

The native CNYYSNS peptide (NP7) and the YSNSG cyclopeptide (C5) promoted UACC-903 melanoma cell adhesion like the NC1[$\alpha 3(IV)185-203$] peptide (Figure 4A). Cell adhesion was inhibited by a preincubation of melanoma cells with an anti- $\alpha V\beta 3$ integrin antibody, whereas an anti- $\beta 1$ antibody had no effect (data not shown). This result confirms that, like NP7 [16], C5 interacts with $\alpha V\beta 3$ integrin. Competition assays demonstrated that, like the NC1[$\alpha 3(IV)185-203$] peptide [16], NP7 and C5 also inhibited the adhesion of UACC-903 cells to NC1[$\alpha 3(IV)185-203$]-coated culture plates. The treatment of melanoma cells with the NC1[$\alpha 3(IV)185-203$] also prevented their adhesion to both NP7 and C5. This result suggests that C5 binds to $\alpha V\beta 3$ integrin at the same site as the NP7 and NC1[$\alpha 3(IV)185-203$] peptides.

Tumor progression depends on cell proliferation and migration. The *in vitro* proliferation of UACC-903 human melanoma cells was significantly inhibited by the CNYYSNS peptide (−45%). The YSNSG cyclopeptide at 5, 10, and 20 μM also inhibited UACC-903 melanoma cell proliferation by 27%, 29%, and 40%, respectively (Figure 4B). The cyclopeptide was as efficient as the

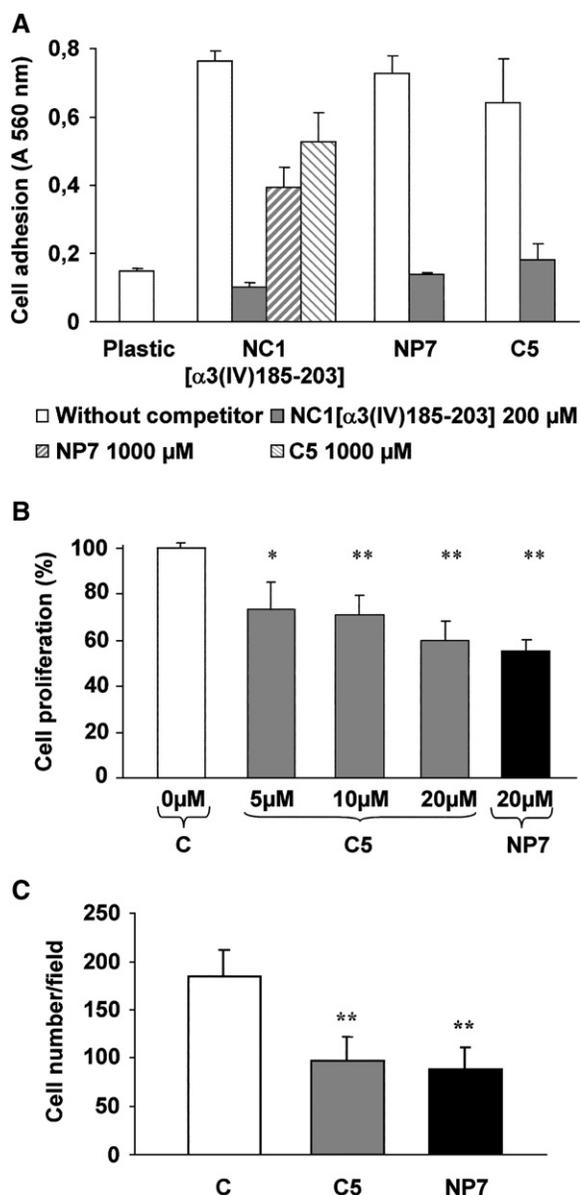


Figure 4. Effect of the YSNSG Cyclopeptide on UACC-903 Melanoma Cell Adhesion, Proliferation, and Migration

(A) UACC-903 melanoma cell adhesion is measured after nuclei staining with crystal violet. Cells are seeded onto plastic, native NC1[$\alpha 3(IV)185-203$] peptide-, native CNYYSNS peptide NP7-, or YSNSG cyclopeptide C5-coated plates with or without preincubation with competitors.

(B) UACC-903 cell proliferation is determined using WST-1 reagent. Cells are incubated in 24-well culture plates for 48 hr with either control medium (C), YSNSG cyclopeptide (C5), or CNYYSNS native peptide (NP7).

(C) UACC-903 cell invasion is assayed in modified Boyden chambers. After a 72 hr incubation period, migrated cells are stained with crystal violet and counted with an inverted microscope.

C, control; C5, YSNSG cyclopeptide (20 μM); NP7, CNYYSNS native peptide (20 μM).

*, significantly different from control at $p < 0.05$. **, significantly different from control at $p < 0.01$.

native peptide at the same concentration. The effect of the YSNSG cyclopeptide on UACC-903 cell migration through an *in vitro*-reconstituted basement membrane

was analyzed using Matrigel-coated membranes and 10% fetal calf serum as a chemoattractant. Migration was assessed after 72 hr. The YSNSG cyclopeptide (20 μ M) induced a 47% decrease of UACC-903 cell migration, similar to the CNYYSNS peptide at the same concentration (Figure 4C).

Effect of the YSNSG Cyclopeptide on Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors

The matrix metalloproteinase activation cascade is largely involved in ECM degradation.

No significant changes in MMP-2 and MMP-9 secretion were detected by gelatin zymography on cell media after incubation of the UACC-903 cells with either the YSNSG cyclopeptide or the native CNYYSNS peptide (data not shown).

Secretion of TIMPs into the conditioned culture medium was analyzed by reverse zymography. A dose-dependent increase in TIMP-2 secretion was observed in the cultures incubated with YSNSG cyclopeptide, as well as with CNYYSNS (Figure 5A). An ELISA measurement of TIMP-2 secretion also confirmed this result (data not shown). TIMP-1 and TIMP-3 secretion were not altered.

The YSNSG cyclopeptide strongly inhibited pro-MMP-14 expression, as demonstrated by western blot analysis (Figure 5B). Pro-MMP-14 activation was also completely abolished. The inhibitory effects of the cyclopeptide were of the same intensity as the native peptide. The treatment of UACC-903 cells with either the YSNSG cyclopeptide or the native CNYYSNS peptide also largely decreased the binding of pro-MMP-2 to tumor cell membrane and its activation (Figure 5C).

MMP-14 is able to degrade ECM (types I–III collagens, fibronectin, laminins, fibrin, gelatin, nidogen, and cartilage proteoglycan core proteins). It is inhibited by TIMP-2 [17]. In our model, TIMP-2 secretion was significantly increased by incubation with either the YSNSG cyclopeptide or the native CNYYSNS peptide. The expression and activation of MMP-14 were also strongly inhibited, leading to a large decrease in the activation of pro-MMP-2 associated with tumor cell membrane. This should explain, at least partially, the strong reduction in the invasive capacities of melanoma cells.

Effect of the YSNSG Cyclopeptide on the Plasminogen Activation System

Another proteolytic cascade involved in tumor invasion is the activation of plasminogen into plasmin by plasminogen activators u-PA and t-PA [6]. Secretion of u-PA and t-PA was analyzed by gelatin-plasminogen zymography (Figure 6A). Treatment of UACC-903 cells with the YSNSG cyclopeptide induced a dose-dependent decrease in both u-PA and t-PA secretion, up to –56% and –55%, respectively, more efficiently than the native CNYYSNS peptide (–40% and –48%, respectively). Secretion of PAI-1, the u-PA and t-PA inhibitor, was analyzed by western blot (Figure 6B). Treatment of UACC-903 cells with the YSNSG cyclopeptide (20 μ M) induced a 4.0-fold increase in PAI-1 secretion versus a 3.4-fold increase with the native CNYYSNS peptide at the same concentration.

Collectively, the inhibition of MMP-2/MMP-14 and plasminogen activation may explain most of the de-

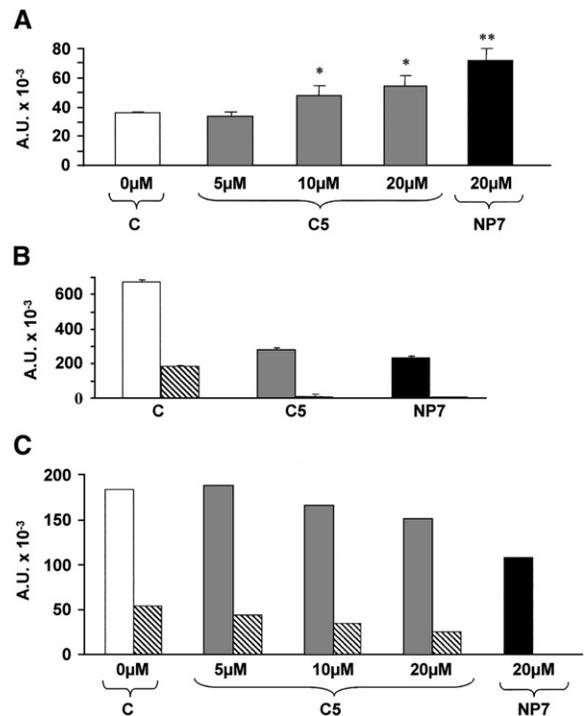


Figure 5. Effect of the YSNSG Cyclopeptide on the Pro-MMP-2 Activation Cascade

UACC-903 melanoma cells are incubated for 48 hr with control medium (C), YSNSG cyclopeptide (C5), or CNYYSNS native peptide (NP7).

(A) TIMP secretion is analyzed by reverse zymography on conditioned media.

(B) MMP-14 expression and activation in cell extracts are analyzed by western blot (pro-MMP-14, empty bars; MMP-14, hatched bars).

(C) Pro-MMP-2 activation in cell extracts is analyzed by gelatin zymography (pro-MMP-2, empty bars; MMP-2, hatched bars).

Quantifications are performed by densitometry using Bio-1D software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Results are expressed as arbitrary units (A.U.).

*, significantly different from control at $p < 0.05$. **, significantly different from control at $p < 0.01$.

crease in ECM degradation and the inhibition of in vitro tumor cell migration.

Inhibition of In Vivo Tumor Growth by the YSNSG Cyclopeptide

In previous studies [12], we demonstrated that the peritumor injection of the native CNYYSNS peptide inhibited tumor growth. In the current paper, we used other experimental conditions. Melanoma cells were subcutaneously injected into the left side of syngenic C57BL6 mice. Tumors appeared at day 6. Intraperitoneal injections of either native CNYYSNS peptide or YSNSG cyclopeptide were performed at day 6, 8, and 11 (10 mg/kg). Tumors were measured at day 14 (Figure 7). The YSNSG cyclopeptide inhibited tumor cells by 46% and the native CNYYSNS peptide by 27%, strongly suggesting that the cyclopeptide is more stable than the native peptide after systemic administration.

The design of cyclic RGD-containing peptides to antagonize α V β 3 integrin clearly demonstrated that cyclization confers to these peptides a large increase in

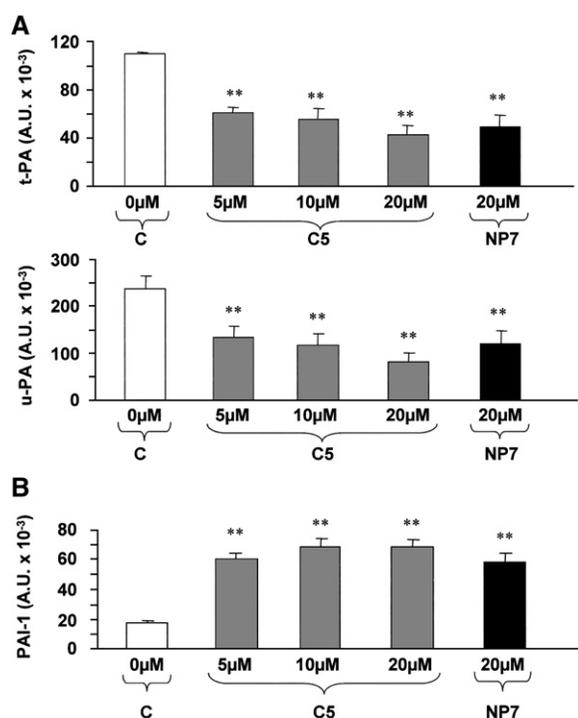


Figure 6. Inhibition of Plasminogen Activator Secretion by the YSNSG Cyclopeptide

UACC-903 melanoma cells are incubated for 48 hr with control medium (C), YSNSG cyclopeptide (C5), or CNYYSNS native peptide (NP7).

(A) u-PA and t-PA secretion into the conditioned media are analyzed by gelatin-plasminogen zymography.

(B) PAI-1 secretion into the conditioned media is analyzed by western blot.

Quantifications are performed by densitometry using Bio-1D software. Results are expressed as arbitrary units (A.U.).

**, significantly different from control at $p < 0.01$.

their resistance to proteolytic degradation and an improved bioavailability as reported in the literature [18–20]. This is in agreement with our results suggesting a higher stability of the YSNSG cyclopeptide versus the native CNYYSNS peptide. Our experimental data also confirmed that the binding of tumstatin-derived peptides to $\alpha V\beta 3$ integrin requires a β turn located on the YSNS residues. The tumstatin-derived peptides act as $\alpha V\beta 3$ integrin antagonists.

The cyclic conformation of the YSNSG peptide and its stability at low pH should suggest this peptide as a potent antitumor therapeutic agent which might be administered per os or intraperitoneally.

Significance

Increasing interest is presently devoted to specific domains of extracellular matrix macromolecules which are able to regulate cell activities (matrikines). Type IV basement membrane collagen was recently demonstrated to be a source of various matrikines which may play an important role in limiting cancer progression. The C-terminal noncollagenous NC1 domains from type IV collagen inhibit tumor invasion and/or angiogenesis in various cancer types. We previously dem-

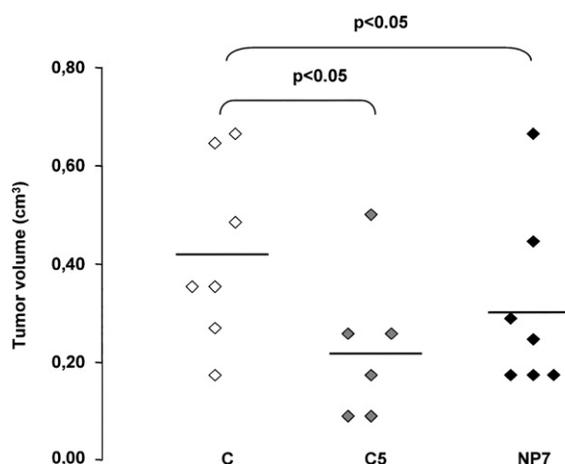


Figure 7. Inhibition of In Vivo Tumor Growth by the YSNSG Cyclopeptide

B16F1 cells are subcutaneously injected into syngenic C57BL6 mice (2.5×10^5 cells per mouse). Intraperitoneal administrations of either YSNSG cyclopeptide (C5) or CNYYSNS native peptide (NP7) (10 mg/kg) are performed at day 6, 8, and 11. Tumor volume is measured at day 14. Statistical significance is determined using the nonparametric u -test of Mann and Whitney.

onstrated that the CNYYSNS sequence from the NC1 domain of type IV collagen $\alpha 3$ chain inhibited tumor progression in an in vivo mouse melanoma model, through binding to $\alpha V\beta 3$ integrin. The YSNS residues formed a β turn crucial for biological activity. The aim of the present study was to design a YSNSG cyclopeptide with a constrained β turn on the YSNS residues, more active and stable than native CNYYSNS. By nuclear magnetic resonance and molecular modeling, we demonstrated that the YSNSG cyclopeptide actually adopted the expected β -turn conformation and inhibited melanoma cell proliferation and invasive properties as well as the native CNYYSNS peptide. Moreover, intraperitoneal administration of the YSNSG cyclopeptide after tumor development inhibited melanoma progression far more efficiently than the native peptide. The increased solubility and stability at low pH of the YSNSG cyclopeptide suggest that this peptide might be used as a potent antitumor therapeutic agent.

Experimental Procedures

Reagents

Culture reagents and molecular biology products were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Bovine serum albumin, gelatin, and Matrigel (ECM gel) were purchased from Sigma (St-Quentin Fallavier, France). Human plasminogen was from Calbiochem (VWR International, Strasbourg, France). Anti-human MMP-14 and anti-human $\alpha V\beta 3$ integrin antibodies (Chemicon, Euromedex, Souffelweyersheim, France) and anti-human PAI-1 antibody (American Diagnostica, Neuville sur Oise, France) were also used. The Biotrak ELISA evaluation kit of TIMP-2 and the enhanced chemiluminescence kit were from Amersham (Saclay, France).

Peptides

The native NC1[$\alpha 3$ (IV)185–191] CNYYSNS peptide was obtained by solid-phase synthesis using an FMOC derivative procedure and was further purified by reverse phase HPLC with a C18 column by elution with a gradient of acetonitrile in trifluoroacetic acid, and

then lyophilized [12]. The synthesized YSNSG cyclopeptide was purchased from Ansynth Service B.V. (Roosendaal, The Netherlands). The native NC1[α 3(IV)185–203] peptide was from Covalab (Oullins, France). For the determination of biological activities, the peptides were extemporaneously dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO); the final DMSO concentration was lower than 0.2% (v/v) in all experiments.

NMR

All NMR spectra were recorded on a Bruker DRX 500 spectrometer (Bruker, Wisssembourg, France). The sample was dissolved in a 9:1 D₂O:H₂O mixture. TSP-*d*₄ was used as an internal chemical shift standard. Water proton signals were suppressed by the WATERGATE sequence. The chemical shift dependence of amide protons was studied at 294K, 300K, 305K, 310K, 315K, and 320K. The identification of the spin systems was achieved by analysis of the TOCSY spectrum (200 ms mixing time, mlevdpst19 pulse sequence). The classification of interproton distances was drawn from the NOESY spectrum (350 ms mixing time, noesygpst19 pulse sequence). The acquisition matrix of the latter contained 512 × 2048 data points, extended to 1024 × 4096 by zero filling. A cosine-squared apodization function was applied in both dimensions prior to 2D Fourier transformation.

Circular Dichroism

CD spectra of the YSNSG cyclopeptide were recorded on a JASCO J-810 CD spectropolarimeter (JASCO France, Bouguenais, France) equipped with a PTC-623S Peltier temperature control system by using a cell of 0.2 mm optical path length. The peptide was dissolved at a concentration of 400 μ M either in water (pH 3) or in a 20 mM potassium phosphate buffer to bring the solution to pH 7. Three scans were accumulated in the spectral range of 190–250 nm at a temperature of 0°C, 20°C, 37°C, and 50°C by taking points every 0.1 nm.

Random Conformational Search of the YSNSG Cyclopeptide

We performed a random conformational search of the structure of the YSNSG cyclopeptide under NMR data constraints, in implicit water solvent, with a distance-dependent dielectric constant, by using the CHARMM program and force fields (PARAM set 22) [21, 22]. The geometrical distances corresponding to our experimentally observed nOes were constrained to be in the range of 2.0–4.0 Å. Additionally, distances between amide protons of the backbone that did not correlate were constrained to be in the range of 4.0–8.0 Å. Because we did not observe any H α -H α correlations in the NOESY spectrum (data not shown), all the peptide bonds were also constrained to be in *trans* conformation ($\omega \sim 180^\circ$); finally, and in agreement with the Karplus relation modified by Pardi et al. [23], the ϕ angles of the two serine residues (S₂ and S₄) were also constrained around $-120^\circ \pm 30^\circ$ according to $^3J(N_H-H_\alpha)$ constant coupling values of 8.2 and 8.8 Hz, respectively (other residues shared values between 5.0 and 7.0 Hz).

At each step of our random conformational search protocol, we randomized all the backbone dihedral angles of the peptide and minimized the corresponding structure according to the NMR constraints described above. Each generated model was minimized using both Steepest Descent and Adopted Based Newton Raphson algorithms until an energy gradient of 10⁻⁵ kcal/mol was reached. Three fully independent runs of 1000 steps were performed by changing the initial seed of the random number generator. Finally, the 3000 generated minimized structures were grouped for analysis.

Molecular Dynamics Simulations

First, both the YSNSG linear and cyclopeptides were studied through MDS in water implicit solvent. The surface-accessible solvent area (SASA) model was used as a solvation model [24]. The solvent effect on the peptide included the EEF1 (energy effective function) model proposed by Lazaridis and Karplus [25]. Then, the peptides were studied in explicit solvent.

For the linear peptide, the starting point of the two MDSs was a fully extended conformation; for the cyclopeptide, the MDS started from the minimum energy conformations that were obtained either just after cyclization of the linear peptide or by the random conformational search described above. For MDS in explicit solvent, each peptide was first embedded in a water box ensuring 8 Å of

water (TIP3P) on each of their sides. The systems were then energy minimized by 2000 steps of conjugate gradient and brought to room temperature (300K) by using the NAMD program [26, 27]. The two simulations were performed in the number of particles, pressure, and temperature (NPT) ensemble (1 atm; 300K) using the Verlet algorithm and an integration step of 10⁻¹⁵ s. Electrostatic interactions were treated by applying a switch function to the classical potential between 10 Å and 12 Å (cutoff value). A conformational analysis was performed on the full-length simulations that reached 20 ns, extracting the structures of the peptides each 10 ps of the trajectories. These models were grouped into a reduced number of clusters using NMRCLUST software [28] and a threshold of 2.5 Å for the clustering cutoff.

Animals

Female C57BL6 mice (average body weight, 18–20 g) were purchased from Harlan France (Gannat, France). Animals were individually caged and given food and water ad libitum. They were kept in a room with constant temperature and humidity. All mice were acclimatized to our laboratory conditions for 1 week before starting the experiments. The *in vivo* experiments were conducted according to the recommendations of the Centre National de la Recherche Scientifique.

Cell Cultures

B16F1 cells, a lung metastatic subline of murine B16 melanoma, were a generous gift from Dr. M. Grégoire (INSERM U419, Nantes, France). UACC-903 cells, a melanoma cell line, were from Dr. J. Trent (Georgetown University Medical Center, Washington, DC). B16F1 cells were cultured in RPMI 1640 and UACC-903 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glucose 4.5 g/l, both supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) in 25 cm² flasks (Nunclon, Dutscher, Brumath, France) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Cell Adhesion and Proliferation Measurements

Cell adhesion was measured on peptide-coated 96-well plates (Immunosorb, Nunclon, Dutscher, Brumath, France). Peptides were dissolved in DMSO and diluted in carbonate buffer (pH 10.0) and deposited onto 96-well plates at 4°C under sterile conditions. Cell adhesion was evaluated by absorbance at 560 nm after nuclei staining with crystal violet. For competition assays, cells were preincubated for 15 min with the competing peptides and then deposited onto peptide-coated 96-well plates as described above.

Cell proliferation was determined using WST-1 reagent according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France). In all experiments, cell viability was greater than 98%, as assessed by trypan blue exclusion.

In Vitro Invasion Assays

Invasion was assayed in modified Boyden chambers (ThinCert, tissue culture insert for 24-well plates, 8.36 mm inner diameter, 8 μ m pore, Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France) as previously described [11].

Zymography Analyses

Cell Incubation with the Peptides

At subconfluence, cells were washed twice with phosphate-buffered saline to remove residual FBS and incubated for 48 hr in DMEM, with or without the peptides, at concentrations ranging from 0 to 20 μ M. Conditioned media were harvested and centrifuged at 500 × g for 10 min at 4°C to remove cellular debris. Protein contents of the media were determined by the Bradford method, using bovine serum albumin as a standard [29].

Gelatin Zymography

The expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 in conditioned media or in cell membrane extracts of UACC-903 cells, treated or not with the peptides, were analyzed by gelatin zymography as previously described [11].

The secretion of TIMP-2 was analyzed on UACC-903-conditioned media by reverse gelatin zymography as previously described [11]. TIMP-2 secretion was also measured using a Biotrak ELISA kit, according to the manufacturer's instructions.

Gelatin-Plasminogen Zymography

For the determination of plasminogen activators, UACC-903-conditioned media were analyzed on SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin and 10 µg/ml plasminogen as previously described [30].

Western Blot Analysis

Samples were electrophoresed in a 0.1% SDS, 10% polyacrylamide gel. They were then transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore, St Quentin en Yvelines, France). The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk, 0.1% Tween 20 in a 50 mM Tris-HCl buffer, 150 mM NaCl (pH 7.5) (TBS) for 2 hr at room temperature and incubated overnight at 4°C with anti-MMP-14 or anti-PAI-1 antibody and then for 1 hr at room temperature with a second peroxidase-conjugated anti-IgG antibody. Immune complexes were visualized with the enhanced chemiluminescence detection kit.

In Vivo Tumor Growth Measurement

Suspensions of B16F1 cells (2.5×10^5 cells in 0.1 ml RPMI 1640 medium) were subcutaneously injected into the left side of different series of syngenic C57BL6 mice. Tumors appeared at day 6 and intraperitoneal administrations of peptides were performed at day 6, 8, and 11. Tumor sizes were measured every 2 days. Tumor volume was determined according to $v = 0.5 A \times B^2$, where A denotes the largest dimension of the tumor and B represents the smallest dimension [31].

Statistical Analyses

All in vitro experiments were done in quadruplicate. Statistical analyses were performed by Student's t test. Results were expressed as mean \pm 1 standard deviation. For in vivo experiments, volumes of primary tumors were statistically analyzed using the nonparametric *u*-test of Mann and Whitney and the parametric Student's t test paired with weight-matched mice.

Supplemental Data

Supplemental Data include one figure and can be found with this article online at <http://www.chembiol.com/cgi/content/full/13/12/1307/DC1/>.

Acknowledgments

The authors thank D. Patigny and J.Y. Laronze (CNRS FRE 2715, UFR Pharmacie, Reims) for their expertise in synthesis of the native CNYYSNS peptide. They also thank S. Gobert (University of Reims Champagne-Ardenne) for improving the English language of the manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 6198), the University of Reims Champagne-Ardenne, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Association Régionale pour l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique et Technologique en Champagne-Ardenne (ARERS-Verre Espoir), the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comités de l'Aisne et de la Haute-Marne), and the Canceropole Grand Est.

Received: July 25, 2006

Revised: October 12, 2006

Accepted: October 13, 2006

Published: December 22, 2006

References

- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.
- Hofmann, U.B., Houben, R., Bröcker, E.B., and Becker, J.C. (2005). Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* 87, 307–314.
- Itoh, Y., and Seiki, M. (2006). MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J. Cell. Physiol.* 206, 1–8.
- Seiki, M. (2003). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett.* 194, 1–11.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P., and Chesh, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha v \beta 3$. *Cell* 85, 683–693.
- Andreasen, P.A., Egelund, R., and Petersen, H.H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 25–40.
- Monea, S., Lehti, K., Keski-Oja, J., and Mignatti, P. (2002). Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 192, 160–170.
- Sado, Y., Kagawa, M., Naito, I., Ueki, Y., Seki, T., Momota, R., Ohashi, T., and Ninomiya, Y. (1998). Organization and expression of basement membrane collagen IV genes and their roles in human disorders. *J. Biochem. (Tokyo)* 123, 767–776.
- Ortega, N., and Werb, Z. (2002). New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* 115, 4201–4214.
- Maeshima, Y., Colorado, P.C., Torre, A., Holthaus, K.A., Grunke-meyer, J.A., Ericksen, M.B., Hopfer, H., Xiao, Y., Stillman, I.E., and Kalluri, R. (2000). Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J. Biol. Chem.* 275, 21340–21348.
- Pasco, S., Han, J., Gillery, P., Bellon, G., Maquart, F.X., Borel, J.P., Kefalides, N.A., and Monboisse, J.C. (2000). A specific sequence of the noncollagenous domain of the $\alpha 3(IV)$ chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells. *Cancer Res.* 60, 467–473.
- Floquet, N., Pasco, S., Ramont, L., Derreumaux, P., Laronze, J.Y., Nuzillard, J.M., Maquart, F.X., Alix, A.J.P., and Monboisse, J.C. (2004). The antitumor properties of the $\alpha 3(IV)$ -(185–203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent. *J. Biol. Chem.* 279, 2091–2100.
- Fuchs, P.F.J., and Alix, A.J.P. (2005). High accuracy prediction of β -turns and their types using propensities and multiple alignments. *Proteins* 59, 828–839.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L.G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* 103, 8577–8593.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38, 27–28.
- Pasco, S., Monboisse, J.C., and Kieffer, N. (2000). The $\alpha 3(IV)$ 185–206 peptide from noncollagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the $\beta 3$ subunit of integrin $\alpha V \beta 3$ and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 32999–33007.
- Sato, H., Takino, T., and Miyamori, H. (2005). Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci.* 96, 212–217.
- Kim, J., Hong, S.Y., Park, H.S., Kim, D.S., and Lee, W. (2005). Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins. *Mol. Cells* 19, 205–211.
- Buerkle, M.A., Pahernik, S.A., Sutter, A., Jonczyk, A., Messmer, K., and Dellian, M. (2002). Inhibition of the αv integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br. J. Cancer* 86, 788–795.
- Haier, J., Goldmann, U., Hotz, B., Runkel, N., and Keilholz, U. (2002). Inhibition of tumor progression and neoangiogenesis using cyclic RGD-peptides in a chemically induced colon carcinoma in rats. *Clin. Exp. Metastasis* 19, 665–672.
- Brooks, B.R., Brucoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983). CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* 4, 187–217.
- Mackereel, A.D., Jr., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Jr., Evanseck, J.D., Field, M.J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., et al. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* 102, 3586–3616.
- Pardi, A., Billeter, M., Jr., and Wuthrich, K. (1984). Calibration of the angular dependence of the amide proton-C α proton coupling constants, $^3J_{HN \alpha}$, in a globular protein. Use of $^3J_{HN \alpha}$ for identification of helical secondary structure. *J. Mol. Biol.* 180, 741–751.

24. Ferrara, P., Apostolakis, J., and Caffisch, A. (2002). Evaluation of a fast implicit solvent model for molecular dynamics simulations. *Proteins* 46, 24–33.
25. Lazaridis, T., and Karplus, M. (1999). Effective energy function for proteins in solution. *Proteins* 35, 133–152.
26. Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., and Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802.
27. Kalé, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Gursoy, A., Kravetz, N., Phillips, J., Shinozaki, A., Varadarajan, K., and Schulten, K. (1999). NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comput. Phys.* 151, 283–312.
28. Kelley, L.A., Gardner, S.P., and Sutcliffe, M.J. (1996). An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies. *Protein Eng.* 9, 1063–1065.
29. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
30. Pasco, S., Ramont, L., Venteo, L., Pluot, M., Maquart, F.X., and Monboisse, J.C. (2004). In vivo overexpression of tumstatin domains by tumor cells inhibits their invasive properties in a mouse melanoma model. *Exp. Cell Res.* 307, 251–265.
31. Wald, M., Olejar, T., Sebkova, V., Zadinova, M., Boubelik, M., and Pouckova, P. (2001). Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. *Cancer Chemother. Pharmacol. Suppl.* 47, S16–S22.