Université de Reims Champagne Ardenne Université de Tunis El Manar

Thèse en Co-tutelle Présentée pour l'Obtention du titre de

Docteur

de L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE - ARDENNE et de L'UNIVERSITE DE TUNIS EL MANAR Spécialité: Biochimie et Biologie Cellulaire

Soutenue publiquement 26 Octobre 2010 Par

Aïda Toubel

EFFET ANTI-TUMORAL ET ANTI-ANGIOGENIQUE DU DOMAINE NC1 DU COLLAGENE XIX: CARACTERISATION DE LA SEQUENCE MINIMALE ACTIVE ET ETUDE DU MECANISME D'ACTION

Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire CNRS UMR 6237, UFR Médecine de Reims

Laboratoire de Génétique, d'Immunologie et de Pathologies Humaines Faculté des Sciences de Tunis

Membres du jury:

Rapporteurs:	Monsieur le Docteur Bernard Coulomb (Paris) Monsieur le Professeur Abderraouf Kenani (Monastir)
Examinateurs:	Madame le Professeur Jeannette Ben Hamida (Tunis) Monsieur le Professeur Philippe Humbert (Besançon)
Directeurs de thèse:	Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart (Reims) Madame le Professeur Amel Ben Ammar El Gaaïed (Tunis)

A mes parents A mes soeurs

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein du laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire de l'unité CNRS 6237 Médyc, IFR 53 intéractions Cellules-Microenvironement de l'UFR de Médecine de Reims dirigé par le Professeur François-Xavier Maguart.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart qui a supervisé ce travail de thèse, pour m'avoir acceuillie au sein du laboratoire et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleurs conditions qui soient.

Merci pour votre gentillesse, vos conseils, votre rigueur scientifique et merci pour votre aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie le Docteur Laurent Ramont pour son co-encadrement, sa disponibilité et ses conseils scientifiques durant ces quatre ans de thèse.

Je remercie Madame le Professeur Amel Ben Ammar El Gaaïed de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer une thèse dans le cadre d'une Co-tutelle. Merci pour votre gentillesse.

Je remercie Monsieur le Docteur Bernard Coulomb ainsi que Monsieur le Professeur Abderaouf Kenani d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Merci à Monsieur le Professeur Philippe Humbert et Madame le Professeur Jeannette Ben Hamida pour votre participation à ce jury en tant qu'examinateurs.

Je tiens à remercier le Docteur Christine Terryn pour son aide en vidéomicroscopie. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Je remercie le Docteur Stéphane Brézillon pour sa disponibilité lors des manipulations d'immunocytochime, sa gentillesse et ses conseils scientifiques.

Je remercie également Monsieur le Professeur Philppe Gillery, Mesdames et Monsieur les Docteurs Jean Claude Monboisse, Didier Marot, Sylvie Brassart-Pasco, William Hornebeck, Frank Antoniocelli, Georges Bellon, Roselyne Garnetel, et Yanusz Wegrowski, pour leurs multiples conseils et remarques au cours des réunions ou discussion au sein du laboratoire. Je remercie tous le personnel du laboratoire Mesdames Catherine Lejeune pour sa gentillesse et sa disponibilité, Corrine Perreau, Martine Decarme, Christéle Sellier, Isabelle Proult, Aurélie Dupont-Déshorgue et Johana Lorin.

Je témoigne ma reconnaissance à l'Institut Français de Coopération de Tunis pour le financement de mes séjours à Reims. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'accéder au domaine de la recherche à l'étranger et de vivre cette belle aventure.

Je remercie Madame Imen Annabi assistante de coopération et responsable des bourses à l'Institut Français de Coopération à Tunis (Ambassade de France à Tunis). Merci pour votre accueil, votre disponibilité et votre gentillesse au cours de nos entretiens de chaque année. Merci pour votre soutien.

Je tiens à remercier Madame Sylvie Periquet responsable des Relations Internationales au C.R.O.U.S de Reims. Merci pour votre accueil, votre disponibilité et votre grande gentillesse. Merci pour tous.

Je remercie tous les nouveaux amis connus ici à Reims qui ont rendu cette belle aventure plus agréable.

Souad, Lamia, Nadia et Georges: Un grand merci pour les bons moments partagés, votre bonne humeur, votre disponibilité, votre aide et soutien morale. Merci d'avoir supporté mes états d'âme !!!

Karine ma collégue de bureau, je te souhaite beaucoup de courage pour ta dernière année de thèse et que tous tes projets seront une réalité.

Je vous souhaite à tous un bon courage pour la fin de vos thèse et que cette amitié ne s'arrêtera pas ici à Reims.

Je ne peux en finir que par dédier cette thèse de doctorat à mes parents et à mes sœurs qui ont toujours cru en moi. Même si la distance nous a séparés, vous étiez tous les jours présent avec moi par vos coups de téléphone durant ces quatre ans pour m'encourager, me soutenir et me pousser vers l'avant. Merci pour votre aide. Je vous aime.

Sommaire

<u>Sommaire</u>

Liste des illustrations	1
Liste des abréviations	5
Liste des publications et communications	6
A- Introduction	7
I- Le mélanome	9
I-1-La peau	9
I-2- Caractéristiques du mélanome malin	11
I-2-1- Epidémiologie	11
I-2-2- Facteurs de risques.	12
I-2-2- I-Facteurs intrinseques	12
I-2-2-2- Facteurs extrinseques I-2-3-Diagnostic et classification	13 13
I-2-4-Traitement du mélanome	18
I-2-5- Progression du mélanome et métastases	19
1-2-6- La migration cellulaire	20
II- L'angiogenése tumorale	22
III- Les Métalloprotéinases Matricielles	24
III-1- Structure des MMPs	24
III-2- Classification des MMPs	27
III-3- Mécanisme d'activation des MMPs	30
III-3-1- Mécanisme d'activation de la pro-MMP-2	31
III-4- Inhibition de l'activité des MMPs	32
III-5- Les MMPs dans la progression tumorale	33
III-6- Implication des MMPs dans la progression du mélanome	35
IV- Systéme plasmine / plasminogéne	37
IV-1- La plasmine	51
IV-2- Le plasminogéne	37
IV-3- L'activateur du plasminogéne de type urinaire (u-PA)	38
IV-4- Le récepteur membranaire de u-PA: u-PAR	38
IV-5- L'activateur du plasminogéne de type tissulaire (t-PA)	39
IV-6- Les inhibiteurs du système plasmine / plasminogéne	39

V- Les collagènes	40
V- 1- Généralités V-2- Classification des collagènes	40 42
V-3- Les collagènes associés aux fibrilles à triple hélice interrompue (FACITs)	46
VI- La membrane basale	48
VI-1- Les constituants de la membrane basale	49
VI-1-1- Les glycoprotéines	49
VI-1-2- Les protéoglycanes	51
VI-1-3- Les collagènes liées aux membranes basales	52 52
VI-1-3-1- Le collagène de type IV	52 54
VI-1-3-3-Le collagène de type XVIII	55
VI-1-3-4- Le collagène XIX	56
VI-1-3-4-1-Découverte et description du collagène XIX	56
VI-1-3-4-2-Structure du collagène XIX	57
VI-1-3-4-3-Localisation et répartition tissulaire	58
V-1-3-4-4-Comparaison avec les autres types de collagène	59
VII-Rôle des domaines NC1 des collagènes liés aux membranes basales	60
VII-1- Les domaines NC1 du collagène IV	60
VII-2- Les domaines NC1 du collagène XVIII : l'endostatine	61
VII-3- Les domaines NC1 du collagène XV : la restine	61
B-Matériels et méthodes	62
I-Matériels et Réactifs	62
I-1- Liste des Réactif, matériels et fournisseurs	62
I-2- Souches cellulaires utilisées	65
I-3- Peptides utilisés	65
II- Méthodes	66
II-1- Culture de cellules tumorales	66
II-2- Culture de cellules endothéliales	66
II-3- Congélation cellulaire	66
II-4- Etude de la prolifération cellulaire	66
II-4- 1- Comptage Cellulaire	66
II-4- 2- Colorimétrie avec réactif WST-1 [®]	67
II-5- Etude de la migration cellulaire : Modéle de blessure artificielle	67
II- 5-1- Modèle de blessure artificielle par cône de pipette	67
II-5-2- Modèle de blessure artificielle par les inserts de culture Ibidi®	68
II-5-5- Dispositif d acquisition des images par videomicroscopie	09 70
II-5-4- Analyse de la migration cellulaire en 2 dimensions (2D) II-6- Etude de l'adhésion cellulaire	70 70

II-7- Etude de l'angiogenése in vitro : Formation de pseudotubes sur Matrigel® II-8- Méthodes d'étude in vivo	70 71
II-8-1- Modèle animal de mélanome murin	71
II-8-2- Induction tumorale et traitement intra-péritonéal (i.p.)	71
II-9- Extraction des protéines à partir des tissus tumoraux	71
II-10- Dosage des protéines	72
II-11-Immunodétection: Western Blot	72
II-12- Etude des protéases par zymographie	73
II-11-1- Zymographie en gel de gélatine	73
II-11-2- Zymographie en gel de gélatine/plasminogène	74
II-11-3- Zymographie inversée	74
II-13- Etude d'immunocytochimie	74
II-14- Tests statistiques	75
	76
C- Résultats	
I- Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différentes séquences	
peptidiques dérivés sur la croissance tumorale in vivo	77
II- Effets du domaine NCI du collagene XIX et ses différents peptides sur	=0
l'expression des proteinases dans les tumeurs in vivo	78
II-1- Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différents peptides sur	
l'expression de la MT1-MMP in vivo	78
II-2- Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression des MMP-2 et 9 et des	
TIMPs in vivo	79
II-3- Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression d'activateurs du	
plasminogéne in vivo	80
III Ffeed des desserves NG1 des estes VIV et ses d'fferendes sesserves des d'attaines	
III- Effet du domaine NCI du collagene XIX et ses différents peptides derives	01
III 1. Collulos do málonomo P16E1	01 Q1
III-1- Centries de Inclanome B1011	01
III-1-1- Etude de la prolifération cellulaire	81
III-1-2- Etude de la migration cellulaire	82
III-1-3- Etude de l'adhésion	83
III-2- Cellules de mélanome B16F10.	84
III-2-1- Etude de la prolifération cellulaire des cellules B16F10	84
III-2-2- Etude de la migration des cellules B16F10 en présence de NC1(XIX) et ses	
séquences peptidiques dérivées	85
III-2-2-1- Fermeture de la blessure artificielle à 48 heures	85
III-2-2-2- Effet d'une addition de peptide P10 frais à la 12éme heure sur la migration	
des cellules B16F10	86
III-2-2-3- Etude de la migration des cellules B16F10 en présence de NC1(XIX) à	
Concentrations croissantes	88
III-2-2-4- Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression de la	
MMP2/MMP- 9 dans les cellules B16F10 en culture	90
III-2-3- Etude de la migration cellulaire par vidéomicroscopie	90

III-2-3-1- Analyse de la migration en 2 dimensions (Q mig-2D)	92
III-2-3-1-1- Analyse des trajectoires de migration III-2-3-1-2- Analyse des positions des cellules au cours de la migration	92 93
III-2-3-1-3- Analyse de la distance de migration III-2-3-1-4- Analyse de la vitesse de migration III-2-4- Etude d'autres peptides dérivés du domaine NC1 (XIX) sur les cellules	95 96
III 2 - 1 - Etude de la prolifération cellulaire.	97 97
III-2-4-2- Etude de la migration des cellues B16F10	98
IV-Effet du peptide P19 muté (P19m) sur les cellules cancéreuses B16F10 in vitro.	100
IV-1- Etude de la prolifération cellulaire IV-2- Etude de la migration cellulaire	100 101
 V- Effet de NC1 (XIX) et ses différentes séquences peptidiques P10 sur les cellules de mélanome humaines in vitro V-1- Cellules de mélanome humain: UACC 903 	103 103
V-1-1-Etude de la prolifération cellulaire	104
V-1-2- Etude de la migration cellulaire	105
V-1-2-1- Fermeture de la blessure artificielle V-1-2-2- Etude de la migration des cellules UACC 903 en présence de NC1(XIX) à Concentrations croissantes	105 107
VI- Effets du domaine NC1(XIX) sur les cellules endothéliales humaines	108
VI-1- Etude de la prolifération cellulaire VI-2- Etude de la migration cellulaire par vidéomicroscopie	108 109
VI-2-1- Analyse de la migration des cellules HUVECs en vidéomicroscopie (Qmig-	
2D) VI-2-1-1- Analyse des trajectoires de migration VI-2-1-2- Analyse des positions de migration	111 111 113
 VI-2-1-3- Analyse de la distance de migration. VI-2-1-4- Analyse des vitesses de migration. VI-3- Effets de NC1(XIX) et son peptide dérivé P10 sur la formation de pseudotubes. 	114 115 115
VII- Effet de NC1(XIX) sur l'organisation du cytosquelette cellulaire VII-1- Cellules tumorales B16F10	117 117
VII-2- Cellules endothéliales:HUVEC	119
D- Discussion	120
E- Conclusion et perspectives	130
F- Bibliographie	132

Liste des illustrations

Liste des figures

- Figure 1: - Figure 2: - Figure 3:	Structure de la peau Mélanome remplissant les critères ABCDE Classification du mélanome selon l'indice de Clark	10 14 15
- Figure 4:	Classification du mélanome selon l'indice de Breslow	16
- Figure 5:	Modèle de mélanome selon les indices de Clark et Breslow	17
- Figure 6:	Les différentes étapes de la progression tumorale	19
- Figure 7: - Figure 8: - Figure 9 :	La migration d'une cellule cancéreuse Néo-angiogenèse tumorale Organisation moléculaire des MMPs	21 23 26
- Figure 10:	Mécanisme d'activation des métalloprotéinases matricielles	30
- Figure 11:	Modèle d'activation de la pro-MMP2 par l'intermédiaire de la MT1- MMP	31
- Figure 12:	Expression de la MMP-2 et de la MT1-MMP par les cellules tumorales et stromales au front d'invasion de la tumeur	36
- Figure 13:	Structure de uPAR lié à une molécule d'uPA	38
- Figure 14:	Structure d'une molécule typique de collagène	41
- Figure 15:	Structure des différents types de collagènes	43
- Figure 16:	Structure des chaînes α des collagénes de la famille des FACITs	47
- Figure 17:	Structure des laminines. Les trois chaînes (α , β et γ) reliées par des ponts disulfures	49
-Figure 18 :	Liaison entre une chaîne de GAG et le noyau protéique dans une	
- Figure 19:	Structure de du collagène IV et mode de polymérisation	51 53
Figure 20:Figure 21:Figure 22:Figure 23:	Structure de la chaîne $\alpha 1$ du collagène XV Structure des chaînes α_1 du collagène XVIII Structure de la chaîne α_1 du collagène XIX Modèle de la blessure artificielle par les inserts (Ibidi)	54 55 57 68
- Figure 25:	Composition en acides aminés des différents peptides dérivés de	76
-Figure 26:	Inhibition de la croissance tumorale in vivo en présence des différents peptides du domaine NC1 (XIX)	70
- Figure 27:	Expression de l'activité de la MT1-MMP dans les extraits de tumeurs obtenues après injection de cellules B16F1 chez les souris contrôles ou traitées par NC1(XIX) ou ses peptides dérivés P10, P8, P6	78

- Figure 28:	Effet du domaine NC1(XIX) et ses peptides dérivés sur la sécrétion de MMP-2/MMP-9 et des TIMPS	79
- Figure 29:	Effet du domaine NC1(XIX) sur l'expression de l'activateur du plasminogéne uPA dans les extraits de tumeurs de souris traitées par	
- Figure 30:	NC1(XIX) Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différentes séquences peptidiques dérivées sur la prolifération des cellules de mélanome B16F1 après 48 heures et à différentes concentrations (30µmol/L, 60µmol/L,	80
- Figure 31:	120μmol/L) Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différentes séquences peptidiques sur la migration des cellules B16F1 après 48h et à la concentration de 30μmol/ L	81
- Figure 32:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ces différentes séquences Peptidiques sur l'adhésion des cellules B16F1 après 48h et à la	02
- Figure 33:	concentration de 30µmol/L Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé sur la prolifération des cellules B16F10 après 24 et 48h à la concentration de	83
- Figure 34:	Bigration des cellules B16F10 après 48h à la concentration de30µmol/L.	84 85
- Figure 35:	Effet du peptide P10 dérivé du domaine NC1 (XIX) sur la migration des cellules B16F10 après 24h et à la concentration de 30µmol/L (Ajout de peptide frais dans le milieu après 12h)	87
- Figure 36:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la migration des cellules B16F10 après 24h à la concentration de 30, 60, et 120µmol/L	89
- Figure 37:	Effet du domaine NC1(XIX) à différentes concentrations sur la sécrétion de MMP-2/MMP9	90
- Figure 38:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide P10 sur la migration des cellules B16F10 après 24h à la concentration de	0.1
- Figure 39:	30µmol/L. Trajectoire de migration des cellules B16F10 en présence et absence du NC1(XIX) et son peptide dérivé P10 à la concentration de	91
- Figure 40:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur les positions X et Y des cellules B16F10 à la	93
- Figure 41:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur la distance de migration des cellules B16F10	94 95
- Figure 42:	Effet des peptides P1, P2, P3 du domaine NC1(XIX) sur la prolifération des cellules B16F10 à la concentration de 30µmol/L	97
- Figure 43:	Effet des peptides P1, P2, P3 du domaine NC1 du collagène XIX sur la migration des cellules B16F10 à la concentration de 30µmol/L	99
- Figure 44:	Effet du peptide P19m sur la prolifération des cellules B16F10 à la concentration de 30µmol/L	10
- Figure 45:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et du peptide muté (P19m) à 30µM sur la migration des cellulesB16F10	102
- Figure 46:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la prolifération des cellules UACC903 à la concentration de30µmol/L	104

- Figure 47:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la migration des cellules UACC903 à la concentration de 30µmol/L	106
- Figure 48:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la migration des cellules UACC903 à la concentration de 30µmol/L et 60µmol/L	107
- Figure 49:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la prolifération des cellules HUVEC à la concentration de 30µmol/L	107
- Figure 50:	Inhibition de la migration des cellules HUVEC par le domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10	110
- Figure 51:	Trajectoire des cellules HUVECs en absence (ctrl) et en présence du domaine NC1(XIX) ou de son peptide dérivé P10 à la concentration de	113
- Figure 52:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 (30µmol/L) sur les positions des cellules HUVECs en X et Y	114
- Figure 53:	au cours de la migration Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur la distance de migration des cellules HUVECs	113114
- Figure 54:	Effet de NC1 XIX et du peptide dérivé P10 sur la formation de pseudotubes des cellules HUVECs cultivées sur matrigel ®	116
- Figure 55:	Effet du peptide NC1(XIX) sur l'organisation du cytosquelette des cellules B16F10 après 24 heures d'incubation à la concentration de 120µmol/I	118
- Figure 56:	Effet du peptide NC1(XIX) sur l'organisation du cytosquelette des cellules HUVECs après 24 heures d'incubation à la concentration de 30	110
	et 60 μmol/L	119
- Figure 57:	Voies de signalisation activées au cours de la motilité et de la migration	125
- Figure 58:	Modélisation moléculaire des peptides NC1(XIX) et P10	128
- Figure 59:	Modélisation moléculaire des peptides NC1(XIX) et P19m	129

Liste des tableaux

Tableau 1:	Classification du. Phototype	12
Tableau 2:	Classification des Métalloprotéinases Matricielles (MMPs)	
Tableau 3:	Différents types des collagènes	
Tableau 4:	Nombre d'acides aminés des différents domaines de la chaîne α_1 du	
	collagène(XIX)	57
Tableau 5:	Réactifs utilisés	63
Tableau 6:	Matériels utilisés	64
Tableau 7:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur la vitesse de migration des cellules B16F10	96
Tableau 8:	Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur la vitesse de migration des cellules HUVECs	115
	derivee i re sui la vicesse de inigration des condies rie vices	110

Liste des abréviations

AC	Anticorps		
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium		
DMSO	Diméthylsulfoxyde		
ECL	Electrochimioluminescence		
FACIT	Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helix		
HMEC-1	Human microvasculature endothelial cells 1		
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells		
MEC	Matrice extra-cellulaire		
MMP	Matrix metalloproteinase		
MT-MMP	Membrane-type matrix metalloproteinase		
PAI	Plasminogen activator inhibitor		
PBS	Phosphate buffered saline		
PMSF	Phenylméthylsulfonylfluorure		
RPMI	Roswell Park Memorial Institute		
SAB	Sérum albumine bovine		
SDS	Sodium dodécyl sulfate		
SVF	Sérum de veau foetal		
TBS	Tris buffered saline		
TBS-T	Tris buffered saline-tween		
TEMED	Tétraméthyl-éthylène-diamine		
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase		
tPA	Tissular plasminogen activator		
UACC	University of Arizona Cancer Center		
uPA	Urokinase plasminogen activator		
uPAR	Urokinase plasminogen activator receptor		
VEGF	Vascular endothelial growth factor		

Liste des publications et des communications

COMMUNICATIONS PAR VOIE D'AFFICHE

 <u>Aïda Toubel</u>, Laurent Ramont, Christine Terryn, Sylvie Brassart-Pasco, Janos Sapi, Jean-Claude Monboisse and François-Xavier Maquart The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vitro melanoma cells migration. International symposium of the federative research N°53: cell-microenvironment Interactions.

Reims, France, June 7th to 9th 2010.

- <u>Aïda Toubel</u>, Laurent Ramont, Christine Terryn, Sylvie Brassart-Pasco, Janos Sapi, Jean-Claude Monboisse and François-Xavier Maquart. The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vitro melanoma cells migration. Emerging Concepts in Melanoma Biology, Pave the Road to New Therapies. 7th melanoma meeting, Cancéropole IDF. 16-18 juin 2010, Nice-France.
- L Ramont, <u>A Toubel</u>, Brassart-Pasco, J. Thevenard, Christine Terryn, A Deshorgue, D Patgny, J Sapi, L Vento, M Pluot, Jean-Claude Monboisse and François-Xavier Maquart.

The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo tumor growth and angiogenesis.

2nd Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies and 26th CARD.

Reims, 3-5 Juin 2009.

LISTE DES PUBLICATIONS

 Aida Toubel, Laurent Ramont, Christine Terryn, Sylvie Brassart-Pasco, Dominique Patigny, Janos Sapi, Jean-Claude Monboisse and François-Xavier Maquart. The NC1 domain of type XIX collagen inhibits melanoma cell migration. Accepté pour publication: Eur J Dermatology 2010.

Introduction

Introduction

Le processus cancéreux est une dynamique complexe. À l'échelle de l'organisme, il s'agit d'une pathologie issue d'un dysfonctionnement moléculaire exprimé à l'échelle de la cellule. Il existe des liens étroits entre le processus cancéreux et le milieu extracellulaire, qui peut induire, permettre, favoriser ou au contraire freiner l'échappement métastatique qui caractérise l'invasion tumorale. Cet échappement nécessite une séquence de phases de migration, puis de prolifération cellulaire.

Le mélanome malin est une tumeur cutanée qui prend naissance à la jonction dermeépiderme, où sont localisés les mélanocytes. Après une phase de croissance horizontale sans risque de métastases pour le patient, il progresse ensuite au cours d'une phase verticale vers les couches les plus profondes du derme, en acquérant la compétence métastatique.

L'invasion tumorale est la phase clé du processus cancéreux. C'est une cascade d'événements complexes permettant aux cellules cancéreuses de se transformer en cellules métastatiques et de s'implanter dans les tissus. Au cours de cette cascade tumorale, un remodelage et une dégradation des constituants de la matrice sont impliqués.

L'angiogenèse constitue aussi une étape cruciale pour le développement des tumeurs.

Les nouveaux vaisseaux apportent les nutriments nécessaires au développement de la tumeur. La formation de néo-vaisseaux dépend d'un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques.

Les modifications des assemblages moléculaires liant cellules et matrice, ou assemblages matricellulaires vont créer les conditions favorables au déclenchement du processus métastatique. Ceci fait intervenir la sécrétion puis l'activation d'enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou le système de la plasmine. La membrane basale est le premier rempart contre l'invasion tumorale. Elle présente des structures denses et amorphes. C'est une matrice extracellulaire spécialisée, avec de nombreuses propriétés biologiques. Des peptides produits par la protéolyse partielle des macromolécules de la matrice, appelés matrikines ou matricryptines, peuvent moduler la progression tumorale ou l'angiogenèse.

Les domaines C-terminaux (domaines NC1) de plusieurs types de collagènes associés à la membrane basale (types IV, XV, XVIII et XIX) sont des matrikines à propriétés antitumorales et anti-angiogéniques. C'est le cas de l'endostatine, domaine NC1 de la chaîne α 1 (XVIII), la restine, domaine NC1 de la chaîne α 1 (XV), la tumstatine, domaine NC1 de la

- 7 -

chaîne α 3 (IV), la canstatine, domaine NC1 de la chaîne α 2 (IV) et l'arresténe, domaine NC1 de la chaîne α 1 (IV).

Récemment, notre laboratoire a montré qu'un collagène mineur présent dans la zone de la membrane basale, le collagène de type XIX, est capable d'inhiber la progression tumorale dans un modèle expérimental de mélanome malin dont le mécanisme d'action reste à élucider.

Notre travail actuel a pour objectif la caractérisation de la (ou des) séquence(s) polypeptidique(s) minimale(s) active(s) du domaine NC1 (XIX), responsable(s) de l'effet anti-tumoral et anti-angiogénique, et d'étudier leurs mécanismes d'action sur les cellules tumorales.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous décrirons quelques généralités sur la progression du mélanome, les cascades protéolytiques impliquées, et la structure des principaux constituants des membranes basales. Puis, après la description des principales techniques utilisées, nous développerons les résultats obtenus.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la détermination de la séquence minimale active du domaine NC1 (XIX) responsable de l'effet anti-tumoral. Nous avons étudié l'effet du domaine NC1(XIX) et ses fragments dérivés (P10, P8 et P6 constitués respectivement des 10, 8 et 6 premiers acides aminés du domaine NC1 du collagène XIX) sur la croissance tumorale in vivo.

Ensuite, nous avons poursuivi nos travaux par une étude in vitro, pour déterminer l'effet du domaine NC1 (XIX) et des fragments peptidiques qui en sont dérivés sur les phases précoces de l'invasion tumorale et sur l'angiogenèse.

Généralités

A mes parents A mes soeurs

I- Le mélanome

I-1-La peau

La peau ou tégument externe forme le revêtement externe de l'organisme. Chez l'adulte son poids représente 4kg pour une surface d'environ $2m^2$ et une épaisseur de 0,5 à 5 mm.

La peau est constituée de trois tissus superposés qui sont de l'extérieur à l'intérieur (figure 1):

- L'épiderme, représentant la couche externe, constitué par 4 assises cellulaires superposées. Il est constitué par les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langherans et de Merkel.
- La jonction dermo-épidermique, qui permet la cohésion entre le derme et l'épiderme.
- Le derme, qui constitue un tissu conjonctif dense, pièce maîtresse pour le soutien de la peau.
- L'hypoderme, couche la plus profonde de la peau, qui représente le tissu adipeux sous cutané.

La peau joue un rôle essentiel dans la protection de l'organisme contre les agressions extérieures (rayonnement solaire, produits chimiques, infections...) et aussi un rôle de thermorégulateur en régulant la température corporelle par son pouvoir isolant. Elle maintient la température corporelle constante grâce à la sudation et la dilatation ou la contraction des vaisseaux sanguins en fonction de la température extérieure.



I-2-Caractéristiques du mélanome malin

Le mélanome malin est une tumeur cutanée se développant à partir des mélanocytes qui dérivent de la crête neurale et migrent ensuite dans l'épiderme. Les mélanocytes synthétisent les pigments de mélanine responsables de la pigmentation de la peau. La mélanine fabriquée par les mélanocytes est transférée aux kératinocytes.

I-2-1-Epidémologie

Le mélanome constitue la plus grave des tumeurs cutanées en raison de sa capacité à métastaser, mettant en jeu le pronostic vital des malades atteints.

Le mélanome cutané est en constante augmentation avec un doublement de l'incidence tous les dix ans en europe. Actuellement, son incidence est de 5 à 15 nouveaux cas par 100 000 habitants et par an.

Ce taux change d'une région à une autre, il est bien plus élevé en Australie (40 à 50 nouveaux cas par 100 000 habitants par an) mais par contre il est plus bas dans les pays à phototype V (voir tableau 1), dominant par exemple Asie ou Amérique latine, encore plus bas en Afrique. D'autre part, l'incidence diminue de l'Europe du nord vers celle du sud (15 nouveaux cas par 100 000 habitants en Scandinavie et 5 à 7 nouveaux cas par 100 000 habitants au pourtour de la méditerranée (Lens MB et coll 2004). En Europe, le mélanome est plus fréquent chez la femme que chez l'homme et devient plus fréquent chez les patients de moins de 55 ans (Trome et coll 2007).

En France, entre 1980 et 2000, le taux d'incidence du mélanome a augmenté de 2,4 à 7,6 par 100 000 habitants et par an pour les hommes et de 3,9 à 9, 5 pour les femmes (Grange 2005). L'augmentation de l'incidence est accompagnée par une augmentation de la mortalité.

Le mélanome représente la première cause de mortalité par cancer cutané. Le taux de mortalité a été multiplié par 2,7 chez la femme et par 2,9 chez l'homme entre 1969 et 1997 (Grange 2005). Le mélanome cutané se situe au 18ème rang des décès par cancer (http://www.e-cancer.fr/v1 - Institut National Du Cancer).

I-2-2-Facteurs de risques

Le risque de développer un mélanome cutané est le résultat de facteurs constitutionels (phototype) et de facteurs externes (exposition aux UV). Ajoutés à ces facteurs complexes, le nombre et le type de naevus présents chez les patients constituent un marqueur de risque de mélanome essentiel. Les facteurs de comportement comme les expositions solaires prolongées et les coups de soleil, surtout durant l'enfance, sont également importants.

I-2-2-1-Facteurs intrinsèques

Le phototype représente la sensibilité de la peau au rayonnement solaire. Il comprend la couleur des yeux et des cheveux (Tableau1).

Phototype I	Peau extrêmement blanche, cheveux blonds, yeux bleus/verts	Brûle facilement, ne bronze jamais
Phototype II	Peau blanche, cheveux blonds roux à bruns, yeux verts/bruns	Brûle toujours facilement, bronze à peine
Phototype III	Peau moyenne, cheveux bruns, yeux bruns	Brûle modérément, bronze graduellement et uniformément
Phototype IV	Peau olivâtre, cheveux bruns/noirs, yeux bruns/noirs	Brûle à peine, bronze toujours bien
Phototype V	Peau brun foncé, cheveux noirs, yeux noirs	Brûle rarement, bronze beaucoup
Phototype VI	Peau noire, cheveux noirs, yeux noirs	Ne brûle jamais, la peau est fortement pigmentée en permanence

Tableau1: Classification du phototype

(http://www.e-cancer.fr/v1 - Institut National Du Cancer)

Le phototype constitue un facteur de risque majeur. Ainsi, plus le phototype est faible, plus le risque de développer un mélanome cutané est grand. Les sujets à phototype de type I et II (peau extrêmement blanche ou blanche et ne bronzant pas) ont un risque plus grand de développer un cancer de la peau par comparaison avec les sujets à phototype de type IV ou V (peau mate, bronze normalement et brûle rarement)

La protection cutanée concerne toutefois aussi bien les sujets à phototype faible que élevé.

A ceci s'ajoute le risque d'antécédent familial: 5 à 10% des malades atteints de mélanome ont un parent de premier degré atteint de la même pathologie. Dans ce cas on parle de mélanome familial. Le développement de mélanome chez ces sujets est précoce et les tumeurs sont souvent multiples (Trome et coll 2007, http://www.e-cancer.fr/v1- Institut National Du Cancer).

D'autre part, un nombre élevé de naevus (> à 100) et la présence de naevus atypique (naevus à bord mal défini, diamètre de 5mm ou plus, couleur multiples, contour irrégulier et érythème) constituent des facteurs de risque majeurs pour le développement de mélanome (Bataille et coll 1996). Le syndrome des naevus atypiques représente 5% à 12% des patients atteints de mélanome.

I-2-2-Facteurs extrinséques

L'exposition au soleil représente le principal facteur de risque pour le développement d'un mélanome. Le rôle des UV n'est pas mis en doute. L'exposition solaire durant l'enfance est d'une importance primordiale. Son influence est de 50% à 80% des dégâts solaires encouru sur l'ensemble d'une vie puisque, à cet âge, la peau est particulièrement sensible aux ultraviolets.

I-2-3-Diagnostic et classifications

Les mélanomes ont une origine intra-épidermique ou intra-épithéliale et sont ou non associés aux naevus préexistants. Le diagnostic anatomo-clinique se base sur la morphologie et l'architecture globale de la lésion pigmentaire selon la régle ABCDE, qui représente une technique de diagnostic complète, peu spécifique mais assez sensible (figure2). Les cinq critères diagnostiques sont les suivants:

- (A) Asymétrie de la lésion
- (B) Bords irréguliers
- (C) Couleur: variabilité dans la distribution du pigment mélanique
- (D) Diamètre supérieur à 5 mm
- (E) Extension de la lésion et disposition désorganisée



Figure2: Mélanome remplissant les critères ABCDE

Un examen histopathologique est obligatoire pour confirmer le diagnostic de mélanome. L'analyse histologique permet de mesurer l'épaisseur exacte et le degré d'invasion de la tumeur, facteurs dont dépendent la gravité et donc le pronostic. On trouve une population cellulaire naevique dans 20% des mélanomes.

Histologiquement, les mélanomes sont classés selon deux indices: l'indice de Clark et l'indice de Breslow.

L'indice de Clark traduit le niveau d'infiltration en profondeur de la tumeur (figure3):

- Clark I: mélanome intra-épidermique (in situ)
- Clark II: mélanome avec cellules mélanocytaires atypiques infiltrant le derme papillaire
- Clark III: infiltration de tout le derme papillaire
- Clark IV: envahissement du derme réticulaire
- Clark V: invasion de l'hypoderme



Figure 3: Classification du mélanome selon l'indice de Clark

L'indice de Breslow traduit l'épaisseur en millimétre de la lésion depuis la partie superficielle jusqu'à la partie la plus profonde de la tumeur (figure 4). Cet indice est très important, pour la détermination du traitement et le suivi de la tumeur. Une corrélation inverse existe entre l'indice de Breslow et la survie après le traitement. Il est d'autant plus efficace que l'indice de Breslow est faible. Le taux de survie à 5 ans est de 91 à 95% lorsque cet indice est < à 1 mm et est de 63à 79% lorsqu'il est compris entre 2 et 4 mm.



Figure 4: Classification du mélanome selon l'indice de Breslow



Mélanome niveau I selon Clark, Epaisseur 0,28 mm selon Breslow

Mélanome niveau III selon Clark, Epaisseur 0,6 mm selon Breslow

Mélanome niveau III selon Clark, Epaisseur 0,92 mm selon Breslow

Figure 5: Modèle de mélanome selon les indices de Clark et Breslow

Le mélanome peut toucher n'importe quelle région de la peau, du cuir chevelu, des muqueuses. A partir de ces différents indices on peut classer le mélanome en:

- Mélanome superficiel extensif (SSM): c'est la forme la plus fréquente, à croissance horizontale, plus fréquent au niveau des jambes chez la femme et au niveau du dos chez les hommes.
- Mélanome nodulaire (NM): caractérisé par une croissance invasive, fréquent chez les hommes âgés, et se localisant souvent au niveau du tronc.
- Mélanome lentigo malin (LNM): caractérisé par une croissance horizontale lente, se manifeste chez les femmes âgées au niveau du visage.
- Mélanome acro-lentigineux (ALM):c'est le type fréquent chez les asiatiques et les africains, se localise au niveau des doigts, des orteils et la plante des pieds.

I-2-4-Traitement du mélanome

Le traitement du mélanome dépend de sa localisation et du stade de la maladie.

La chirurgie est le traitement initial du mélanome cutané qui repose sur l'exérèse de la lésion avec une marge de sécurité variable en fonction de son épaisseur, déterminée selon l'indice de Breslow. L'analyse anatomopathologique de la tumeur extraite permet de préciser sa taille, son épaisseur et sa profondeur. A la suite de cet examen une reprise de l'exérèse est recommandée c'est-à-dire qu'on procéde à l'ablation du reste de la tumeur en fonction de son épaisseur et aussi à une partie du tissu sain qui entoure la tumeur. Pour le mélanome débutant, aucun traitement complémentaire à la chirurgie n'est recommandé.

Concernant les mélanomes à risque et à stade avancé, un curage ganglionnaire est effectué pour détecter la présence de cellules cancéreuses. L'ablation de ces ganglions est importante afin d'arrêter l'extension de la tumeur. Dans certains cas, un traitement complémentaire à l'interféron est recommandé.

Le traitement des mélanomes métastatiques repose sur la chimiothérapie qui est un traitement systémique. L'immunothérapie peut aussi être appliquée afin d'activer les défenses naturelles pour détruire les cellules tumorales.

Des examens réguliers pendant toute la vie sont nécessaires après le traitement de la tumeur. Leur périodicité dépend des caractéristiques de la lésion cutanée.

1-2-5-Progression tumorale du mélanome et métastases

Le mélanome malin prend naissance à la jonction derme-épiderme et subit une progression biphasique. En effet, il progresse selon une phase de croissance horizontale sans risque de métastase, puis selon une phase verticale au cours de laquelle les cellules pénètrent profondément dans le derme et acquièrent un fort potentiel invasif.

Les cellules se dissocient du massif primitif et acquièrent des propriétés de migration et de dégradation. Elles gagnent ainsi la circulation sanguine, transportées par le système circulatoire, colonisent d'autres organes et forment un nouveau foyer tumoral appelé métastase dans un nouvel environnement tissulaire (figure 6).

Les principales localisations métastasiques secondaires des mélanomes sont pulmonaires, hépatiques et cérébrales.



Figure 6: Les différentes étapes de la progression tumorale

I-2-6- La migration cellulaire

Le caractère métastasique des cancers dépend de la capacité des cellules cancéreuses à quitter la tumeur primaire et ensuite à s'implanter et proliférer ailleurs.

La migration cellulaire constitue le point de départ du processus métastasique et accompagne l'invasion tumorale. La cellule cancéreuse nécessite un changement de forme et une interaction avec les structures qui l'entourent, en particulier les constituants de la matrice extracellulaire qui constituent la première barrière à franchir. Elle acquiert ainsi de nouvelles propriétés biochimiques et des caractéristiques morphologiques leur permettant de s'échapper de la tumeur principale.

Une partie de ces transformations est appelé «la transition épithélio-mésenchymateuse » (EMT), se traduisant par la disparition des phénotypes épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux (Greenburg et coll 1982). Les cellules n'expriment plus le gène de la E-cadhérine, perdent l'expression de la cytokératine et ré-expriment la vimentine (Cano et coll 2000). Ces cellules cancéreuses utilisent une migration de type mésenchymateux.

Ce type de migration est caractérisé par une protéolyse péricellulaire active, un cytosquelette structuré et l'établissement de points d'ancrage très résistants. Les points focaux d'adhérence participent à l'organisation des filaments d'actine et à la formation de protrusions de type lamellipodes (Lauffenburger et coll 1996).

Les cellules cancéreuses peuvent subir une seconde transition appelée «transition mésenchymateuse- amiboïde», le cytosquelette d'actine se réorganise, abandonnant ainsi la formation de fibres de stress au profit d'une architecture moins structurée conduisant à la formation d'anneaux d'actine sous le contrôle de la protéine ROCK-1 (Sahai et coll 2004). La morphologie générale s'arrondit : les cellules présentent de nombreux bourgeonnements; on parle d'une morphologie amiboïde.

La migration des cellules cancéreuses devient différente d'une migration mésenchymateuse. Dans ce type de migration amiboïde, les cellules se déforment, leur membrane est animée de mouvements dynamiques liés à la formation/ déformation des blebs (figure 7).

Les cellules se faufilent au travers des mailles de la matrice extracellulaire en n'ayant recours, ni à une activité protéasique, ni aux intégrines (Friedl et coll 2003, Wolf et coll 2003). Elles utilisent de nombreux points d'ancrage de faible intensité et des séquences d'adhésion/dé-adhésion très rapides (Friedl et coll 1998, Brakebusch2002).



Figure 7: La migration d'une cellule cancéreuse (Malo et coll 2006)

II-L'angiogenése tumorale

L'angiogenèse est le mécanisme par lequel naissent des nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau capillaire préexistant. Elle est indispensable au cours de nombreux processus physiologiques comme le développement embryonnaire ou l'implantation du placenta, mais aussi pathologiques, particulièrement au cours de la croissance tumorale et du développement des métastases.

En 1971, Judah Folkman a montré que la croissance tumorale dépend de la formation de nouveaux capillaires (Folkman et coll 1971).

Les cellules tumorales ont besoin d'oxygène et d'énergie pour survivre. En absence de ces vaisseaux sanguins, seule la diffusion passive leur permet l'apport d'éléments nutritifs et le rejet des déchets dans le milieu extérieur, ce qui limite de façon très importante leur croissance. L'expansion rapide de la tumeur est liée à sa vascularisation par les nouveaux capillaires.

Suite à l'implantation des cellules tumorales, la membrane basale entourant les capillaires à proximité de ces cellules disparaît, permettant la migration des cellules endothéliales.

Les cellules tumorales sécrètent des facteurs qui enclenchent la néo-angiogenèse, comme le VEGF (Vascular Endhothelial Growth Factor) ou les FGF (Fibroblast Growth Factor), en particulier FGF-2, qui activent les cellules endothéliales jusque là en repos (Moinet et coll 2007).

Les cellules endothéliales qui migrent en tête ne se divisent pas alors que celles à l'arrière entrent en phase S et commencent à proliférer.

Les premières cellules commencent à se différencier et s'organisent en tubes. Ces tubes ne sont autres que les futurs capillaires, se connectant les uns aux autres pour former le nouveau réseau de circulation sanguine de la tumeur. La formation de la membrane basale est la dernière étape de la formation des nouveaux capillaires (Vandenbunder et coll 1994, Blood et coll 1990). Les nouveaux capillaires tumoraux sont désorganisés, dilatés et perméables. Leurs péricytes sont moins nombreux (Moinet et coll 2007) (figure8).
.



Figure 8: Néo-angiogenèse tumorale

(Journal de l'institut Curie 2007; 69)

III- Les Métalloprotéinases Matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont les principales enzymes protéolytiques de la matrice extracellulaire. Ce sont des endopeptidases intervenant dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles interviennent au cours de phénoménes aussi bien physiologiques (la cicatrisation, l'apoptose, l'angiogenése) que pathologiques (progression tumorale, inflammation, formation de métastases).

Ce sont des endopeptidases zinc-dépendantes capables de dégrader un ou plusieurs composants de la matrice extracellulaire. Elles sont sécrétées sous forme de zymogénes inactifs et acquiérent leurs activités après clivage pour exercer leurs rôles protéolytiques.

III-1- Structure des MMPs

Les MMPs peuvent être subdivisées en deux groupes comportant, d'une part, les MMPS sécrétées et, d'autre part, les MMPs membranaires (Membrane Type - MMPs, MT-MMPs). Les MMPs sont caractérisées par une structure organisée en domaines, Celle-ci est commune à toutes les MMPs avec la présence de domaines plus spécifiques qui permettent de les différencier en classes.

Les domaines conservés au sein des différents groupes sont les suivants :

- Le pré-domaine : c'est un peptide signal localisé du coté N-terminal, nécessaire pour l'acheminement à la surface cellulaire.
- Le pro-domaine: C'est un domaine formé de 80 à 90 acides aminés, permettant de maintenir la pro-enzyme sous sa forme latente grâce à la séquence PRCGVPDV, qui interagit avec le site catalytique grâce à un résidu cystéine.
- Le domaine catalytique: C'est un domaine formé par 162 à 170 acides aminés, contenant une séquence spécifique HEXGHXXGXXHS. Les résidus histidine jouent le rôle de ligand pour l'atome de zinc du site actif et sont donc nécessaires à l'activité protéasique des différentes enzymes.
- Le domaine hémopexine : Ce domaine est situé du coté C-terminal, relié au domaine catalytique par une région charniére. Il est présent au niveau de toutes les MMPs à l'exception des matrilysines.

En plus de ces domaines communs, il y a présence d'autres domaines spécifques caractérisant certaines classes de MMPs:

- Le domaine similaire aux séquences répétées de type II de la fibronectine: appelé aussi CBD (Collagen Binding Domain), présent seulement dans les gélatinases A et B (MMP-2 et MMP-9), permettant ainsi à ces protéases de lier la gélatine.
- Le domaine de reconnaissance de la furine: se situe entre le pro-domaine et le domaine catalytique des MMPs-11 et des MT-MMPs.
- Le domaine transmembranaire: spécifique des MT-MMPS et leur conférant ainsi une localisation membranaire.

L'ensemble de ces données structurales est présenté dans la figure 9.



Figure 9: Organisation moléculaires des MMPs (D'après Ala-Aho et coll 2005)

III-2- Classification des MMPs

Les MMPs sont classées en 6 sous-groupes en fonction de leur spécificité et leurs caractéristiques structurales.

Les collagénases

Ce sous groupe comprend la MMP-1, la MMP-8, et la MMP-13. Ces collagénases sont responsables de la dégradation des collagènes fibrillaires de type I, II et III, ainsi que d'autres molécules de la MEC.

Les matrilysines

Ce sont les MMPs les plus simples structuralement car elles ne contiennent pas de domaine homologue de l'hemopexine. Elles sont représentées par la MMP-7 et la MMP-26. Ces protéases sont essentiellement présentes au niveau des cellules cancéreuses d'origine épithéliales.

Les stromélysines

Ce groupe comprend la MMP-3, la MMP-10, et la MMP-13. Les stromélysines ont une structure simillaire à celles des collagènases, et possédent un spectre protéolytique très large, touchant les protéoglycannes, la laminine, l'élastine et les procollagènes.

Les gélatinases

Elles sont représentées par la MMP-2 (Gélatinase A, 72kDa) et la MMP-9 (Gélatinase B, 92kDa. Elles présentent une action protéolytique dirigée contre plusieurs composants de la MEC, essentiellement les collagènes dénaturés en gélatine et le collagène de type IV des membranes basales. Les gélatinases ont une structure caractérisée par la présence de 3 séquences répétitives de Fibronectine type II au sein de leurs domaines catalytiques, permettant ainsi leurs liaisons aux substrats préferentiels, la gélatine et les collagènes de membrane basale.

• Les MMPs transmembranaires ou MT-MMPs

A ce jour, on a identifié 6 MT-MMPs (MT1-MMP à MT6-MMP) qui interviennent dans la dégradation des différents composants de la MEC et jouent un rôle important dans l'activation des MMPs. Ces protéases sont capables de s'ancrer à la membrane plasmique soit par l'intermédiaire du domaine transmembranaire hydrophobe présent dans le domaine hémopexine (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP), soit par un groupement glycosyl phosphatidylinositol (GPI) (MT4-MMP et MT6-MMP).

Les autres MMPs

C'est un groupe hétérogéne qui compend la MMP-12,-20,-27 parmi d'autres présentant une structure similaire à celles des stromélysines.

L'ensemble de ces données est présenté dans le tableau 2.

Famille	Nom	N°MMP	Substrats				
Gélatinases	Gélatinase A	MMP-2	Gélatine, collagène IV, V, VII, X, et XI, élastine, fibronectine et protéoglycanes				
	Gélatinase B	MMP-9	Gélatine, collagène IV et V, élastine, fibronectine et protéoglycanes				
Collagénases	Collagénase intersticielle	MMP-1	Collagène I, II, III, et X, gélatine, Protéoglycanes				
	Collagénase de neutrophile	MMP-8	Collagène I, II, III, protéoglycanes				
	Collagénase 3 MMP-13 Collagène I,		Collagène I, II et III.				
	Stromélysine-1	MMP-3	Protéoglycanes, fibronectine,laminine, élastine, gélatine, collagènes II, IV, V, IV et X				
Stromélysines	Stromélysine-2	MMP-10	Gélatine, collagènes II, IV, V, IV et X, Protéoglycanes, fibronectine,laminine, élastine				
	Stromélysine-3	MMP-11	Gélatine, fibronectine, protéoglycanes				
Matrilysines	Matrilysine 1	MMP-7	Gélatine, fibronectine, laminine,collagène IV et protéoglycanes				
	Matrilysine 2	MMP-26	Fibronectine, fibrinogène, vitronectine, gélatine, collagènes I et IV				
	MT-1-MMP	MMP-14	Collagène IV, gélatine, pro-gélatinase A				
	MT-2-MMP	MMP-15	Collagène IV, gélatine				
Métalloprotéinases	MT-3-MMP	MMP-16	Collagène IV, gélatine, pro-MMP-2				
membranaires	MT-4-MMP	MMP-17	Collagène IV, gélatine				
	MT-5-MMP	MMP-24	Non connus				
	MT-6-MMP	MMP-25	Collagène IV, gélatine, fibronectine, protéoglycanes				
Métalloélastase	Métalloélastase	MMP-12	Élastine, fibronectine, Collagène IV, vitronectine, laminine				

Tableau 2: Classification des Métalloprotéinases (MMPs)

III-3- Mécanismes d'activation des MMPs

La plupart des MMPs sont sécrétées sous forme de zymogénes inactifs, et doivent être activées pour exercer leur rôle protéolytique. L'activation se produit dans le compartiment extracellulaire ou au contact de la membrane plasmique (notamment dans le cas de la MMP-2), impliquant la présence soit de sérines protéases (plasmine, furine) soit d'autres MMPs déjà active (Murphy et coll 1999). Le mécanisme d'activation des MMPs est appelé [«]cystéine switch^{».} Dans ce processus, les MMPs acquièrent leurs capacités protéolytiques par dissociation de la liaison entre l'atome Zn^{2+} du site catalytique de l'enzyme et le groupement thiol d'un résidu cystéine présent dans le pro-domaine, libérant ainsi le site actif (Nagase et coll 1990, Birkedal-Hansen et coll 1993, Van Wart et coll 1990) (figure 10).

In vitro, les pro-MMPs peuvent être activées par des radicaux libres oxygénés, le SDS, l'urée, la chaleur ou un pH acide. Ces facteurs induisent la dissociation de la liaison entre la cystéine et l'atome Zn^{2+} , conduisant ainsi à l'auto-protéolyse du pro-domaine.



Figure 10: Mécanisme d'activation des métalloprotéinases maricielles

(D'après Ray et Stetler-Stevenson 1994)

III-3-1- Mécanisme d'activation de la pro-MMP2

L'activation de la MMP-2 à la surface des cellules de mélanome nécessite une cascade protéolytique faisant intervenir une molécule de MT1-MMP et une autre de TIMP-2, à un coefficient stœchiométrique 1: 1.

La MT1-MMP présente à la surface cellulaire sous sa forme latente (63kDa) est clivée par une furine convertase pour générer une forme active (60kDa) qui sera dégradée à son tour pour donner une forme inactive (45kDa) (Yana et coll 2000).

Une molécule de TIMP-2 se fixe au niveau du domaine catalytique de la MT1-MMP. On obtient ainsi la formation du complexe récepteur MT1-MMP /TIMP-2/pro-MMP2 par fixation du domaine hémopexine C-terminal de la pro-MMP2 sur le domaine C-terminal du TIMP-2(Strongin et coll 1995). Une 2éme molécule de MT1-MMP libre clive la pro-MMP2 du complexe trimoléculaire pour donner une forme intermédiaire de la MMP-2 (Figure11) (Bulter et coll 1998, Nagase et coll 1998). L'activation initiale de la MMP-2 par la MT1-MMP est suivie d'un clivage autocatalytique ou par la plasmine pour générer une forme active de la MMP-2 de 62KDa (Bulter et coll 1998).

Un excès de TIMP-2 bloque le mécanisme d'activation de la pro-MMP2 par inhibition de la seconde molécule de MT1-MMP (Hernandez-Barrantes et coll 2000).



Figure 11: Modèle d'activation de la pro-MMP2 par l'intérmédiaire de la MT1-MMP (D'après Soumni et coll 2003)

III-4- Inhibition de l'activité des MMPs

L'activité des MMPs est régulée par un groupe d'inhibiteurs tissulaires endogénes appelés TIMPs (Tissue Inhibitors of MetalloProteinases) (Mignatti et coll 1993, Liotta et coll 1990). Ils forment des complexes covalents avec toutes les MMPs actives, avec une stoïchiométrie 1:1(Silvestre et coll 2002). L'activité des MMPs est maintenue par un équilibre entre les molécules de MMPs actives et leurs inhibiteurs TIMPs libres. Une altération de cet équilibre affecte le processus de l'invasion cellulaire dans le cancer (Ray, Stetler-Stevenson et coll 1994).

Les TIMPS inhibent l'activité des métalloprotéinases en se liant aux molécules de proMMPs ou MMPs actives, inhibant ainsi l'autoactivation de ces enzymes et l'activité protéolytique des formes actives (Hofman et coll 2005, Gomez et coll 1997).

Les différents TIMPs ont été déterminés, purifiés et clonés. On en connaît 4 types: (Dochetery et coll 1985, Uria et coll 1994).

- TIMP-1 est une glycoprotéine de 28,5KDa qui inhibe la collagénase intersticielle, la stromélysine 1 et la gélatinase B sous sa forme latente et active (Wilhelm et coll 1989, Welgus et coll 1983- 1985).
- TIMP-2 est une protéine non glycosylée de 21KDa. Il présente une grande affinité pour la progélatinase A (Howard et coll 1991). TIMP-2 inhibe l'acitivité de la gélatinase A, la collagénase de type IV, et aussi l'activité hydrolytique de toutes les MMPs (Howard EW et coll 1991, Stetler-Stevenson et coll 1989, Boone et coll 1990).
- TIMP-3 est une protéine non glycosylée de 24KDa, localisée dans la matrice extracellulaire, présentant une affinité pour ses différents composants. Elle posséde 40% d'homologie avec TIMP-1, et 45% d'homologie avec TIMP-2(Ray JM- Stetler-Stevenson 1994).
- .TIMP-4 est une protéine de 22KDa qui se lie à la pro-MMP-2 comme le TIMP-2. Elle empêche l'activation de pro-MMP-2 sous l'action de la MT1-MMP

III-5- MMPs dans la progression tumorale

Au cours de la progression tumorale, les MMPs jouent un rôle important dans la dégradation des composants de la matrice extracellulaire.

Au-delà de cette action protéolytique, elles ont de nombreuses autres activités biologiques. Elles interagissent avec des facteurs de croissance, de l'inflammation, de l'apoptose et de l'angiogenèse (Visse et Nagase 2003).

Les MMPs interviennent dans chacune des étapes de la progression tumorale conduisant de la cellule normale jusqu'au cancer et à sa diffusion métastasique. Ces étapes sont successivement l'initiation, la promotion puis la transformation, ce qui induit la perte d'inhibition de contact et la perte d'adhérence conduisant à l'apparition de cellules migratrices (Zinzindohoué et coll 2005).

La croissance de la tumeur primitive est dépendante de son potentiel angiogénique et invasif au sein du tissu hôte. Le chimiotactisme et la migration cellulaire conduisent à l'intravasation des cellules tumorales qui est à l'origine des métastases.

Modification de l'architecture de la matrice extracellulaire au cours de la phase d'invasion et de croisssance tumorale

La protéolyse constitue une étape clé de l'invasion tumorale au cours du mélanome (Liotta et coll 1980). Elle est effectuée par les MMPs sécrétées essentiellement par les cellules du stroma (macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales). Il existe une corrélation entre le stade tumoral et le niveau d'expression des MMPs. Au cours de l'invasion du mélanome, l'expression de la MMP-2 augmente avec le stade tumoral et l'apparition de la MMP-9 correspond au passage du stade de la croissance horizontale à une croissance en profondeur puis une apparition des métastases (Vaisanen et coll 1996, MacDougall et coll 1995).

Les MT-MMP jouent un rôle important par leur disposition sur les membranes cellulaires. La MT1-MMP se trouve en forte concentration sur le front d'invasion tumoral. Elle forme un complexe avec CD44, induisant ainsi la dégradation des composants de la matrice tels que le collagène de type I. Elle coopére avec d'autres MMPs en activant la proMMP-2 qui, à son tour, dégrade le collagène de type IV (Seiki 2003).

Implication des MMPs dans la modification du morphotype cellulaire et la perte d'adhérence des cellules tumorale

La MMP-3 et la MMP-7 sont impliquées dans la perte d'adhérence cellulaire et la modification du phénotype cellulaire. La MMP-3 dégrade la cadhérine et rompt les liaisons intercellulaires. (Lochter et coll 1997). La MMP-7 favorise l'activation de la voie Wnt. Elle augmente le pool intracellulaire de β -caténine. Celle-ci peut être transloquée dans le noyau et favoriser l'expression de gènes promoteurs du cancer (Crawford et coll 1999).

• .Rôle des MMPs dans la prolifération cellulaire

Plusieurs MMPs, dont la stromélysine, sont capables de digérer des protéines extracellulaires, libérant ainsi des facteurs de croissance (De Clerck et coll 1992).

Rôles des MMPs dans l'angiogenése

La formation de néo-vaisseaux est l'un des éléments majeurs de la croissance tumorale et du processus métastasique (Folkman coll 2002, Gupta et coll 2003). Dans les tumeurs, la MMP-2, la MMP-7 et la MMP-9 jouent un rôle promoteur de l'angiogenèse. MMP-2 et MMP-9 sont majoritairement exprimées par les cellules endothéliales situées à l'intérieur et autour de la tumeur (Hotary et coll 2000; Itoh et coll 1998).

Rôles des MMPs dans le processus métastatique

Les MMPs favorisent le processus métastatique, par la capacité qu'elles ont de dégrader les différents composants des membranes basales, facilitant ainsi le passage des cellules tumorales dans les vaisseaux.

III-6 - Implication des MMPs dans la progression du mélanome

Au cours de la progression du mélanome, différentes protéases à rôle protéolytique et des membres du système d'activation du plasminogéne sont impliquées (Hofmann et coll 2005, ferrier et coll 1998). Les cellules de mélanome expriment un grand nombre de métalloprotéinases comme la MMP-1,-2, -9 et -13, et aussi la MT1-MMP et l'inhibiteur TIMP-1 (Hofman et coll 2000).

La MMP-2 active (62kDa) est détectée principalement dans les cellules de mélanome très invasives, alors qu'elle serait absente des cellules de mélanome à faible potentiel invasif (Kurschat et coll 1999, Ntayi et coll 2001). Kurschat et coll (2002) ont montré que la MMP-2 serait la principale enzyme gélatinolytique impliquée dans le mélanome. Elle est exprimée dés les stades précoces alors que la MMP-1, la MMP-13 et la MT1-MMP sont surtout exprimées à des stades plus avancés (Hofman et coll 2000).

Les MT2-MMP et MT3-MMP ont été colocalisées avec la MMP-2 dans les mélanomes nodulaires et métastatiques, suggérant l'implication de ces enzymes dans les processus d'invasion et de métastase (Ohhnishi et coll 2001).

La MT1-MMP joue un rôle direct dans la progression tumorale et la formation de métastases puisqu'elle est capable de dégrader les différents composants de la matrice extracellulaire. Elle stimule la progression tumorale indépendamment de ses capacités à activer la proMMP-2 (Hofman et coll 2005). La MT1-MMP est localisée au front de migration de la tumeur au même endroit que la MMP-2 active (figure 12).

La MMP-9 est exprimée par les cellules de mélanome en phase de croissance horizontale, dont la propagation est restreinte à l'épiderme (Mac Dougall et coll 1999). Ceci suggére un rôle de la MMP-9 dans les phases précoces de la progression tumorale.

Au cours de la progression tumorale, la MMP-1 est exprimée à des stades très avancés, stade III et IV de Clark par les fibroblastes au contact de mélanome (Hofman et coll 2000).



Figure 12: Expression de la MMP-2 et de la MT1-MMP par les cellules tumorales et stromales au front d'invasion de la tumeur

(D'après Hofman et coll 2005)

Les MMPs peuvent cliver des composants non matriciels tels que les cytokines et les facteurs de croissance, modifiant ainsi l'adhésion, la prolifération, la survie et la vascularisation des cellules de mélanome. En clivant des récepteurs de surface comme les intégrines, la MMP-2 inhibe l'adhésion des cellules de mélanome à la matrice extracellulaire et les contacts intercellulaires (Ray et coll 1995). La prolifération des cellules de mélanome est inhibée par le collagène natif et stimulée par le collagène non fibrillaire dégradé par les collagènases (Henriet et coll 2000). Le clivage du facteur de croissance TGF- β latent par la MMP-2 et la MMP-9 donne une molécule active capable d'augmenter la survie des cellules de mélanome et la croissance tumorale (Berking et coll 2001).

IV- Le systéme plasmine/plasminogéne

Le système d'activation du plasminogéne est impliqué dans de la fibrinolyse intra et extra-vasculaire. Il est aussi impliqué dans des nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que la migration cellulaire, le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), l'organogenése, l'inflammation, l'invasion tumorale, et le développement des métastases (Rerolle et coll 2001).

IV-1- La plasmine

La plasmine est une sérine protéase de 90kDa, composée de deux chaines polypeptidiques. Une chaîne lourde N-terminale dite (A) composée de 5 domaines de type «kringle» à l'extrémité N-terminale, et une chaîne légère dite (B) contenant le site catalytique de la molécule, toutes deux reliées entre elles par des ponts dissulfure.

La plasmine joue un rôle important dans la fibrinolyse et la fibrinogénolyse. Elle hydrolyse les liaisons peptidiques entre les résidus lysine et arginine. Cette sérine protéase est capable de dégrader de nombreux composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, vitronectine et collagènes...) et d'activer directement différentes MMPs (pro-MMP-1, pro - MMP-3 ou pro-MMP-9).

IV- 2-Le plasminogène

Le plasminogéne natif est une glycoprotéine de 92kDa, synthétisée principalement par les hépatocytes. On le retrouve dans la circulation sanguine.

C'est le zymogéne inactif de la plasmine. Il est formé par 791 acides aminés, 24 ponts dissulfure intra-chaîne et 5 domaines «Kringle». Le plasminogéne est activé par un clivage enzymatique au niveau de la liaison entre une arginine en position 561 et une valine en position 562 ou par autolyse (Rerolle et coll 2001).

La conversion du plasminogéne en plasmine se fait par ses activateurs de type urokinase (Urokinase-type Plasminogen Activator, uPA) ou tissulaire (tissue-type Plasminogen Activator, tPA) (Andreasen et coll 1997).

IV- 3- L'activateur du plasminogéne de type urinaire (uPA ou urokinase)

L'activateur du plasminogéne de type urokinase est une sérine protéase de 50 kDa, composée de deux chaînes polypetidiques (A et B) reliées par 2 ponts disulfures. La chaîne A de l'urokinase est composée d'un domaine en kringle, un domaine de type facteur de croissance et un domaine catalytique présent sur la chaîne B.

Il présente une grande spécificité envers le plasminogéne qui, en le clivant, libére la plasmine active. L'urokinase est sécretée sous une forme inactive (pro uPA), activée par la plasmine ou par liaison avec son récepteur membranaire (uPAR) (Andreasen et coll 1997).

IV-4- Le récepteur membranaire de uPA : uPAR

Le récepteur de l'uPA est une protéine de 55-60kDa, formée par une seule chaîne polypeptidique ancrée à la membrane plasmique par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Il est formé par 3 domaines homologues de 90 acides aminés (D1à D3) (figure13).



Figure 13: Structure de uPAR lié à une molécule de uPA (D'après Andreasen et coll 1997)

L'uPA sous sa forme latente ou active se fixe sur le domaine D1 de son récepteur uPAR via son domaine de type facteur de croissance (G). Ainsi lié, uPAR induit l'activation péricellulaire du plasminogéne en plasmine. L'uPAR intervient dans des phénoménes d'adhésion, de prolifération, de migration cellulaire suite à l'activation de l'urokinase (Andreasen et coll 1997). Des études ont montré que l'uPAR intervient dans l'activation de certaines voies de transduction du signal impliquant des kinases (Blasi et coll 2002, Andreasen et coll 1997). Pour ceci, il interagit avec des protéines adaptatrices comme les intégrines ou encore des tyrosine - kinases pour faciliter la transmission des signaux externes.

IV-5- L'activateur du plasminogéne de type tissulaire (tPA)

Le tPA est une sérine protéase de 66kDa, présente dans la circulation sanguine. Il présente des homologies de 40% avec l'uPA en séquence d'acides aminées.

La protéine mature existe sous deux formes, une forme native monocaténaire sct-PA (single chain t-PA), protéase active, ou une forme bicaténaire tct-PA (two chain t-PA) obtenue après clivage de la forme native par la plasmine au niveau de la liaison Arginine 275- Isoleucine 276.

Le tPA est formé par un domaine catalytique de type sérine protéase, un domaine de type facteur de croissance, et deux domaines de fixation de substrat. Il agit sur le plasminogéne par le clivage de la liaison Arginine 561- Valine 562.

Le tPA joue un rôle important au cours de l'invasion tumorale, et stimule la prolifération des cellules endothéliales.

IV-6- Les inhibiteurs du système plasmine/plasminogéne

Les inhibiteurs du sytéme plasmine-plasminogéne appartiennent à la famille des serpines ou inhibiteurs de sérines protéases.

L'inhibiteur de l'activateur du plasminogéne de type I (Plasminogen Activator Inhibitor -1, PAI-1) est un inhibiteur rapide des activateurs du plasminogéne (tPA et uPA) appartenant à la

famille des serpines. C'est une glycoprotéine de 50kDa, synthétisé sous forme active, rapidement désactivé par la formation du complexe u-PA/PAI-1.

Le PAI-1 est capable de se lier à des composants de la matrice extracellulaire comme la vitronectine, et module ainsi la migration et l'adhésion cellulaire. Il semble jouer un rôle important dans l'inflammation, l'angiogenése et la formation des métastases (Blasi 1997).

V- Les collagènes

V-1-Généralités

La superfamille des collagènes est très complexe, présentant une grande diversité de l'organisation moléculaire et supra-moléculaire ainsi que de la distribution tissulaire et des fonctions biologiques (Ricard-Blum et Ruggiero, 2005). C'est la famille de protéines la plus abondante de l'organisme humain (25% à 30% des protéines totales).

Le terme de collagène désigne les protéines de la matrice extracellulaire composées de trois chaînes polypeptidiques (chaînes α) s'associant autour d'un axe central pour former au moins un domaine en triple hélice. Cette caractéristique structurale commune à tous les membres de la famille des collagènes correspond à la répétition du triplet (Gly–X–Y) _n, X étant fréquemment la proline et Y l'hydroxyproline dans la séquence d'acides aminés (figure 14).

La triple hélice des collagènes est stabilisée par des liaisons hydrogène établies par les groupements hydroxyle des résidus hydroxyproline. Tous les résidus de glycine sont localisés au cœur de l'hélice (Gelse et coll 2003).



Figure 14 : Structure d'une molécule typique de collagène (A): une chaîne α ; (B) : une triple hélice

La majorité des molécules de collagènes présentent des domaines triples hélicoïdaux interrompus par des domaines non hélicoïdaux. Le terme «NC» (Non Collagénique) désigne les domaines non hélicoïdaux et le terme «COL» (Collagénique) les domaines en triple hélice.

Les collagènes jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurelle de la plupart des tissus, et sont également impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques tels que l'embryogenèse, la cicatrisation, ou le contrôle de l'invasion tumorale. Ils interagissent entre eux et avec les molécules voisines pour former des conformations supramoléculaires conférant une résistance mécanique élevée aux matrices extracellulaires.

V- 2-Classification des collagènes

A ce jour, on connaît 29 collagènes distincts (numérotés de I à XXIX en fonction de l'ordre chronologique de leur découverte), formés à partir de 43 chaînes α différentes. Les collagènes sont classés en plusieurs sous-familles déterminées en fonction des homologies de séquence et des similitudes au niveau de l'architecture modulaire des chaînes polypeptidiques et de leur assemblage supramoléculaire (Myllyharju et Kivirikko, 2004, Gelse et coll 2003, Ricard-Blum et Ruggiero 2005).

La superfamille des collagènes est divisée en neuf familles distinctes sur la base des particularités de ses membres et de leur assemblage supramoléculaire (Tableau3 et figure 15):

- Collagènes fibrillaires
- Collagènes associés aux fibrilles avec triple hélice interrompue (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix, FACITs)
- Collagènes à filaments perlés
- Collagènes des membranes basales
- Collagène des fibrilles d'ancrage
- Collagènes à réseaux hexagonaux
- Collagènes transmembranaires
- Collagènes à multiples domaines en triple hélice (Multiplexines)
- Collagènes de forme inconnue



Figure 15: Structure des différents types de collagènes (D'aprés Myllyharju et Kivirikko 2004)

Types de collagène	Composition du monomère	Distribution tissulaire					
Collagènes Fibrillaires							
I II V XI XXIV XXVII	Homotrimére a_1 Homotrimére a_1 Homotrimére a_1 Multiples associations Hétérotrimére a_1a_2 a_3 Homotrimére a_1	Derme-Os- Tendon Cartilage- Humeur vitrée Derme-Vaisseaux-Intestin_Gencive Derme- Os-Cartilage- Placenta Cartilage hyalin-Humeur vitrée Cartilage- Rétine-Peau- Os Os- Œil					
	<u>Collagènes FACITs</u>						
IX XII XIV XVI XIX XX XXI XXII IV	Hétérotrimére a_1a_2 a_3 Homotrimére a_1 Multiples associations <u>Collagènes à filaments perlés</u>	Cartilage- Cornée Derme-Os-Tendon- Ligament Peau-Tendon-Foie-Vaisseaux Placenta Cerveau- Œil-Testicule cartilage, cornée, peau, tendon vaisseaux sanguins cartilage, tendon-Derme S Rein-Cristallin- Aorte- Poumon					
VI	Hétérotrimére $\alpha_1 \alpha_2 \alpha_3$	Derme-Os- Placenta-Cartilage					
VII	Homotrimére a ₁	Derme					
VIII X	Homotrimére a_1 Homotrimére a_2 Homotrimére a_1 Collagènes transmembranaires	Aorte- Membrane de Descemet Cartilage					
XIII XVII XXIII XXV	Homotrimére a_1 Homotrimére a_1 Homotrimére a_1 Homotrimére a_1	Placenta-Os-Muscle Epiderme Os-Cartilage- Cornée-Poumons Cerveau					

<u>Collagènes à multiples domaines en triple hélice (Multiplexines)</u>							
XV XVIII	Homotrimére a_1 Homotrimére a_1	Membranes basales Membranes basales					
<u>Collagènes de forme inconnue</u>							
XXVI	Homotrimére <i>a</i> ₁	Ovaire-Testicule					
Tableau 3: Différents types de collagènes							

V-3-Collagènes associés aux fibrilles à triple hélice interrompue (FACITs)

La sous famille des collagènes FACIT (Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix) est formée par 9 types de collagènes (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII et XXVI).

La structure des collagènes FACITs est différente de celles des collagènes fibrillaires puisqu'ils contiennent un nombre variable de courts domaines à structure en triple hélice (domaines collagéniques, COL) interrompus par les domaines non collagéniques (NC). Ce groupe de collagènes FACITs est caractérisé par la conservation de deux molécules de cystéine séparées par 4 acides aminés au niveau de la jonction NC1- COL 1, la présence de 2 imperfections Gly-X-Y répétitives au niveau du domaine collagènique 2 (COL 2), un long domaine en triple hélice interrompu par de courts domaines non collagéniques, ainsi que la présence d'un gros domaine amino-terminal lié à un domaine de type thrombospondine (TSPN) (figure 16).

A côté de ces caractéristiques communes aux différents membres du groupe des collagènes FACITs, il existe un certain nombre de divergences concernant leur taille, la composition de leurs domaines amino-terminaux et le nombre de leurs domaines collagéniques (2 domaines collagéniques pour les collagènes de type XII, XIV, XX, XXI et 10 domaines collagéniques pour le collagène de type XVI). Le domaine TSPN constitue à lui seul le domaine aminoterminal des collagènes de types IX, XVI et XIX, alors qu'au niveau du collagène XXI et XXII, il se trouve placé à coté d'un domaine von Willlebrand factor A-like (vWA). Le domaine vWA alterne avec des répétitions de fibronectine de type III au niveau du collagènes de type XII, XIV et XX (S. Ricard-Blum, F. Ruggiero 2005). Les collagènes FACITs interviennent dans la stabilisation des fibres de collagènes et contribuent à l'intégrité de la matrice extracellulaire.



Figure 16: Structure des chaînes α des collagènes de la famille des FACITs (D'après S. Ricard-Blum, F. Ruggiero 2005)

Les collagènes de types IV, XV, XVIII, et XIX étant associés aux membranes basales, ils seront plus spécifiquement décrits au paragraphe VI.

VI- La membrane basale

La membrane basale est une forme spécialisée de matrice extracellulaire. C'est une assise résistante mais déformable et perméable qui représente une barrière physiologique extrêmement importante. Elle sert de moyen d'ancrage aux cellules épithéliales, intervient comme filtre pour leur nutrition et est indispensable pour leur survie et la réparation épidermique. Cette matrice est composée de diverses protéines et polysaccharides localement sécrétés qui s'assemblent en un réseau organisé, solidement associé à la surface cellulaire qui les produit. Les variations des quantités relatives des différents types de macromolécules matricielles et de leur mode d'organisation dans la matrice extracellulaire expliquent la diversité de formes, adaptées aux besoins fonctionnels.

Les membranes basales sont en continue interaction avec les cellules par l'intermédiaire de protéines adaptatrices comme les intégrines. Elles sont impliquées dans la régulation du comportement cellulaire, les processus de prolifération, de migration et de différenciation cellulaire. Un dysfonctionnement des interactions entre la cellule et la matrice extracellulaire est associé à une multitude de maladies : désordres du développement, de l'immunité, de l'homéostasie et malignité. La membrane basale constitue le premier rempart contre l'invasion tumorale. Elle est dégradée au cours de celle-ci.

Les membranes basales sont constituées essentiellement de trois grandes classes de protéines : les glycoprotéines, les protéoglycannes et les collagènes. Chaque classe de ces protéines exerce une fonction particulière, ce qui confére aux membranes basales des propriétés diversifiées et une grande capacité de régulations cellulaires.

VI-1- Les constituants de la membrane basale

VI-1-1- Les glycoprotéines

Les glycoprotéines de la membrane basale présentent des structures et des fonctions très diverses. Les glycoprotéines possèdent une caractéristique commune, étant composées par des motifs structuraux répétés formant des domaines qui conférent aux différentes molécules leurs fonctions.

Ces protéines interviennent dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Elles sont impliquées par conséquent dans les phénomènes de migration et d'adhésion cellulaire (Johansson et coll 1996).

Les laminines sont des glycoprotéines présentes dans la membrane basale de tous les tissus. Elles sont sécrétées par différents types cellulaires.

Ce sont des hétérotriméres formés de 3 chaînes différentes α , β et γ reliées par des ponts disulfures. Les chaînes α , β et γ peuvent être de plusieurs types différents (figure17), ce qui aboutit à au moins 15 isoformes de laminine (Colognato et coll 2000)

Les laminines jouent un rôle majeur dans la structure des membranes basales, elles interagissent avec le collagène de type IV, l'entactine, le nidogéne et le perlécane. Elles interviennent au cours de l'adhésion, la prolifération, la différenciation cellulaire et aussi au cours de l'invasion tumorale en interagissant avec les cellules tumorales.



Figure 17: Structure des laminines. Les trois chaînes (α, β et γ) sont reliées par des ponts disulfures

La fibronectine est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire formée de deux sousunités de 250 kDa liées par des ponts disulfures. Chaque sous-unités est formée par des domaines structuraux contenant des sites d'interactions avec d'autres molécules (collagènes, fibrine, intégrines...) ou avec des cellules.

Elle peut être sous une forme soluble présente dans le plasma et d'autres liquides biologiques, ou sous une forme insoluble, dans la zone des membranes basales, synthétisée par les cellules épithéliales et endothéliales.

La fibronectine intervient dans la structure de la matrice extracellulaire et dans les interactions cellules-matrice. Elle permet l'attachement des cellules aux différents composants de la matrice et aussi la communication cellulaire. Elle modifie le comportement cellulaire (la prolifération, la différenciation et la motilité cellulaire) en activant des voies de transduction de signal par l'intermédiaire des protéines kinases, suite à son interaction avec des intégrines. Elle intervient au cours de processus physiologiques comme la cicatrisation et l'angiogenèse mais aussi au cours des processus pathologique comme l'inflammation.

Une autre glycoprotéine trouvée dans la membrane basale est le nidogéne. C'est une glycoprotéine sulfatée de 150kDa. Elle est composée de 3 domaines globulaires, G1, G2, G3, et d'un domaine R en bâtonnet. Elle a pour fonction de contrôler la formation d'un complexe stable entre le collagène IV, les laminines et le perlecanne.

Le nidogéne joue un rôle majeur dans la stabilisation et le maintien de l'architecture de la membrane basale (Ekblom et coll 1994).

VI-1-2- Les protéoglycannes

Les protéoglycannes sont des protéines complexes, constitués d'une partie protéique appelée «protéine cœur » sur laquelle sont greffés de façon covalente des polyméres glycanniques appelés glycosaminoglycannes (GAGs) (Naito et coll 2005). Plusieurs GAGs de nature différente peuvent se fixer sur une même protéine cœur.



Figure 18: Liaison entre une chaîne de GAG et la protéine cœur dans une molécule de protéoglycanne

Les glycosaminoglycannes sont des polymères glucidiques sulfatés ou aminés, chargés négativement, qui ont la capacité de fixer de nombreuses molécules d'eau. Ils confèrent aux membranes basales une forte hydratation, une perméabilité sélective et la capacité de fixer des facteurs de croissance.

Les protéoglycannes règlent de nombreuses activités cellulaires comme la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaire.

Le principal protéoglycanne de la membrane basale est le perlécane. C'est un protéoglycanne à héparane sulfate. Il est constitué d'une protéine cœur composée de 5 domaines différents, et de trois ramifications glycanniques d'héparane- sulfate. Le perlécane se fixe aux différents composants de la membrane basale, et peut fixer des facteurs de croissance comme le βFGF (Paulson et coll 1987).

VI-1-3-Collagènes liés aux membranes basales

Le collagène de type IV est le composant majeur des différents types de membranes basales. On y retrouve également des collagènes mineurs : XV, XVIII et XIX. Ils sont caractérisés par une structure en triple hélice interrompue par plusieurs domaines non collagèniques. Les constituants des membranes basales contrôlent les différentes fonctions cellulaires. Ils peuvent être aussi sources de peptides bio-actifs issus de leurs domaines constitutifs.

La dégradation de la membrane basale au cours des processus physiologiques ou pathologiques implique la protéolyse des collagènes. Cette protéolyse peut donner des fragments de collagènes à fonctions biologiques différentes de celle de la molécule intacte. Les domaines C-terminaux de ces collagènes, appelés domaines NC1, issus de la protéolyse des collagènes, peuvent moduler la progression tumorale ou l'angiogenése (Maquart et coll 2004).

VI-1-3-1-Le collagène de type IV

L e collagène de type IV est un constituant structural essentiel des membranes basales. Il est formé par l'association de 3 chaînes polypeptidiques parmi 6 possibles, numérotées de α 1 (IV) à α 6 (IV). Il ne forme pas de fibrilles. On le trouve sous forme de réseau au niveau des membranes basales (Boutaud et coll, 2000, Dolz et coll 1988, Tsilibary et coll 1990). Chaque chaîne α du collagène de type IV est formée par 3 domaines (figure19):

- Un domaine amino terminal, appelé domaine 7S du fait de sa constante de sédimentation en ultracentrifugation
- Un domaine carboxyterminal glomérulaire non collagénique appelé domaine NC1
- Un long domaine central en triple hélice présentant des interruptions de répétitions
 Gly-Xaa-Yaa, conférant une certaine flexibilité à la triple hélice



Figure 19 : Structure du collagène de type IV et mode de polymérisation (D'après Ortega 2002)

Les chaînes α du collagène de type (IV) ont des distributions tissulaires variables.

Les chaînes α 1et α 2 (IV) ont des expressions ubiquitaires, et les chaînes α 3, α 4, α 5, et α 6 ont une distribution tissulaire plus restreinte et spécifique du stade du développement (Kelley et coll 2002).

Les chaînes α 3 et α 4, et α 6 du collagène (IV) sont retrouvées au niveau des membranes basales du glomérule rénal, de l'aorte, du poumon et de la capsule du cristallin (Butkowski et coll 1989, Kalluri et coll 2000).

La chaîne $\alpha 5$ est aussi localisée au niveau des membranes basales vasculaires, rénales et de la peau.

La flexibilité de la triple hélice du collagène de type IV lui permet une interaction avec d'autres collagènes et avec les différents composants de la membrane basale.

Le collagéne de type IV permet l'intégrité et les fonctions biologiques des membranes basales, et intervient au cours de l'adhésion, la migration, la différenciation et la croissance cellulaire (Blumberg et coll 1987, Netzer et coll 1998, Sarras et coll 1993).

La protéolyse du collagène de type IV par la MMP-2 est une étape clé de la progression et de l'invasion tumorale (Nakoan et coll 2005).

VI-1-3-2-Le collagène XV

Le collagène de type XV est un collagène non fibrillaire de la famille des multiplexines (Abe et coll 1993, Oh et coll 19994, Oh et coll 1994, Rehn and Pihlajaniemi 1994). C'est un homotrimére constitué de trois chaînes α 1 identiques formant une triple hélice centrale interrompue par des domaines non collagéniques. Chaque chaîne α est formée par un domaine amino-terminal de 529 résidus, un domaine central de 579 résidus en triple hélice interrompue par 9 domaines non collagéniques et un domaine carboxy-terminal appelé domaine NC1 de 255 résidus (figure 20).



Figure 20: Structure de la chaîne α1 du collagène XV (D'après Ortega 2002)

Le collagène XV présente une distribution tissulaire très variable, il se localise au niveau de différentes membranes basales tissulaires. Il a une forte expression au niveau du cœur, le muscle squelettique et le placenta, alors que son expression est plus faible au niveau du pancréas et du rein (Kivirikko et coll 1995, Muragaki et coll 1994). Le collagène XV se localise au niveau des membranes basales vasculaires, neuronales, et épithéliales (Myers et coll 1996).

Ce collagène joue un rôle important dans la stabilisation mécanique des fibres du muscle squelettique et des microvaisseaux (Eklund et coll 2001).

Il a été montré que des souris déficientes en collagène XV présentent une sensibilité accrue à l'exercice et développent une dégénérescence des cellules musculaires et endothéliales ainsi qu'une vascularisation anormale (Eklund et coll 2001).

VI-1-3-3-Le collagène XVIII

Le collagène XVIII est un protéoglycanne à héparane sulfate (Halfter et col, 1998, Li et coll 2000). Il présente des homologies avec le collagène de type XV. Il peut être sous forme de deux isoformes (long et court) chez l'homme (Saarela et coll 1998).



Figure 21: Structure de la chaîne α1 du collagène XVIII (D'après Ortega 2002)

C'est un homotrimére formé de 3 chaînes $\alpha 1$, s'associant pour former une triple hélice centrale interrompue par 9 domaines non collagèniques. De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, chaque chaîne $\alpha 1$ présente un peptide signal, un domaine aminoterminal, un domaine collagénique interrompu par 9 domaines non collagèniques et un domaine C-terminal NC1 (figure 21).

Le variant d'épissage court est exprimé dans différent organes comme le rein, le cœur, la prostate, les ovaires et les muscles squelettiques alors que le variant d'épissage long est spécifique des sinusoides du foie (Musso et coll 2001, Rehn et coll, 1994, Saarela et coll 1998a, Saarela et coll 1998b).

Il est exprimé au niveau d'un ensemble de membranes basales de différents tissus épithéliaux et vasculaires. Il est présent au niveau des membranes basales de l'œil depuis son développement jusqu'après la naissance (Fukai et coll 2002).

Il a été montré que des mutations dans le variant d'épissage court induisent une forte myopie et une dégénérescence de la rétine (Sertie et coll 2000).

Le collagène XVIII joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité des membranes basales. Il interagit avec l'héparane sulfate et la laminine grâce aux sites de liaison présents au niveau de son domaine C-terminal (Sasaki et coll 1998, Javaherian et coll 2002, Sasaki et coll 2000).

VI-1-3-4-Le collagène XIX

VI-1-3-4-1-Découverte et description

Le collagène XIX est un collagène mineur de la zone des membranes basales, associé à d'autres types de collagènes (Collagènes de type IX, XII, XIV, XX, XXI). Avant d'être nommé collagène XIX, il a été désigné par les termes ^collagène Y[°] puis ^{RH} COL[°] (Yoshioka et coll 1992). Il a été cloné à partir d'ADN de lignées de cellules de rhabdomyosarcome (RD, CCL136) (Myers et coll 1993)

Le gène *COL19A1*, codant le collagène XIX, se localise au niveau de la région q12q14 du chromosome 6 de l'homme, région qui code aussi les collagènes de type IX et XII. Ce même gène *CoL19A1* se localise au niveau de la région A3 du chromosome 1 du rat (Khaleduzzamen et coll 1997).

Le gène du collagène XIX est caractérisé par une structure multi-exonique, parmi lesquels 51 exons codent la totalité du collagène XIX.

Le gène *COL19A1* du collagène XIX présente des similitudes avec d'autres gènes de collagènes de la famille des FACITS. Ainsi les exons des domaines non collagèniques (NC1-NC2-NC3-NC4) et les domaines collagéniques (COL1-COL2-COL3) du collagène XIX sont similaires à ceux des domaines non collagèniques (NC1-NC2-NC3) et à ceux des domaines collagéniques (COL1-COL3) de la chaîne α_2 du collagène du type IX.

La similitude de structure entre le géne *COL19A1* du collagène XIX et les autres gènes de collagènes de la famille des FACITs suppose la duplication d'un gène ancestral (Khaleduzzamen et coll 1997).

VI-1-3-4-2-Structure du collagène XIX

Le collagène de type XIX est un homotrimère de 400 kDa, composé de l'association de 3 chaînes α_1 (XIX). Chaque chaîne α_1 (XIX) est constituée de 1142 résidus, formant 6 domaines non collagéniques (NC1-NC6) interrompus par 5 domaines collagéniques (Col1-Col5) (figure 22).



De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale on retrouve (Myers et coll., 1997) :

- un peptide signal de 23 résidus
- un domaine NC6 de 268 résidus
- un domaine collagénique de 832 résidus interrompu par 4 domaines NC (de 20 à 40 résidus)
- un court domaine NC1, C-terminal, de 19 résidus, présentant des homologies avec la thrombospondine

Peptide signal	NC6	Col5	NC5	Col4	NC4	Col3	NC3	Col2	NC2	Col1	NC1
23	268	144	20	224	108	108	23	168	44	70	19

Tableau 4: Nombre d'acides aminés des différents domaines de la chaîne α₁ du collagène (XIX) La chaîne $\alpha 1$ (XIX) contient 14 résidus cystéines intervenant dans l'assemblage des trois chaînes polypeptidiques constitutives du collagène:

- 10 au niveau du domaine NC6
- 2 au niveau du domaine NC4
- 2 cystéines dans la jonction entre les domaines COL1 et NC1

VI-1-3-4-3-Localisation et répartition tissulaire

Le collagène XIX est un collagène mineur associé aux membranes basales. Il est présent dans les tissus en très faible concentration. Par exemple, il représente que 10^{-6} % du poids du cordon ombilical (Myers et coll 2003). A titre d'exemple, le collagène de type VII présente 0,001% du poids sec de la peau.

L'expression du collagène XIX est ubiquitaire, elle commence durant l'embryogenèse au niveau d'un ensemble de tissus, devenant plus restreinte à certains tissus de l'organisme adulte (Myers et coll 1997). Le collagène XIX est exprimé au niveau des membranes basales vasculaires, neuronales et intestinales (Sumiyoshi et coll 2001).

Chez l'adulte, sa distribution devient restreinte à quelques tissus. Il se localise au niveau des membranes basales de 8 organes différents: le muscle squelettique, la rate, la prostate, le rein, le foie, le colon, le placenta, et la peau au niveau de la jonction dermo-épidermique (Myers et coll 1997). Il est également présent dans le cerveau au niveau de l'hippocampe (Su et coll 2010).

Le collagène (XIX) intervient dans l'assemblage des matrices embryonnaires et le maintien de tissus spécifiques d'adultes (Sumiyoshi et coll 1997).

Au cours de la progression tumorale du cancer du sein, le collagène XIX disparaît dès les premiers stades invasifs, permettant ainsi le remodelage de la matrice extracellulaire et l'infiltration des cellules tumorales (Myers et coll 2003).

La présence du collagène XIX au niveau des membranes basales vasculaires est importante pour le déroulement de l'angiogenèse.
VI-1-3-4-4-Comparaison avec les autres types de collagènes

La distribution tissulaire du collagène de type XIX présente des similitudes avec celle du collagène de type XV. Ainsi, les 2 types de collagènes sont présents au niveau des membranes basales du muscle lisse, de l'endothélium vasculaire et des fibres nerveuses. Ils sont présent au niveau du foie, du rein, et la rate avec des localisations différentes (Myers et al 1997). Ils présentent des similitudes de répartition avec le collagène de type IV au niveau du foie. Le domaine NC6 du collagène XIX présente des homologies avec les domaines NC4 des autres types de collagènes FACITs, en particulier avec le domaine NC4 de la chaîne α_1 (IX), le domaine NC3 des chaînes α_1 (XII) et α_1 (XIV), et le domaine NC11 de la chaîne α_1 (XVI). Myers et al (1994) ont montré que les domaines NC2 et NC4 du collagène (XIX) sont similaires à ceux de la chaîne α_1 du collagène de type XVI.

VII- Rôle des domaines NC1 des collagènes liés aux membranes basales

La protéolyse des membranes basales au cours des phénoménes physiologiques et pathologiques induit la dégradation de ces différents composants.

La dégradation des collagènes fournit des domaines dont le rôle biologique peut être important, alors que la protéine d'origine n'exerce pas ces fonctions. Ces fragments sont appelés matrikines ou matricryptines. Certaines possédent des propriétés anti-tumorales et/ou anti-angiogéniques. Certaines sont détectables dans la circulation sanguine (Maquart et coll 1999, Ortega et coll 2002).

VII-1- Les domaines NC1 du collagène IV

L'arrestene, la canstatine, et la tumstatine sont les matrikines à activité anti-tumorale issues de la protéolyse du collagène IV (Colorado et coll 2000, Kamphaus et coll 2000, Maeshima et coll 2000b). Elles correspondent respectivement aux domaines NC1 des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ (IV).

In vitro, ces fragments NC1 inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Colorado et coll 2000, Kamphaus et coll 2000, Maeshima et coll 2000b). Elles exercent des effets anti-angiogéniques, en inhibant *in vitro* la formation de pseudotubes à partir de cellules endothéliales de souris cultivées sur du Matrigel®, et in vivo la formation des capillaires dans des Matrigel® plugs insérés en sous-cutané. Elles inhibent aussi les propriétés invasives des cellules tumorales humaines (Pasco et coll 2000).

La tumstatine est un peptide de 28kDa, issu de la protéolyse de la chaîne α 3 du collagène (IV) par la MMP-9. Elle inhibe *in vitro* et aussi *in vivo* l'angiogenése par augmention de l'apoptose des cellules endothéliales. Cette propriété est due à la séquence 45-132 du domaine NC1 α 3 (IV) (Maeshima et coll 2000a). Aussi, la tumstatine diminue in vitro l'expression de la MT1-MMP dans les cellules tumorales bronchiques.

L'arrestene et la canstatine sont des peptides de 26kDa et 24kDa issu respectivement de la protéolyse de la chaîne α 1 et α 2 du collagène (IV).

Les domaines NC1des chaînes α1 et α2 du collagène (IV) présentent des similutudes de structure avec le TIMP-1. Elles inhibent *in vitro* l'activité de la MMP-2 et la MMP-3 (Netzer et coll 1998).

VII-2- Le domaine NC1 du collagène XVIII : l'endostatine

L'endostatine correspend au domaine non collagénique NC1 du collagène XVIII, C'est un fragment de 20 kDa, initialement purifié à partir de culture d'une lignée cellulaire d'hémangio-endothéliome de souris (O'Reilly et coll 1997). *In vitro*, elle est produite par des clivages protéolytiques par la cathepsine L ou par diverses MMPs (MMP-3, MMP-7 MMP-12 ou MMP-13) (Ferreras et coll 2000, Lin et coll 2001, Wen et coll 1999). La principale fonction de l'endostatine est d'inhiber l'angiogenése (Ortega et coll 2002, O'Reilly et coll 1997).

In vitro, elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par les facteurs de croissance bFGF et VEGF et non celles des cellules tumorales. De même, l'endostatine inhibe la migration des cellules endothéliales (Dhanabal et coll 1999b, O'Reilly et coll 1997, Taddei et coll 1999; Yamaguchi et coll 1999, You et coll 1999). Elle induit aussi leur apoptose. L'endostatine inhibe l'invasion du Matrigel® par les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses. Cet effet est induit suite à sa liaison au domaine catalytique de la pro-MMP-2, ce qui va inhiber l'activation de la MMP-2 (Kim et coll 2000). Elle contrôle aussi le systéme d'activation du plasminogéne (O'Reilly et coll 1997).

In vivo, l'endostatine inhibe l'angiogenèse et la croissance des tumeurs primaires (Ortega et coll 2002).

VII-3-Le domaine NC1 du collagène XV : la restine

La restine, domaine NC1 du collagène XV est une matrikine de 22kDa. Elle présente 62% d'homologie avec l'endostatine, matrikine du collagène de type XVIII d'où son appelation «endostatine- like» (Li et coll 2000). Elle présente aussi des activités antiangiogéniques et anti-tumorales.

La restine inhibe la migration des cellules endothéliales *in vitro*, alors que son effet sur la prolifération cellulaire est plus faible que celui de l'endostatine et varie selon le type cellulaire. Elle induit aussi l'apoptose cellulaire (Ramchandran et coll 1999, Xu et coll 2002). La restine ne présente pas de site de liaison à l'héparane sulfate.

Matériels et méthodes

Matériels et Méthodes

I- Matériels et Réactifs

I-1- Liste des Réactifs, matériels et fournisseurs

L'ensemble du matériel et des réactifs utilisés lors des différentes expériences est répertorié dans les tableaux ci-dessous (tableau5 et 6).

Réactifs	Fournisseurs	
Acétone	Prolabo	
Acide acétique	Prolabo	
Acide chlorhydrique	Prolabo	
5 1		
Acrylamide	Euromedex	
Anticorps anti MT1-MMP	Millipore	
Anticorps anti MT1-MMP	Santa Cruz Biotechnologie	
Anticorps anti-actine	BD Biosciences	
Anticorps monoclonal anti-IgG de	Sigma-Aldrich	
chèvre/mouton lié à la peroxydase		
Anticorps anti-vinculine	Serotec	
Anticorps secondaire anti-mouse couplé à	Invitrogen	
l'Alexa fluor [®] 568		
Anticorps secondaire anti-rabbit couplé à	Invitrogen	
l'Alexa fluor [®] 568		
APS (persulfate d'ammonium) Euromedex	Euromedex	
Biorad Protein Assay Kit	Biorad	
Béta-mercaptoéthanol	Sigma-Aldrich	
Bleu Coomassie G250 et R250	Sigma-Aldrich	
DMSO	Sigma-Aldrich	
Gélatine	Sigma-Aldrich	
Isopropanol	Prolabo	
Kit ECL/ECL ⁺ de détection par	Amersham	
chimioluminescence		
Méthanol, Milieux de culture cellules	Prolabo, Invitrogen	
tumorales : DMEM 4,5 g ou 1g de glucose,		
RPMI 1640		
Milieux de culture des cellules endothéliales	Promocell	
NaOH	Prolabo	
Plasminogène	Sigma- Aldrich	
Pro MMP-2	Sigma- Aldrich	

Pro MMP-9	Sigma- Aldrich
Phalloïdine Alexafluor [®] 488	Invitrogen
Réactif de Bradford	Biorad
Réactif WST-1	Roche
SAB (sérum albumine bovine)	Sigma-Aldrich
SDS (Sodium Dodécyl sulfate)	Euromedex
Sérum de veau fœtal (SVF)	Invitrogen
Tris (tris-(hydroxyméthyl))-aminométhane	Euromedex
Triton X-100	Sigma- Aldrich
Violet cristal	Sigma-Aldrich
Tableau 5: Réactifs	s utilisés

.....

Matériels	Utilisation	Fournisseurs
Appareil d'analyse d'images	Acquisition d'images	Vilbert Lourmat
Appareil photo	Acquisition d'images	Canon
Aiguilles	Injections souris	Sherwood
Centrifugeuse	Centrifugation	Eppendorf
Centrifugeuse	Centrifugation	Beckman
Cellulose DE52 -	papier absorbant Transfert	Whatman
Cuve Mighty Small	Electrophorèse	Bio-rad
Filtres à usage unique	Filtration	D.Dutcher
Insert de culture	Culture cellulaire	Ibidi
Hotte à flux laminaire MS12	Culture cellulaire	Jouan
Hyperfilm ECL	Révélation photographique	Amersham
Incubateur	Culture cellulaire	Jouan
Lame à numérisation avec	Culture cellulaire	Hycor
grille à usage unique		
Lecteur de microplaques	Spectrophotométrie	MRX Titertek
Logiciel d'analyse		
densitométrique Bioprofil	Traitement des données	Vilbert Lourmat
Logiciel d'analyse		Wayne Rasband
densitométrique ImageJ	Traitement des données	
Micro- plaque	Culture cellulaire	Ibidi
d'angiogenése		
pH-mètre	Préparation de solutions	Radiometer
Plaques de cultures Nunclon	Culture cellulaire	Dutscher
Plaques de cultures Falcon	Culture cellulaire	Becton Dickinson
Vidéomicroscope	microscopie	Zeiss

Tableau 6: Matériels utilisés

I-2- Souches cellulaires utilisées

- Cellules B16F1 : cellules de mélanome murin, faiblement métastatiques, adhérentes.
- Cellules B16F10 : cellules de mélanome murin, faiblement métastatiques, adhérentes.
- Cellules HUVEC : cellules endothéliales humaines de veine ombilicale, adhérentes (Promocell, France).
- Cellules UACC 903 : Cellules de mélanome humain, (Dr.J.Trent, Phoenix, Arizona).

I-3- Peptides utilisés

Le domaine NC1 de la chaîne alpha 1 du collagène XIX formé par 19 résidus (NPEDCLYPVSHAHQRTGGN), son scramble (AGNEQPNYHSDPGTHLCRV), utilisé comme témoin négatif, et les séquences peptidiques qui en sont dérivés (constituées des 10, 8 et 6 premiers acides aminés du domaine NC1 du collagène XIX) sont synthétisées et purifiées dans l'unité CNRS UMR 6229 (Pr J.Sapi, UFR Pharmacie, Reims). Leur synthèse est effectuée sur support solide par stratégie FMOC en flux continu. Les peptides sont purifiés par HPLC avec un gradient d'acétonitrile / eau, puis lyophilisés. La pureté des peptides (>95%) est vérifiée par spectroscopie de masse en électrospray.

• NC1(XIX) : NPEDCLYPVSHAHQRTGGN

P10 : NPEDCLYPVS P8: NPEDCLYP P6: NPEDCL P19 m : NGEDCLYGVSHAHQRTGGN P1 : EDCLYPVS P2 : DCLYPVS P3 : CLYPVS

II- Méthodes

II-1- Culture de cellules tumorales

Après décongélation rapide par passage 1 minute à 37°C, les cellules sont mises en suspension dans 10 mL de milieu (DMEM 4,5 g /L de glucose) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Elles sont cultivées en flacons de 75 cm² à 37°C, sous atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂. Après 24 heures, le milieu est remplacé par du milieu frais. A confluence, les cellules sont trypsinisées pour être réensemencées.

II-2- Culture de cellules endothéliales

Les cellules endothéliales HUVEC sont utilisées avant le 5_{ème} passage. Elles sont conservées dans l'azote liquide dans un milieu de congélation adéquat (Promocell). Après décongélation, les cellules sont mises en suspension 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 Supplement), et de 5% de SVF. A confluence, les cellules sont trypsinisées pour être réensemencées.

II- 3- Congélation cellulaire

Après décollement des cellules et centrifugation, le culot cellulaire est repris dans une solution de congélation formée par 70% de milieu de culture (DMEM 4,5 g/L de glucose), 20% de SVF et 10% de DMSO. Les cryotubes sont placés dans une boîte de congélation remplie d'isopropanol, puis laissés à -80°C pendant une nuit pour une congélation lente. Par la suite, ils sont placés dans l'azote liquide pour une conservation de longue durée.

II-4- Etude de la prolifération cellulaire

II-4-1-Par comptage cellulaire

L'étude de la prolifération cellulaire se fait sur des plaques de 24 puits. Les cellules (2.10⁴ cellules/ puits) sont mises en suspension dans 1 ml de milieu de culture supplémenté de 5% de SVF, en présence ou en absence du domaine NC1 du collagène XIX, et des différentes séquences peptidiques étudiées à une concentration connue, pendant 24h et 48h. Après une incubation à 37°C sous atmosphère à 5% de CO2, le milieu de culture est retiré, la couche cellulaire est lavée par une solution de PBS, puis les cellules sont détachées par trypsinisation (trypsine 0,25%). Les cellules sont comptées sur cellule Kova Slide de Hypcor.

II-4- 2- Par colorimétrie avec réactif WST-1[®]

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

La prolifération des cellules de mélanome est étudiée en plaques de 24puits. Les cellules (2.10⁴ cellules/ puits) sont mises en culture dans 1ml de milieu de culture supplémenté de 5% de SVF, en présence ou en absence du domaine NC1 du collagène XIX ou des peptides dérivés à concentrations connues.

Les plaques sont incubées pendant 24h et 48 h dans une étuve à 37°C sous atmosphère à 5% de CO2. Après incubation, le milieu de culture est retiré, remplacé par un nouveau milieu contenant du WST-1[®] (50 μ l de WST-1[®]/puits). A chaque 30 minutes d'incubation, l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques jusqu' apparition de la couleur jaune. Cette mesure est directement proportionnelle au nombre de cellules présentes dans le puits.

II-5- Etude de la migration cellulaire: Modèle de la blessure artificielle

La migration cellulaire est étudiée dans un modèle de blessure artificielle cicatricielle. Elle est déterminée par l'aptitude qu'ont les cellules à refermer une blessure expérimentale de la couche cellulaire *in vitro*.

II-5-1- Modèle de blessure artificielle par cône de pipette

Les cellules (5.10⁴) sont ensemencées en plaque de 24 puits, incubées pendant 24h dans du milieu de culture (DMEM 4,5g/L de glucose, RPMI ou milieu de culture adéquat aux cellules endothéliales) à 5% de SVF pour former un tapis cellulaire homogéne. A confluence, une blessure est réalisée dans la couche cellulaire au centre des puits à l'aide d'une pointe de pipette stérile.

Les cultures sont rincées avec de la PBS pour éliminer les débris cellulaires. Elles sont ensuite incubées pendant 24 et 48h dans un nouveau milieu de culture en présence et absence de NC1 (XIX) ou des peptides dérivés à une concentration voulue.

La migration est déterminée par l'aptitude qu'ont les cellules à refermer la blessure artificielle, qui est observée en microscopie et photographiée après 24 et 48h.

II-5- 2- Modèle de blessure artificielle par les inserts de culture (Ibidi®)

La blessure artificielle est obtenue par utilisation d'inserts de culture (Inserts Ibidi®) placés dans chaque puits de la plaque (plaque Falcon 12 puits). Chaque insert de silicone est formé par deux compartiments où on introduit les cellules (3500 cellules/ puits/dans70µl de milieu supplémenté en 5% de SVF). A confluence des cellules, les inserts sont prélevés à l'aide d'une pince stérile et le milieu de culture est remplacé par un nouveau milieu contenant ou non le peptide NC1 du collagène (XIX) ou les peptides dérivés. Une blessure artificielle est formée au milieu des puits (figure23).



Figure 23: Modèle de blessure artificielle par des inserts (Ibidi®)

II- 5-3- Dispositif d'acquisition des images par vidéomicroscopie

Une image de la blessure artificielle est prise toutes les heures et durant 48h à l'aide d'un vidéomicroscope.

Le sytéme de la vidéomicroscopie permet de suivre le mouvement des cellules à des intervalles de temps court (chaque heure) et sur des périodes très longues (24 à 48h). Il est constitué par un microscope inversé (Axiovert 200, Zeiss, Obercochen, Germany) contenant une chambre de culture thermostatée à 37° C et à 5% de CO₂, une lampe halogène pour une observation en contraste (figure 24). Les images sont enregistrées par une caméra vidéo. Le vidéomicroscope est relié directement à un ordinateur programmé avec le logiciel Metamorph. Celui-ci permet de prédéfinir les paramètres suivants: le temps d'acquisition entre les images (Do timelapse), le nombre de positions de la blessure pris en photo.



Figure 24: Photographie illustrant le dispositif de vidéomicroscopie : un microscope inversé équipé d'une chambre de culture thermostatée et régulée en CO2. Il est connecté à une caméra CCD et dirigé par un Logiciel Metamorph.

II-5-4- Analyse de la migration cellulaire en 2 dimensions (2D)

Une fois l'acquisition des photos de la blessure terminée, on effectue le suivi du déplacement de cellules individuelles toutes les heures et durant 48h (5 cellules au niveau de chaque blessure, 3 blessures, soit 15 cellules au total) grâce au logiciel Qmig-2D (quantification de la migration en 2D), permettant ainsi d'analyser la migration des cellules en deux dimensions. Ce logiciel permet de quantifier la vitesse de migration et de visualiser la trajectoire propre de chaque cellule choisie suivie en fonction des coordonnées x et y et du temps.

II-6- Etude de l'adhésion cellulaire

L'adhésion cellulaire se fait sur des plaques non traitées de 96 puits, en présence ou absence des différentes séquences peptidiques du domaine NC1 du collagène XIX. Le domaine NC1 du collagène XIX ou ses peptides dérivés sont immobilisés au fond des puits (10 μ g de peptide par puits) suite à un coating d'une nuit sous hotte à flux laminaire, à température ambiante (solution de PBS et bicarbonate de sodium v/v). Les cellules sont introduites dans les puits (2.10⁴ cellules/ puits / 100 μ l de milieu) et incubées pendant 30 min. Le nombre de cellules ayant adhéré est alors mesuré par la technique au cristal violet. Pour cela le milieu est retiré et remplacé par 100 μ l de glutaraldhéyde pour la fixation des cellules. Les plaques sont rincées par du PBS après avoir retiré le glutaraldhéyde, puis 100 μ l de cristal violet sont ajoutés pendant 15min suivi d'un lavage par H₂O. A la fin, on ajoute 100 μ l d'acide acétique par puits pour une durée de 15min, pour extraire la coloration et on procède à une lecture de DO à 595nm.

II-7- Etude de l'angiogenése in vitro: Formation des pseudotubes sur Matrigel®

Les cellules endothéliales, cultivées sur un gel de Matrigel® équivalent à une membrane basale, forment spontanément des pseudotubes. Ces structures sont comparables à des néovaisseaux sanguins mais non fonctionnels.

Une solution de Matrigel® (ECM gel : 10 mg/mL) est déposée au fond de chaque puits (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 (1.10⁵/puits) sont ensuite déposées à la surface du gel et incubées dans le milieu ECGM additionné de 1 % de SVF en présence ou en absence des peptides à tester. La formation des 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-8- Mèthodes d'études in vivo

II-8-1- Modèle animal de mélanome murin

Nous avons utilisé des souris C57/Bl6 qui sont des souris noires à croissance rapide. 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. Toutes les manipulations sont effectuées en respectant les règles et l'éthique de l'expérimentation animale selon les recommandations du comité d'éthique de l'IFR 53.

II-8-2- 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, anesthésié et rasé, à raison de $2,5.10^5$ cellules au jour J0. Ceci 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 à l'aide d'un pied à coulisse. Le volume tumoral est calculé selon la formule L× $1^2/2$. Aux jours 7 et 14 suivant l'injection initiale, les souris reçoivent une injection du peptide à tester (10 mg/kg) par voie intra-péritonéale. Elles sont sacrifiées entre 14 et 18 jours, par inhalation de CO2, et anesthésie par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine/xylazine.

Les tumeurs développées sont ensuite extraites chirurgicalement pour l'étude histologique et immunohistochimique et biochimique.

II-9- Extraction des protéines à partir des tissus tumoraux

Les tumeurs formées à la suite d'injection des cellules tumorales sont extraites chirurgicalement après 2 à 3 semaines. Chaque tumeur obtenue est coupée en petits morceaux à l'aide d'un scalpel sur une plaque en verre. Ces morceaux sont placés dans un potter et broyés dans 500µl de tampon (Tris 50mM, NaCl 0,5M, SDS0, 1%, NaN3 0, 02%, EDTA5mM, Iodoacétamide1mM, PMSF 1Mm). Le broyat obtenu est vortexé et transferé dans un microtube. Après une sonication de 10 secondes, l'homogénat obtenu est incubé pendant une nuit sous agitation à 4°C. Les extraits protéiques à analyser se trouvent dans les surnageants récupéres après centrifugation (10 000 g pendant10 min à 4°C).

II-10- Dosage des protéines

Les protéines des tumeurs sont dosées selon la technique de Bradford utilisant un kit de dosage Biorad (Biorad Protein-Assay).Cette technique se base sur un dosage colorimétrique mesurant le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines.

Le dosage des protéines s'effectue dans un volume final de 1000 μ l, contenant 2 μ l de nos échantillons protéiques, 798 μ l de H₂O et 200 μ l de réactif Bio-Rad Assay.

Une gamme étalon est préparée dans les mêmes conditions en présence de BSA (Sérum Albumine bovine) afin de déterminer la concentration protéique de nos échantillons en $\mu g/\mu l$. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance de nos échantillons est déterminée à la longueur d'onde de 595nm.

II-11- Immunodétection: Western Blot

C'est une méthode de détection de protéines spécifiques dans un échantillon biologique, après séparation par éléctrophorése en gel de polyacrylamide –SDS. Les extraits protéiques sont additionnés à un tampon échantillon (Tampon 5X : 0,5M Tris pH 6,8,

10% SDS, glycérol, bleu bromophénol) contenant 3% de β-mercaptoéthanol, chauffés à 90°C pendant 3 minutes afin de permettre la dénaturation des protéines. Les protéines de l'échantillon sont séparées selon leurs taille par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (30 % d'acrylamide) pendant 20 minutes à 100V puis pendant 45 minutes à 200V. A la fin de la migration, le gel est équilibré dans le tampon de transfert (Tris 48 mM pH 8,2, glycine 39 mM, méthanol 20 % (v/v)) pendant 30 minutes.

Les protéines sont transférées sur une membrane Immobilon (P-Transfer menbrane Milipore) sous l'effet d'un voltage constant (100V) durant 45 minutes. La membrane est activée au préalable dans le méthanol (15 secondes) et réhydratée par le tampon de transfert (5 minutes).

Après le transfert, la membrane est récupérée, incubée dans un tampon de blocage composée par 5% de lait écrémé dilué dans du TBS-T (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % (v/v)) durant deux heures, sous agitation et à température ambiante.

La membrane est ensuite incubée toute une nuit à 4°C sous agitation lente avec l'anticorps primaire dilué dans une solution de saturation à 5% de lait écrémé dans du TBS-T. Le lendemain, la membrane est incubée durant 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).

Suite aux rinçages de la membrane au TBS-T (3x10minutes) et TBS (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, 1x10 minutes) les protéines sont révélées par chimioluminescence (kit ECLTM).

Après la révélation, un second western blot est effectué sur la même membrane avec un anticorps primaire anti-actine dans le but de contrôler la quantité de protéines déposées.

II-12- Etude des protéases par zymographie

Le principe de cette technique consiste en une séparation électrophorétique des protéines dans un gel de polyacrylamide SDS imprégné de gélatine. La séparation électrophorétique des protéinases se fait en fonction de leur masse moléculaire.

Les gélatinases sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat, ce qui se traduit, après coloration du gel au bleu de coomassie G250, par des bandes blanches sur fond bleu.

II-12-1- Zymographie en gel de gélatine

Les échantillons sont additionnés avec du bleu d'échantillon, puis séparés sur un gel de polyacrylamide 10%, SDS 0,1% et contenant 0,1% de gélatine.

La migration s'effectue à 4°C pendant 30 min sous une tension constante de 90 V, dans un tampon de migration

A l'issu de la migration, le gel est lavé 2 fois pendant 30 min dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (v/v) afin d'éliminer le SDS et renaturer les protéinases.

Le gel est ensuite mis à incuber une nuit à 37°C dans un tampon d'incubation (Tris 50mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5mM, 2H₂O 5mM, pH 7,6) permettant la protéolyse de la gélatine par les enzymes protéolytiques initialement présentes dans les échantillons.

A la fin de l'incubation, le gel est coloré pendant 30min par une solution de coloration au bleu de Coomassie G-250 (G-250), puis décoloré par une solution de décoloration contenant 10% d'acide acétique, 20% de méthanol.

Les bandes blanches qui apparaissent sur un fond bleu correspondent aux zones de digestion par les gélatinases.

Les gels sont photographiés et les bandes blanches quantifiées par analyse d'image (Vilbert Lourmat) à l'aide du logiciel Bio1D.

II-12-2- Zymographie en gel de gélatine/ plasminogéne

Cette technique permet de mettre en évidence les activateurs du plasminogène (activateur de type tissulaire tPA et urokinase uPA). Le procédé est identique à celui de la zymographie en gel de gélatine, mais du plasminogène (0,25 U/gel) est ajouté au gel d'acrylamide imprégné de gélatine. Après migration et lavage au Triton, le gel est incubé une nuit à 37°C dans un tampon d'incubation contenant de la glycine 10mM et de l'EDTA 5mM à pH8.

II-12-3- Zymographie inversée

C'est une technique qui permet de mettre en évidence les TIMPs. Le principe est le même que pour la technique de zymographie classique. On incorpore 200 ng de proMMP-2 purifiée au gel d'acrylamide et de gélatine. Pendant l'incubation, la MMP-2 dégrade la gélatine, de sorte que seules les zones protégées par les TIMPs apparaissent colorées au bleu de Coomassie (DeClerck, 1988).

II-13- Etude d'immunocytochimie

Les cellules sont ensemencées (2.10⁴ cellules/puits) sur des lamelles de verre couvertes ou non avec la fibronectine (1mg/ml) et placées au fond des puits de plaque de 24 puits, dans leur milieu adéquat en présence ou non du NC1(XIX). Après 24 heures, les cellules sont fixées et perméabilisées par le paraformaldhéyde pendant 15 minutes. Suite à un rinçage à la PBS, les cellules sont incubées dans une solution de saturation (PBS contenant 3% de SAB et 1% de

triton) pendant 30 minutes. A la fin de la saturation, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire de la vinculine (dilué au 1/100 dans de la PBS contenant 1% de SAB) durant une nuit en chambre froide.

Les cellules sont ensuite lavées 2 fois 5 minutes avec de la PBS, puis incubées pendant 2 heures à température ambiante et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexafluor 568(dilué au 1/50 dans de la PBS) et aussi l'anticorps de l'actine étant la phalloïdine couplée à l'Alexa fluor ® 488 (dilué au 1/50 dans de la PBS). Les lamelles sont rincées 3 fois avec de la PBS, retirées des puits de la plaque et montées sur lame, sur laquelle 10µl de cytofluor (solution permettant de réduire la perte de fluorescence après illumination) sont déposées au préalable. La lame et la lamelle sont ensuite collées à l'aide d'un vernis à ongle. L'observation des cellules est réalisée à l'aide d'un microscope confocal.

II-14- Tests statistiques

Tous les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± écart-type. Pour toutes nos expériences, nous avons utilisés les tests statistiques suivants :

- Test non paramétrique de Mann et Withney pour les résultats obtenus in vivo.
- Test paramétrique t de Student pour les résultats obtenus in vitro, afin de comparer les groupes traités aux groupes contrôle.

Les niveaux de probabilité sont schématisés comme suit :

NS= non significatif

*=p<0,05

**=p<0,01

***=p<0,001

Résultats

Résultats

Nous nous sommes intéressés aux activités biologiques du domaine NC1 du collagène de type XIX, encore non décrites à ce jour. Nous avons étudié les effets du domaine NC1 de la chaîne α 1 du collagène de type XIX et les peptides qui en sont dérivés sur certains paramètres de la progression tumorale: prolifération cellulaire, migration cellulaire, angiogenése. Nous visons la détermination de la séquence minimale active du domaine NC1 (XIX) responsable de l'effet anti-tumoral

Pour cela nous avons utilisé un peptide synthétique reproduisant la séquence du domaine NC1(XIX), soit NPEDCLYPVSHAHQRTGGN. Nous avons également étudié les peptides P10, P8, et P6 (constitués des 10, 8 et 6 premiers acides aminés du domaine NC1 du collagène XIX) et un peptide P19 muté (P19m) où on a remplacé les acides aminés Proline par des Glycine (P19m: NGEDCLYGVSHAHQRTGGN). Nous avons utilisé également des peptides P1 : EDCLYPVS, P2 : DCLYPVS, et P3 : CLYPVS (figure 25).



NC1(XIX):NPEDCLYPVSHAHQRTGGNP10:NPEDCLYPVSP8:NPEDCLYPP6:NPEDCLP19 m:NGEDCLYGVSHAHQRTGGNP1:EDCLYPVSP2:DCLYPVSP3:CLYPVS

Figure 25: Composition en acides aminés des différents peptides dérivés de NC1(XIX)

I- Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différentes séquences peptidiques dérivées sur la croissance tumorale *in vivo*

Nous avons étudié la croissance tumorale des cellules de mélanome B16F1, *in vivo*, chez la souris. L'injection, par voie sous-cutanée, de 2,5.10^s 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 et les tumeurs développées sont extraites chirurgicalement pour l'étude histologique et immunohistochimique.

Le traitement des souris au jour 7 et au jour 14, par une injection intra-péritonéale de NC1 (XIX) (10 mg/kg) ou son peptide dérivé P10, entraîne une forte inhibition de la croissance tumorale par rapport aux groupes traités avec une solution saline, ou avec le peptide scrambled. Cette inhibition est très forte dès J12 par NC1 (XIX) complet et P10, puisque la réduction du volume tumoral est d'environ 70 % et se maintient jusqu'à J18, jour de sacrifice des animaux. (Figure 26). Le peptide P8 parait moins actif *in vivo* que le peptide P10. Le peptide P6 est sans effet.



Figure 26: Inhibition de la croissance tumorale in vivo en présence des différents peptides du domaine NC1 (XIX) Injections intrapéritonéales de NC1 (XIX) ou de ses peptides dérivés 10 mg/kg aux jours 7 et 14, Moyenne de 8 souris ± 1SD; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

L'étude de la croissance tumorale après injection sous-cutanée des cellules de mélanome B16F1, montre bien l'effet anti-tumoral du domaine NC1 du collagène de type (XIX). Cet effet anti-tumoral est aussi obtenu par le peptide P10 (constitué des 10 premiers acides aminés du domaine NC1 du collagène XIX), qui parait être la séquence minimale la plus active du domaine NC1(XIX) à effet anti-tumoral.

II- Effets du domaine NC1 du collagène XIX et ses différents peptides sur l'expression des protéinases dans les tumeurs *in vivo*

L'invasion tumorale dépendant fortement de l'expression des protéinases, nous avons étudié dans les tumeurs collectées l'expression et l'activité des principales protéases impliquées dans le processus invasif.

II-1- Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différents peptides sur l'expression de la MT1-MMP *in vivo*

Les tumeurs formées à la suite d'injection des cellules tumorales (selon les conditions décrites pour la figure 26 page 77) ont été collectées après sacrifice des animaux à J 21 et les protéines ont été extraites des tissus tumoraux puis utilisées pour analyses. Pour déterminer l'expression de la MT1-MMP, nous avons effectué un western blot. Celui –ci n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative de l'expression de la MT1-MMP dans les tissus tumoraux provenant des souris ayant reçu les injections de NC1(XIX) et ses différents peptides dérivés (figure 27).



Figure 27: Expression de l'activité de la MT1-MMP dans les extraits de tumeurs obtenues après injection de cellules B16F1 chez les souris contrôles ou traitées par NC1(XIX) ou ses peptides dérivés P10, P8, P6 (Scrb: scrambled peptide) Les souris ont reçu une injection intra-péritonéale de NC1(XIX) ou de ses peptides dérivés (10mg/kg) aux jours 7 et 14 et les tumeurs collectées à J 21

II-2- Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression des MMP- 2 et 9 et les TIMPs *in vivo*

La MMP-2 et la MMP-9 sont les enzymes clé de la dégradation de la matrice cellulaire au cours de l'invasion tumorale. L'effet du NC1(XIX) et ses peptides dérivés (P10, P8 et P6) sur la sécrétion de ces enzymes a été étudiée par zymographie en gel de gélatine sur des protéines extraites de tissus tumoraux.

Le zymogramme montre que le peptide NC1 (XIX) et ses peptides dérivés à la concentration de 30µM n'ont aucun effet sur la sécrétion de la MMP-2 et la MMP-9 (figure 28 A). En présence du NC1(XIX) et ses différents peptides, le zymogramme inverse ne révèle aucune modification de la sécrétion des TIMPs (figure 28 B).





Les protéines sont extraites des tissus tumoraux traités ou non par le NC1(XIX) et ses peptides dérivés. Les protéines tumorales sont analysées en zymographie gélatine (A) et en zymographie inverse (B)

Les souris ont reçu une injection intra-péritonéale de NC1(XIX) ou de ses peptides dérivés (10mg/kg) aux jours 7 et 14 et les tumeurs collectées à J 21

II-3- Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression d'activateurs du plasminogéne *in vivo*

En zymographie en gel de gélatine-plasminogéne, on observe que NC1(XIX) parait induire une diminution de l'expression de l'activateur du plasminogéne de type uPA dans les extraits de tumeurs provenant des souris traitées par NC1(XIX) (figure 29). Nous n'avons pas observé la présence de tPA.



Figure 29: Effet du domaine NC1(XIX) sur l'expression de l'activateur du plasminogéne uPA dans les extraits de tumeurs de souris traitées par NC1(XIX)

Les protéines sont extraites des tissus tumoraux traités ou non par le NC1(XIX) (Scrb: scrambled peptide).

Les protéines tumorales sont analysées en zymographie gélatine-plasminogéne

III- Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différents peptides dérivés sur les cellules cancéreuses murines *in vitro*

III-1- Cellules de mélanome B16F1

III-1-1-Etude de la prolifération cellulaire

La prolifération des cellules de mélanome murin B16F1 a été étudiée en présence ou en absence du domaine NC1 du collagène XIX et ses différentes séquences peptidiques dérivées à différentes concentrations (30µmol/L, 60µmol/L, 120µmol/L), après 24h et 48h d'incubation, par réduction du réactif WST-1[®].

Le domaine NC1(XIX) et ses peptides dérivés n'altèrent pas la prolifération des cellules de mélanome B16F1 à la concentration de 30μ mol/L. Une diminution de la prolifération est obtenue par incubation des cellules avec NC1(XIX) à 120μ mol/L et ses peptides P8 et P6 à des concentrations de 60 et 120μ mol/L (figure 30).



Figure 30: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différentes séquences peptidiques dérivées sur la prolifération des cellules de mélanome B16F1 après 48h et à différentes concentrations (30μmol/L, 60μmol/L, 120μmol/L) Moyenne de 4 déterminations ± 1SD;* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

III-1-2- Etude de la migration cellulaire

La migration cellulaire a été étudiée par la technique de blessure artificielle *in vitro*. A confluence, une blessure artificielle est tracée dans le tapis cellulaire, à l'aide d'une pointe de pipette. Les cellules sont incubées seules, ou avec les différents peptides du domaine NC1 du collagène XIX à la concentration de 30µmol/L.

La migration cellulaire est déterminée par la capacité qu'ont les cellules à recouvrir la surface de la blessure. La figure 31 montre la différence de taille de la blessure entre J0 (jour de la blessure) et 24h d'incubation avec le domaine NC1(XIX) et ses peptides dérivés. Une inhibition de la migration des cellules B16F1 est obtenue après incubation de 24h avec NC1(XIX) complet par comparaison avec les cellules contrôles. Le peptide P10 tend à reproduire l'effet de NC1(XIX) complet mais une dispersion plus importante des résultats empêche d'atteindre le seuil de significativité statistique. Les peptides P8 et P6 dérivés du domaine NC1(XIX) n'inhibent pas la migration cellulaire.



Figure 31: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et ses différentes séquences peptidiques sur la migration des cellules B16F1 après 48h et à la concentration de 30µmol/ L (Moyenne de 8 déterminations ± 1SD) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

III-1-3- Etude de l'adhésion cellulaire

L'adhésion des cellules B16F1 a été mesurée par coloration des noyaux au violet cristal, 30 minutes après dépôt des cellules sur des plaques de culture tapissées ou pas par le domaine NC1 (XIX) et ses peptides dérivés à la concentration de 30µmol/L. La figure 32 montre que le domaine NC1 (XIX) et ses peptides dérivés ne modifient pas significativement l'adhésion des cellules B16F1.



III-2- Cellules de mélanome B16F10

Pour compléter les premiers résultats, nous avons testé l'effet du domaine NC1(XIX) et son dérivé P10 sur des cellules de mélanome murin B16F10, lignée cellulaire hautement agressive et métastasique. Ces cellules expriment d'avantage à leurs surfaces l'intégrine $\alpha_5\beta_{1,}$ impliquée dans l'invasion du mélanome (Qian F et al 2005).

III-2-1- Etude de la prolifération des cellules B16F10

La prolifération des cellules de mélanome murin B16F10 a été étudiée par colorimétrie avec le réactif WST-1[®] en présence ou en absence des différentes séquences peptidiques du domaine NC1 du collagène XIX à la concentration de 30μ mol/L.

L'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Cette mesure est directement proportionnelle aux nombres de cellules présents dans le puits.

La figure 33 montre que le domaine NC1 (XIX) et son peptide dérivé P10 ne modifient pas la prolifération des cellules B16F10 à la concentration de 30µmol/L après 24h et 48h.



Figure 33: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la prolifération des cellules B16F10 après 24 et 48h à la concentration de 30µmol/L (Moyenne de 4 déterminations ± 1SD; pas de différence significative) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

III-2-2-Etude de la migration des cellules B16F10 en présence du domaine NC1 (XIX) et ses séquences peptidiques dérivées

III-2-2-1-Fermeture de la blessure artificielle à 48 heures

La migration des cellules B16F10 (5.10^4 cellules/puits dans 1ml de milieu à 1% de SVF) a été étudiée par la technique de blessure artificielle (réalisée avec une pointe de pipette) en présence et absence des différents peptides du domaine NC1 (XIX) à la concentration de 30μ mol/L.

La figure 34 montre qu'après 48 heures d'incubation des cellules B16F10 avec les différents peptides, la blessure artificielle réalisée dans le tapis cellulaire est refermée totalement en absence des peptides. Les cellules incubées avec le domaine NC1(XIX) 30µM présentent une blessure qui persiste après 48heures. Le peptide P10 a un effet inhibiteur qui reste moins important sur 48heures par comparaison avec le NC1(XIX) 30µM. Les autres peptides (P8 et P6) n'ont pas d'effet.



Figure 34: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide P10 sur la migration des cellules B16F10 après 48h à la concentration de30μmol/L Moyenne de 8 déterminations ± 1SD;* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

III-2-2-2- Effet d'une addition de peptide P10 frais à la 12éme heure sur la migration des cellules B16F10

Cette manipulation a été effectuée sur le vidéomicroscope. La migration des cellules B16F10 a été étudiée en présence du peptide P10 à la concentration de 30µmol/L, avec addition de peptide frais à la même concentration au bout de 12h de migration. Dans ces conditions, une inhibition d'environ 50% de la migration cellulaire a été observée après 12 heures et 24 heures. Ces résultats montrent que l'effet anti-migratoire du peptide P10 disparaît après 24h, mais que l'ajout de P10 frais au bout de 12h permet le maintien de l'effet antimigratoire (figure 35).



- Figure 35 : Effet du peptide P10 dérivé du domaine NC1 (XIX) sur la migration des cellules B16F10 après 24h et à la concentration de 30µmol/L (Ajout de peptide frais dans le milieu après 12h)
- Moyenne de 6 déterminations ±1SD; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001
- Photos: Aspects représentatifs à t0, t12h et t24h
- La ligne noire indique les berges de la blessure

III-2-2-3- Etude de la migration des cellules B16F10 en présence de NC1(XIX) à concentrations croissantes

Les cellules B16F10 sont incubées pendant 24h avec le domaine NC1 (XIX) complet à concentrations croissantes (30, 60, et 120 μ mol/L). La blessure des cellules incubées avec le NC1(XIX) à 30 μ M et 60 μ M persiste après 24heures d'incubation par comparaison avec celle des cellules contrôles. Le NC1 (XIX) à concentration plus forte 120 μ mol/L n'a pas d'effet supplémentaire. L'inhibition de la migration obtenue est statistiquement significative (P<0,001) à 30et 60 μ mol/L (figure 36). Les concentrations élevées de NC1 (XIX) n'induisent pas de cytotoxicité.



Figure 36 : Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur la migration des cellules B16F10 après 24h à la concentration de 30, 60, et 120µmol/L

- Moyenne de 8 déterminations± 1SD; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001
- Photos : aspect des blessures à T0 et après 24h d'incubation dans les différentes conditions
- La ligne blanche indique les berges de la blessure

III-2-2-4- Effet du domaine NC1 du collagène XIX sur l'expression de la MMP-2/MMP-9 dans les cellules B16F10 en culture

Les cellules B16F10 ont été incubées en absence et en présence du NC1(XIX) pendant 48 heures à la concentration de 30 et 60 µmol/L. Nous n'avons pas observé de modification significative de la sécrétion de la MMP-2 ou de la MMP-9 (figure 37).



Figure 37: Effet du domaine NC1(XIX) à différentes concentrations sur la sécrétion des MMP-2 et MMP 9 par les cellules de mélanome

Les cellules B16F10 sont cultivées 48 heures, en présence et absence de NC1(XIX) à la concentration de 30µMet 60µM en absence de SVF. Les milieux de culture sont analysés par zymographie en gel de gélatine

III-2-3-Etude de la migration cellulaire par vidéomicroscopie

Nous avons étudié la migration des cellules B16F10 par vidéomicroscopie en présence et absence du domaine NC1 (XIX) ou de son peptide dérivé P10 à la concentration de 30µmol/L. L'étude de la migration cellulaire par vidéomicroscopie permet d'analyser en deux dimensions l'ensemble des mouvements cellulaires, les trajectoires, les positions, et les vitesses selon les axes X, Y au cours du temps.

La migration des cellules B16F10 a été étudiée dans un modèle de blessure cicatricielle obtenue par l'utilisation d'inserts de culture (Ibidi®). Les capacités migratoires des cellules sont déterminées par l'aptitude qu'ont les cellules à recouvrir la surface de la blessure. Une inhibition de la migration est obtenue lors de l'incubation des cellules B16F10 avec le domaine NC1 (XIX) à 30 μ mol/L. Après 24h, la différence de la taille de la blessure est plus petite en présence de NC1(XIX) 30 μ M par comparaison avec les cellules contrôles. Le peptide P10 (30 μ M) induit une inhibition moins importante que le NC1(XIX). Ceci confirme qu'il perd son effet anti-migratoire lorsqu'on ne l'ajoute pas après 12 heures (figure 38).



Figure 38: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide P10 sur la migration des cellules B16F10 après 24h à la concentration de 30µmol/L Moyenne de 6 déterminations± 1SD;* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

- Photos : aspect des blessures à t0 et après 24h d'incubation dans les différentes conditions

- La ligne blanche indique les berges de la blessure

III-2-3-1-Analyse de la migration en 2 dimensions (Qmig-2D)

III-2-3-1-1-Analyse des trajectoires de migration

Les trajectoires des cellules B16F10 ont été suivies à l'aide du logiciel Qmig-2D (15 cellules suivies au hasard). Elles sont analysées en fonction des déplacements le long des axes X, Y et du temps. Chaque cellule est représentée par un point coloré et chaque trajectoire représente le déplacement de la cellule dans la blessure au cours de la période d'observation (figure 39).

La représentation des trajectoires met en évidence que toutes les cellules se déplacent en absence du NC1(XIX) et son dérivé. Elles effectuent des mouvements globalement ordonnés selon l'axe des X, ce qui tend à la fermeture de la blessure, et n'effectuent pas des grands déplacements selon la direction de l'axe des Y.

En présence de NC1(XIX) 30µM ou du peptide P10 à la même concentration, le déplacement des cellules sur l'axe des X est plus court, les mouvements cellulaires sont moins ordonnés, s'effectuent aléatoirement. Elles peuvent aussi effectuer des déplacements selon l'axe des Y et des mouvements «d'aller et retour» dans la blessure. Ces déplacements cellulaires désordonnés ne permettent pas aux cellules de recouvrir correctement la blessure (figure39).


Figure 39: Trajectoire de migration des cellules B16F10 en présence et absence du NC1(XIX) et son peptide dérivé P10 à la concentration de 30µmol/L (Les trajectoires individuelles de 15 cellules choisies au hasard sont représentées, les échelles sont exprimées en pixels)

III-2-3-1-2- Analyse des positions des cellules au cours de la migration

L'analyse des positions des cellules selon les axes X et Y en fonction du temps montre des différences en fonction de la présence ou absence du NC1(XIX) 30μ M et son peptide dérivé P10.

En absence des peptides, les cellules B16F10 se déplacent progressivement selon l'axe des X dans la blessure au cours de la migration. Les cellules incubées avec NC1(XIX) ou son peptide dérivée P10 ont des déplacements moins importants selon l'axe des X, alors que leurs déplacements selon l'axe des Y ne sont pas modifiés (figure 40).



(Moyenne de 15 déterminations ± 1 SD) ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

III-2-3-1-3- Analyse de la distance de migration

Le calcul de la distance totale parcourue par les cellules montre qu'il n'existe pas de différence significative de ce paramètre en présence de NC1 (XIX) ou de P10 (figure 41).



III-2-3-1-4- Analyse de la vitesse de migration

L'analyse des vitesses de migration obtenues par enregistrement des déplacements des cellules montre que l'addition de NC1(XIX) (30μ mol/L) induit une diminution significative (p<0,05) de la vitesse de migration après 24 heures en comparaison avec la vitesse des cellules contrôles (tableau 7).

	Contrôle	NC1(XIX)	P10
12 heures	$6,14 \pm 1,19$	$6{,}00\pm0{,}87$	$6,24 \pm 1,29$
24 heures	7,68 ± 1,49	6,64 ± 0,82 *	6,46 ± 2,19

Tableau 7 : Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur la vitesse de migration des cellules B16F10 (µm/h)

(Moyenne de 15 déterminations ± 1SD ; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001)

III-2-4- Etude d'autres peptides dérivés du domaine NC1 (XIX) sur les cellules B16F10 in vitro

Nous avons testé in vitro l'effet des peptides (P1 : EDCLYPVS, P2 : DCLYPVS, P3 : CLYPVS) dérivés du domaine NC1(XIX) sur la prolifération et la migration des cellules B16F10.

III-2-4-1-Etude de la prolifération cellulaire

La prolifération des cellules B16F10 a été étudiée par colorimétrie avec le réactif WST-1[®]. L'incubation des cellules B16F10 pendant 24h et 48h avec les différents peptides P1, P2, et P3 dérivé du domaine NC1(XIX) à la concentration de 30µmol/L ne modifie pas la prolifération cellulaire (figure 42).



■ Contrôle □ NC1(XIX) ■ P1 □ P2 □ P3

Figure 42: Effet des peptides P1, P2, P3 du domaine NC1(XIX) sur la prolifération des cellules B16F10 à la concentration de 30µmol/L (Moyenne de 4 déterminations±1SD. Pas de différence significative) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

III-2-4-2- Etude de la migration des cellules B16F10

L'addition des peptides (P1, P2, P3) dérivés du domaine NC1(XIX) au milieu de culture n'inhibe pas la migration des cellules B16F10. La blessure artificielle des cellules incubées avec les différents peptides dérivés du domaine NC1 (XIX) présente la même taille que celle des cellules incubées en absence des différents peptides (figure 43).



Figure 43: Effet des peptides P1, P2, P3 dérivés du domaine NC1 du collagène XIX sur la migration des cellules B16F10 à la concentration de 30μmol/L (Moyenne de 8 déterminations±1SD. Pas de différence significative) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001</p>

IV- Effet du peptide P19 muté (P19m) sur les cellules cancéreuses B16F10 in vitro

Nous avons testé in vitro l'effet d'un peptide synthétique P19 muté (P19m) reproduisant la séquence du domaine NC1(XIX) où les résidus de Proline ont été remplacés par des résidus de Glycine (P19m: NGEDCLYGVSHAHQRTGGN).

IV-1-Etude de la prolifération cellulaire

La prolifération des cellules B16F10 a été étudiée par colorimétrie avec le réactif Wst-1[®]. Comme pour NC1(XIX), l'addition du peptide P19m à la concentration de 30µmol/L dans le milieu de culture ne modifie pas la prolifération des cellules B16F10 après 24 et 48 heures (figure 44).



IV-2-Etude de la migration cellulaire

Nous avons montré que le domaine NC1(XIX) inhibe la migration des cellules B16F10 in vitro dans le modèle de blessure artificielle.

La migration des cellules B16F10 a été étudiée dans le modèle de la blessure artificielle en présence du peptide P19m à 30μ mol/L. La figure 45 montre qu'après 36 heures d'incubation des cellules dans le milieu de culture supplémenté en P19m 30μ M, la blessure artificielle réalisée dans le tapis cellulaire à T0, est refermée. A l'opposé, lorsque les cellules B16F10 sont incubées avec NC1(XIX) 30μ M, la blessure persiste toujours après 36 heures d'incubation par comparaison avec les cellules contrôles. La modification du domaine NC1(XIX) par mutation des acides aminés Proline en Glycine fait donc perdre au peptide son effet anti-migratoire.



Figure 45: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et du peptide muté (P19m) à 30µM sur la migration des cellules B16F10 (Moyenne de 15 déterminations±1SD) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 Photos e opport des bloggages à 0h 12h et 36h d'incubation dong les différentes conditions

Photos : aspect des blessures à 0h, 12h et 36h d'incubation dans les différentes conditions
La ligne blanche indique les berges de la blessure

V -Effet de NC1 (XIX) et ses différentes séquences peptidiques dérivées sur les cellules humaines in vitro

Le domaine NC1(XIX) possède des propriétés anti-tumorales. Il inhibe la migration des cellules de mélanome murin *in vitro*, et la croissance tumorale dans le modèle expérimental du mélanome B16F1 de la souris *in vivo*. Le peptide P10 dérivé de ce domaine NC1 (XIX) présente les mêmes propriétés que le domaine NC1(XIX) complet. Afin de vérifier si les effets anti-tumoraux de NC1 (XIX) pouvaient également s'exercer sur des cellules humaines, une nouvelle étude de la progression tumorale a été réalisée *in vitro* sur des cellules de mélanome humain (UACC 903) et des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC).

V-1- Cellules de mélanome humain: UACC 903

Nous avons étudié l'effet du domaine NC1(XIX) et de son peptide dérivé P10 sur la prolifération et la migration des cellules de mélanome humain UACC903, cellules de mélanome agressives et hautement métastasiques.

V-1-1-Etude de la prolifération cellulaire

L'incubation des cellules UACC 903 avec le domaine NC1(XIX) et son peptide dérivé P10 à la concentration de 30µmol/L, après 24 et 48h n'entraîne aucun effet significatif sur la prolifération cellulaire (figure 46).



Figure 46: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la prolifération des cellules UACC903 à la concentration de 30µmol/L (Quantification par le test Wst-1[®], moyenne de 4 détermination±1SD, pas de différence significative) * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

V-1-2- Etude de la migration cellulaire

V-1-2-1- Fermeture de la blessure artificielle

Les capacités migratoires des cellules UACC 903 in vitro ont été testées dans le systéme Ibidi®, où la blessure artificielle est réalisée par des inserts de silicone placés au fond des puits. Après 24h d'incubation des cellules à 37°C avec ou sans le NC1(XIX) ou son peptide dérivé P10, la migration cellulaire est déterminée par l'aptitude qu'on les cellules à recouvrir la blessure.

La figure 47 montre que les cellules UACC 903 incubées avec le domaine NC1(XIX) à la concentration de 30 μ M présentent une inhibition significative (p<0,01) de leurs capacités migratoires.

La migration des cellules UACC903 incubées avec le peptide P10 (30µM) est aussi inhibée (p<0,001) par comparaison avec les cellules contrôles.



Figure 47: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la migration des cellules UACC903 à la concentration de 30μmol/L Moyenne de 6 déterminations ±1SD; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001
Photos: aspect des blessures à t0 et à t24h d'incubation dans les différentes conditions
La ligne blanche indique les berges de la blessure

V-1-2-2- Etude de la migration des cellules UACC 903 en présence de NC1(XIX) à concentrations croissantes

La blessure des cellules UACC 903 incubées avec le NC1(XIX) à 30μ M et 60μ M persiste après 24heures d'incubation. L'inhibition de la migration obtenue est plus importante et statistiquement significative (P<0,05) à 60μ mol/L (figure 48).



VI- Effets du domaine NC1(XIX) sur les cellules endothéliales humaines

VI-1- Etude de la prolifération cellulaire

Cette étude a été effectuée par un dosage colorimétrique avec le réactif WST-1[®]. Le NC1(XIX) et le peptide P10 n'altèrent pas la prolifération des cellules HUVEC (5 .10⁴ cellules/puits) à la concentration de 30µmol/L, après une incubation de 24 et 48h (figure 49). Ce résultat est identique à celui précédemment obtenu au résultat avec les cellules de mélanome murin B16F10.



Figure 49: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et son peptide dérivé P10 sur la prolifération des cellules HUVEC à la concentration de 30μmol/L Dosage au WST-1[®]; moyenne de 4 déterminations± 1SD; pas de différence significative * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

VI-2- Etude de la migration cellulaire par vidéomicroscopie

La migration des cellules HUVECs est étudiée dans le modèle de blessure artificielle en présence et absence de NC1 (XIX) ou de son peptide dérivé P10 à la concentration de 30µmol/L. Elle est déterminée par l'aptitude qu'on les cellules à recouvrir la surface de la blessure. Une image de la blessure est prise toutes les heures par le vidéomicroscope. La figure 50 montre une inhibition de la migration des cellules HUVECs après 24 heures d'incubation avec le domaine NC1(XIX) et son peptide dérivé P10 à la concentration de 30µmol/L. Ces cellules incubées avec les peptides couvrent une surface plus petite de la

blessure artificielle par comparaison avec les cellules contrôles qui migrent jusqu'à ce que les 2 bords de la blessure se rejoignent pour fermer la blessure.



Figure 50: Inhibition de la migration des cellules HUVEC par le domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 - NC1(XIX) et P10 ont été ajouttés à la concentration de 30µmol/L

- Moyenne de 6 déterminations± 1SD; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001
- Photos: aspect des blessures à t0, et à 24h d'incubation dans les différentes conditions
- La ligne blanche indique les berges de la blessure

VI-2-1- Analyse de la migration des cellules HUVECs en vidéomicroscopie (Qmig-2D)

VI-2-1-1- Analyse des trajectoires de migration

Le suivi du déplacement individuel des cellules HUVECs a été réalisé grâce au logiciel Qmig-2D, qui permet d'analyser la migration des cellules en deux dimensions. Cette analyse permet de déterminer la vitesse de migration, et aussi d'enregistrer les trajectoires de chaque cellule au cours du temps de migration. Les trajectoires des cellules HUVECs sont déterminées en fonction de leur déplacement le long des axes X et Y et du temps.

On observe (figure 51) que les cellules contrôles présentent des déplacements importants et ordonnés au cours du temps selon l'axe des X, leur permettant ainsi de migrer loin dans la blessure.

Les cellules HUVECs incubées avec NC1(XIX) ou son peptide dérivé P10 présentent des déplacements réduits. L'inhibition de la migration peut être expliquée par des mouvements aléatoires qu'effectuent les cellules selon l'axe des Y, montrant une altération de la directionnalité de migration.



Figure 51: Trajectoire des cellules HUVECs en absence (ctrl) et en présence du domaine NC1(XIX) ou de son peptide dérivé P10 à la concentration de 30µmol/L Les trajectoires de 15 cellules choisies au hasard sont présentées. Les échelles sont présentées en pixels.

VI-2-1-2- Analyse des positions de migration

L'analyse des positions des cellules dans la blessure en fonction du temps de migration, selon l'axe des X et Y montre des différences significatives entre les positions des cellules contrôles et de celles incubées avec NC1(XIX) ou son peptide dérivé P10 à 30µmol/L. Les positions qu'occupent les cellules contrôles dans la blessure sont de plus en plus avancées sur l'axe des X au fur et à mesure qu'on avance dans le temps, alors que les cellules incubées avec NC1(XIX) et le peptide dérivé P10 à 30µmol/L occupent des positions retardées (Figure 52 A). Les cellules traitées avec le domaine NC1(XIX) et le peptide dérivé P10 paraissent présenter des déplacements plus important dans la blessure selon l'axe des Y (figure 52 B), évoquant une altération de la directionnalité de migration.



A- Position des cellules HUVECs en X



B- Position des cellules HUVECs en Y



■ Contrôle □ NC1(XIX)30µM II P10



VI-2-1-3- Analyse de la distance de migration

La distance de migration parcourue par les cellules contrôles dans la blessure est importante en fonction du temps de migration.

Une tendance à la diminution de la distance de migration (non statistiquement significative) est obtenue lors de l'incubation des cellules avec le domaine NC1 (XIX) et son peptide dérivé P10 à 30 μ M (Figure 53). Ceci peut être dû aux déplacements aléatoires effectués par les cellules, avec perte de la directionnalité de la migration.



Figure 53: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur la distance de migration des cellules HUVECs

(Moyenne de 15 déterminations±1SD); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

VI-2-1-4- Analyse des vitesses de migration

La comparaison des vitesses de migration des cellules HUVECs contrôles à celles incubées avec NC1 (XIX) et son peptide dérivé P10 montrent une tendance à la diminution de la vitesse de migration en présence du domaine NC1 (XIX) et son peptide dérivé P10 à la concentration de 30µmol/L (Tableau 8).

Pour le peptide P10, l'effet est moins marqué après 24heures qu'après 12 heures, ce qui confirme l'hypothèse d'un effet de plus courte durée pour ce peptide, déjà suggérée précédemment.

	Contrôle	NC1 (XIX)	P10
12 heures	14,68 ± 3,3	13,60 ± 2,7	12,92 ± 2,8
24 heures	14,90 ± 3,1	13,04 ± 2,0	13,95 ± 2,2

Tableau 8: Effet du domaine NC1 du collagène XIX et sa séquence peptidique dérivée P10 sur la vitesse de migration des cellules HUVECs (μm/h)

Moyenne de 15 déterminations±1SD

VI-3- Effets de NC1(XIX) et son peptide dérivé P10 sur la formation de pseudotubes

Les cellules endothéliales ensemencées sur Matrigel® forment spontanément des pseudotubes évoquant les premiers stades de formation de néo-capillaires. Bien que peu spécifique, cette propriété est recherchée en première intention pour étudier les capacités d'angiogenèse *in vitro*.

Les cellules HUVEC (5.10^4 cellules/puits), ensemencées sur Matrigel®, en plaque 24 puits sont incubées ou non en présence de NC1 (XIX) ou du peptide dérivé P10 (30μ mol/L). Après 24 heures d'incubation, on constate que les cellules contrôles s'organisent en pseudotubes. Cette capacité est nettement altérée lorsque le peptide NC1 (XIX) 30μ M ou son dérivé P10 30μ M sont ajoutés au milieu d'incubation (quantification réalisée avec le logiciel d'analyse d'images Image J). La mesure de la longueur des pseudotubes, permet de mettre en évidence une réduction de la formation de ces pseudotubes d'environ 35% dans les cultures incubées avec NC1(XIX) ou P10. Il existe toutefois une importante dispersion des résultats dans les cultures contrôle, qui empêche une significativité statistique.



Figure 54: Effet de NC1 (XIX) et du peptide dérivé P10 sur la formation de pseudotubes par les cellules HUVECs cultivées sur matrigel ®

(Quantification avec le logiciel Image J; moyenne de 3 déterminations ± 1 SD)

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

VII- Effet du domaine NC1(XIX) sur l'organisation du cytosquelette cellulaire

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr S. Brézillon dans notre laboratoire.

VII-1-Cellules tumorales B16F10

Les cellules tumorales B16F10 ont été ensemencées sur un coating de fibronectine ou sur des lames en verre. Elles ont été ensuite cultivées pendant 24 heures en présence ou absence du peptide NC1(XIX) à la concentration de 120µmol/L. Les cellules ont été observées en microscopie confocale suite à un immunomarquage utilisant des anticorps anti-actine et anti-vinculine. Les cellules incubées avec NC1(XIX) ne présentent pas de désorganisation significative du cytosquelette d'actine. En absence ou présence de NC1(XIX) à 120µM, les cellules tumorales présentent une même morphologie de structure sous forme de cellules étoilées, émettant des pseudopodes.

La vinculine est une protéine membranaire et cytosquelettique, présente au niveau des plaques d'adhésion focale. En absence ou présence de NC1(XIX), la vinculine est présente de la même façon au niveau des extrémités des pseudopodes émis par les cellules tumorales (figure 55).



Figure 55: Effet du peptide NC1(XIX) sur l'organisation du cytosquelette et distribution de la vinculine dans les cellules B16F10 après 24 heures d'incubation à la concentration de 120µmol/L

Cellules observées et photographiées à l'aide d'un microscope confocal La couleur rouge représente le marquage de la vinculine et la couleur verte représente le marquage de l'actine

VII-2- Cellules endothéliales: HUVEC

L'organisation du cytosquelette des cellules HUVEC a été étudiée par immunocytochimie avec les mêmes anticorps que ceux utilisés pour les cellules B16F10. Les cellules HUVEC incubées en absence ou présence de NC1(XIX) à la concentration de 30 et 60µmol/L présentent une morphologie inchangée, émettant des pseudopodes et un cytosquelette organisé. La vinculine est présente au niveau des plaques d'adhésion focale en présence ou absence de NC1 (XIX) et l'on n'observe pas de modification significatifve (figure 56).



Figure 56: Effet du peptide NC1(XIX) sur l'organisation du cytosquelette des cellules HUVECs après 24 heures d'incubation à la concentration de 30 et 60 µmol/L Cellules observées et photographiées à l'aide d'un microscope confocal La couleur rouge représente le marquage de la vinculine et la couleur verte représente le marquage de l'actine

Discussion

Discussion

L'invasion tumorale constitue la phase clé du processus cancéreux. Elle permet la progression et la dissémination des cellules cancéreuses dans l'ensemble de l'organisme, et leur transformation en cellules métastasiques. Les mécanismes de dispersion et d'invasion tumorale mettent en jeu des modifications d'interactions de cellules à cellules et de cellules à matrice extracellulaire. Les modifications des assemblages matricellulaires constituent le mécanisme déclencheur du processus métastasique.

La migration cellulaire constitue le point de départ du processus métastasique, permettant ainsi aux cellules cancéreuses de quitter le foyer primaire, de s'implanter et de proliférer ailleurs. Au cours de la migration, les cellules cancéreuses changent de forme et intéragissent avec les structures qui les entourent, en particulier les constituants de la matrice extracellulaire. L'acquisition des nouvelles propriétés biochimiques et caractéristiques morphologiques permet aux cellules cancéreuses de s'échapper de la tumeur primaire et de franchir la barrière biologique de l'invasion tumorale (Malo et coll 2006). A ceci s'ajoute l'expression d'enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire. La protéolyse partielle des constituants de la matrice libère des nouveaux peptides capables de moduler la progression tumorale et/ou l'angiogenése. Ces produits issues de la protéolyse des constituants de la matrice sont appelés des matrikines ou matricryptines (Simeon et coll 1999, Davis et coll 2000).

Les domaines C-terminaux (domaines NC1) de plusieurs types de collagènes associés à la membrane basale (types IV, XV, XVIII et XIX) sont des matrikines à propriétés antitumorales et anti-angiogéniques. C'est le cas de l'endostatine, domaine NC1 de la chaîne α 1 (XVIII), la restine, domaine NC1 de la chaîne α 1 (XV), la tumstatine, domaine NC1 de la chaîne α 3 (IV), la canstatine, domaine NC1 de la chaîne α 2 (IV) et l'arresténe, domaine NC1 de la chaîne α 1 (IV) (Maquart et coll 2004).

Le collagène de type XIX est un collagène mineur présent dans la zone de la membrane basale associé aux collagènes de type IV, XV, et XVIII (Myers et coll 1997). Initialement, il a été caractérisé par son implication dans les processus de différenciation musculaire et de morphogenèse (Sumiyoshi et coll 2001, Sumiyoshi et coll 2004). Le collagène de type XIX disparait au cours des phases précoces de la progression tumorale du cancer du sein (Amenta et coll 2003).

Notre laboratoire a montré que le collagène de type XIX est capable d'inhiber la progression tumorale dans un modèle expérimental de mélanome malin (Ramont et coll 2007). A partir de ces résultats sur la progression tumorale *in vivo*, nous nous sommes intéressés à préciser les effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques du domaine NC1 du collagène de type XIX, et tenter de caractériser sa séquence polypeptidique minimale active reproduisant les effets biologiques du peptide entier.

Effet biologiques de NC1(XIX)

Nous avons réalisé une étude *in vivo*, dans un modèle de mélanome murin, par injection de cellules B16F1 par voie sous-cutanée à des souris C57/B16. L'injection entraîne le développement de tumeurs sous-cutanées, dont on peut mesurer la croissance régulièrement. Un traitement des animaux par injections intra-péritonéales avec le domaine NC1 (XIX) a été réalisé aux jours 7 et 14 après l'induction des tumeurs. Nous avons observé qu'une inhibition de 70% de la croissance tumorale est induite par le domaine NC1(XIX).Cette étude de la croissance tumorale *in vivo* confirme bien l'effet anti-tumoral du domaine NC1 du collagène de type (XIX), propriété qui a été montrée par l'équipe du laboratoire. L'examen histologique des tumeurs des animaux traités avec le domaine NC1 (XIX) montrait une diminution de la vascularisation intratumorale, associée à une diminution de l'expression du VEGF (Ramont et coll 2007).

L'effet anti-tumoral du domaine NC1(XIX) observé *in vivo* n'est pas dû à l'inhibition de la prolifération ni à des modifications des capacités d'adhésion des cellules tumorales. Nous avons observé que le domaine NC1(XIX) ne modifie pas la prolifération ni l'adhésion des cellules de mélanome *in vitro*. Cet effet est retrouvé aussi bien pour les cellules de mélanome murin que pour les cellules de mélanome humain et aussi pour les cellules endothéliales humaines.

Cette absence d'effet du domaine NC1(XIX) sur la prolifération et l'adhésion des cellules tumorales a été précédemment décrite par l'équipe du laboratoire (Ramont et coll 2007). Ici, nous avons étudié la prolifération des cellules de mélanome murin B16F10 en présence du domaine NC1(XIX) pendant 24 heures en présence de concentrations croissantes du peptide (30, 60, et 120 µmol/L). La prolifération des cellules tumorales n'était pas altérée, même par les concentrations élevées du domaine NC1(XIX). Celui-ci ne présente, par ailleurs, pas d'effet toxique sur les cellules.

Les domaines NC1 issus des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du collagène de type IV inhibent la prolifération des cellules endothéliales (Colorado et coll 2000, Kamphaus et coll 2000, Pasco et coll 2000). Ce même effet a été décrit aussi pour l'endostatine sur les cellules endothéliales. L'endostatine ne présente toutefois aucun effet inhibiteur sur la prolifération des cellules tumorales (Dhanabal et coll 1997, O'Reilly et coll 1997).

La restine, domaine NC1 du collagène XV, a un effet plus faible que l'endostatine sur la prolifération des cellules endothéliales. Cet effet varie aussi selon le type cellulaire (Ramchandran R et coll 1999).

Nous avons montré que le domaine NC1 du collagène XIX ne modifie pas l'adhésion des cellules tumorales *in vitro*. Il a été précédemment montré que les domaines NC1 issus des chaînes α 1 et α 2 du collagène de type IV induisent l'adhésion des cellules de la crête neurale du poulet (Lein et coll 1991). Il en est de même pour le domaine NC1 de la chaîne α 3 du collagène de type IV ou tumustatine qui lorsqu'il est immobilisé au fond des plaques de culture induit l'adhésion des cellules tumorales (Han et coll 1997, Shahan et coll 1999 et 2000).

L'inhibition de la progression tumorale trouvée *in vivo* peut être expliquée au moins partiellement par une inhibition de la migration cellulaire en présence du domaine NC1 du collagène de type XIX. La migration des cellules tumorales est inhibée *in vitro* dans les modèles de blessure artificielle. NC1(XIX) inhibe aussi bien la migration des cellules tumorales murines que celles des cellules humaines et aussi la migration des cellules endothéliales

L'étude de la migration dans un modèle de culture à deux dimensions permet de déterminer les capacités migratoires des cellules tumorales. La technique d'acquisition et de traitement d'image que nous avons utilisée (Zahm et coll 1997) permet d'analyser le suivi et la quantification des trajectoires, la vitesse des cellules et la distance parcourue en deux dimensions selon des axes X et Y, par les cellules. L'analyse des paramètres de la migration des cellules tumorales nous a montré l'effet inhibiteur du domaine NC1(XIX).

NC1(XIX) affecte les mouvements cellulaires au cours de la migration. L'analyse des trajectoires des cellules incubées avec le domaine NC1(XIX) montre des déplacements cellulaires courts, par comparaison avec les déplacements des cellules contrôles qui sont plus grands et mieux ordonnés selon l'axe des X. Les déplacements désordonnés des cellules

Discussion

incubées avec NC1(XIX) semblent dus à la perte de la directionnalité de migration et aussi à la perte de certaines interactions cellulaires.

De même une diminution de la vitesse de migration est observée en présence du domaine NC1 du collagène de type (XIX). La diminution de la vitesse de migration et la perte de la directionnalité du mouvement par rapport à l'axe des X peuvent expliquer la diminution de la distance parcourue par les cellules au sein de la blessure. L'inhibition de la migration des cellules tumorales par NC1(XIX) est la conséquence d'une perturbation de l'ensemble des paramètres de migration.

Il a été montré que les propriétés anti-tumorales du domaine NC1 du collagène XIX sont liées à une réduction des capacités invasives des cellules tumorales B16F1 *in vitro* (Ramont et coll 2007). De même, le domaine NC1 de la chaîne α 3 du collagène de type IV a été décrit comme une matrikine inhibitrice de l'invasion des cellules tumorales (Pasco et coll 2000).

Les capacités migratoires des cellules endothéliales humaines ont été déterminées par vidéomicroscopie dans le modèle de blessure artificielle.

L'analyse des paramètres de la migration des cellules endothéliales nous a montré l'effet inhibiteur de NC1(XIX) retrouvé précédemment avec les cellules tumorales. Les cellules endothéliales incubées avec NC1(XIX) présentent des déplacements cellulaires courts et désordonnés par comparaison avec les cellules contrôles. L'addition de NC1(XIX) dans le milieu de culture induit une diminution de la vitesse de migration, et une diminution de la distance parcourue par les cellules au sein de la blessure. NC1(XIX) inhibe la migration des cellules endothéliales humaines en affectant l'ensemble des paramétres de migration.

L'angiogenése tumorale est un processus indispensable à la croissance de la tumeur. C'est le mécanisme par lequel naissent des nouveaux vaisseaux sanguins à partir des capillaires préexistants. La croissance tumorale dépend de la formation de ces nouveaux capillaires (Folkman J et coll 1971). La croissance tumorale *in vivo* nécessite la vascularisation des tumeurs. Le domaine NC1 du collagène de type XIX présente un effet anti-angiogénique. Il inhibe *in vitro*, la migration des cellules endothéliales et leur capacité à former des pseudotubes lorsqu'elles sont cultivées sur du Matrigel®. Cet effet anti-angiogénique du domaine NC1 du collagène XIX a été observé *in vivo* dans le modèle de mélanome expérimental de la souris (Ramont et coll 2007). Les propriétés anti-angiogéniques du domaine NC1 du collagène de type XIX sont retrouvées pour d'autres matrikines des

collagènes de la membrane basale. Ainsi, les matrikines des domaines NC1 des chaînes $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du collagène de type IV inhibent in vitro la formation de pseudotubes à partir des cellules endothéliales cultivées sur du Matrigel®. La tumstatine, en particulier, inhibe in vitro mais aussi *in vivo* l'angiogenése par augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales (Maeshima et col 2000). De même, la principale fonction de l'endostatine, domaine NC1 du collagène XVIII, est d'inhiber l'angiogenése (Ortega et coll 2002, O'Reilly et coll 1997).

Notre laboratoire a précédemment montré que le peptide NC1 (XIX) inhibe l'expression du facteur angiogénique VEGF dans les mélanomes expérimentaux, induisant ainsi l'inhibition de la vascularisation tumorale (Ramont et coll 2007). Les mécanismes d'action par lesquels agit NC1(XIX) pour induire son effet anti-angiogénique restent encore inconnus.

Nous n'avons pas observé de modification significative de l'expression des MMP-2 et MMP-9 dans les tumeurs ni dans les cultures de cellules tumorales incubées avec NC1(XIX).

Nos résultats préliminaires suggérent toutefois que celui-ci pourrait diminuer l'expression de l'uPA, une enzyme fortement impliquée dans le processus d'invasion tumorale (Thévenard J et coll 2010). Ils devront toutefois être confirmés par des études supplémentaires, notamment des RT-PCR en temps réel et dosages ELISA.

La migration cellulaire est nécessaire au phénomène de l'invasion tumorale et constitue le point de départ du processus métastatique. Ainsi, les cellules cancéreuses acquièrent de nouvelles propriétés biochimiques et des caractéristiques qui leur permettent de s'échapper de la tumeur primaire. La migration cellulaire implique une régulation de l'organisation/ désorganisation du cytosquelette cellulaire en coordination avec l'attachement à des éléments extracellulaires. Ce mécanisme met en jeu des voies de signalisations induites par l'attachement des cellules aux constituants de la matrice-extracellulaire, médié par des intégrines. La modification des fibres d'actine au cours de la migration cellulaire met en jeu l'activation simultanée ou séparée de la voie de signalisation de la protéine tyrosine-kinase FAK (Focal Adhesion Kinase), l'élément central des complexes d'adhésion focale, mais aussi des voies de signalisation impliquant les petites protéines Rac et Rho/Rock (figure 57).



Figure 57: Voies de signalisation activée au cours de la motilité et de la migration cellulaire (www.avernes.fr)

L'étude du cytosquelette des cellules tumorales et endothéliales par immunocytochimie a été réalisée en présence du domaine NC1 du collagène XIX à différentes concentrations et pendant 24 heures, en utilisant un immunomarquage de l'actine et de la vinculine.

Le cytosquelette des cellules incubées avec le domaine NC1 (XIX) ne présentait pas de désorganisation des filaments d'actine. L'inhibition de la migration cellulaire par le NC1(XIX) n'est donc pas due à la modification du cytosquelette. Le peptide agit probablement par une autre voie pour induire son effet anti-migratoire.

Il a été montré par des études précédentes que certaines matrikines dérivés des domaines NC1 des collagènes de membranes basales se lient à des récepteurs spécifiques (les intégrines) à la surface des cellules tumorales et endothéliales, et activent ainsi des voies de signalisations intracellulaires qui médient leurs effets. Les matrikines dérivées des domaines NC1 du collagène de type IV se lient pour beaucoup d'entre elles aux intégrines $\alpha 1\beta 1$ et/ou $\alpha 2\beta 1$ (Ortega et Werb 2002).

La tumstatine se lie pour sa part à l'intégrine $\alpha\nu\beta3$ pour induire l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales (Maeshima et coll 2000 a). Par ailleurs, les cellules endothéliales adhérent au domaine NC1 de la chaîne IV par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha\beta3$ (Maeshima et coll 2000 b).

Les données obtenues au cours de nos travaux laissent supposer que le domaine NC1 du collagène XIX est une nouvelle matrikine qui, en se fixant sur un (ou des) récepteur(s) spécifique des cellules tumorales et endothéliales peuvent activer une ou plusieurs voies de signalisation intracellulaires indispensables à son activité anti-tumorale.

Effet biologiques des peptides dérivés de NC1(XIX)

Nous nous sommes intéressés au cours de ce travail à la caractérisation de la séquence polypeptidique minimale active de NC1(XIX) reproduisant les effets biologiques du peptide entier. Pour cela nous avons utilisé des peptides synthétiques P10, P8, et P6 (constitués des 10, 8 et 6 premiers acides aminés du domaine NC1 du collagène XIX). Nous avons aussi utilisé des peptides plus courts P1: EDCLYPVS, P2: DCLYPVS, et P3: CLYPVS, et un peptide analogue de NC1(XIX), le P19 muté (P19m: NGEDCLYGVSHAHQRTGGN) dans lequel on a substitué des résidus de proline par des glycine. Ces résidus de proline paraissent particulièrement importants pour la conformation du peptide dans l'espace et/ou son interaction avec un récepteur.

Nous avons réalisé une étude *in vivo*, dans un modèle de mélanome murin, par injection de cellules B16F1 par voie sous-cutanée à des souris C57/B16. L'injection entraîne le développement de tumeurs sous-cutanées, dont on peut mesurer la croissance régulièrement. Un traitement des animaux par injections intra-péritumorales avec les différents peptides qui en dérivent P10, P8 et P6 a été réalisé aux jours 7 et 14 après l'apparition des tumeurs. Nous avons observé qu'une inhibition de 70% de la croissance tumorale est induite par le peptide P10, ce qui est un effet très similaire à celui de NC1(XIX). Par contre, P8 est moins efficace et P6 est sans effet.

Le peptide P10, constitué par les 10 premiers acides aminés du domaine NC1(XIX), s'avère présenter les mêmes propriétés que le domaine NC1(XIX) complet sur la croissance tumorale *in vivo*. Il est intéressant de noter que ce peptide P10 est particulièrement bien conservé dans toutes les espèces animales.

In vitro, et dans les mêmes conditions que NC1(XIX), nous avons étudié la prolifération des cellules de mélanome murin, de cellules de mélanome humain et aussi de cellules endothéliales humaines en présence des peptides dérivés P10, P8 et P6. De même que NC1(XIX), ces peptides ne modifient pas la prolifération cellulaire. Ils ne modifient pas non plus les capacités d'adhésion des cellules de mélanome murin *in vitro*.

La migration des cellules de mélanome murin a été étudiée dans un modèle de blessure artificielle en présence des peptides dérivés de NC1(XIX). Une inhibition a été obtenue avec P10 dans les mêmes conditions que NC1(XIX) complet, P8 et P6 s'avérant inactifs.

Le peptide P10 dérivé du domaine NC1 du collagène XIX présente donc les mêmes propriétés inhibitrices sur la migration des cellules tumorales que le NC1(XIX) complet. Il parait toutefois plus instable car son activité disparait s'il n'est pas remplacé par du peptide frais après 12 heures d'incubation avec les cellules.

L'inhibition de la progression tumorale trouvée *in vivo* avec le peptide P10 peut être expliquée au moins partiellement par une inhibition de la migration cellulaire. La migration des cellules tumorales murines et des cellules endothéliales humaines est inhibée in vitro dans le modèle de blessure artificielle en présence de P10. L'analyse des paramètres de migration à l'aide d'un logiciel spécifique (2Q-mig) a montré son effet inhibiteur sur le déplacement des cellules: l'addition du P10 dans le milieu de culture des cellules tumorales murines et des cellules endothéliales humaines modifie les mouvements cellulaires. Les cellules incubées avec P10 présentent des déplacements courts et désordonnés par comparaison avec les cellules contrôles. Les déplacements cellulaires selon l'axe des X sont altérés de la même façon avec P10 que ceux des cellules incubées avec NC1(XIX). P10 induit aussi une perte de directionnalité de migration des cellules et une diminution de leur vitesse de migration.

La croissance tumorale *in vivo* nécessite l'apport de nutriments aux tumeurs par l'intermédiaire de néo-vaisseaux formés par les vaisseaux préxistants. P10 inhibe la migration
des cellules endothéliales humaines *in vitro* et leurs capacités à former des pseudotubes lorsqu'elles sont cultivées sur Matrigel[®], ce qui suggére que P10 peut reproduire les effets anti-angiogéniques déjà observés pour NC1(XIX).

Au total, les résultats trouvés au cours de cette étude montrent que le peptide P10 présente les mêmes propriétés anti-tumorales que le domaine NC1 du collagène (XIX). Il inhibe la croissance tumorale *in vivo* dans un modèle de mélanome malin et inhibe *in vitro* la migration des cellules tumorales et endothéliales dans les mêmes conditions que le domaine NC1(XIX). Il inhibe aussi la formation des pseudotubes par les cellules endothéliales humaines lorsqu'elles sont cultivées sur du Matrigel® dans les mêmes conditions que NC1(XIX).

P8 et P6 sont pour leur part très peu actifs ou inactifs. De même, aucun effet significatif n'a été retrouvé avec d'autres peptides courts dérivés de NC1 (XIX) (P1: EDCLYPVS, P2: DCLYPVS, P3: CLYPVS). Ceux-ci ne modifient pas la prolifération des cellules tumorales et n'induisent pas d'inhibition de la migration des cellules tumorales. Il apparait donc que seul P10 est capable de reproduire l'activité de NC1(XIX) complet. P10 peut être considéré comme la séquence minimale active de NC1 (XIX).

Des résultats préliminaires de modélisation moléculaire effectués dans notre unité par le Pr. M.Dauchez ont montré que le peptide P10 conserve la structure tridimensionnelle adoptée par cette même séquence dans le NC1(XIX) complet, ce qui est en agrément avec la conservation de l'activité biologique (figure 58).



Figure 58: Modélisation moléculaire des peptides NC1(XIX) et P10

(Travail effectué par le Pr. M. Dauchez)

A gauche: Peptide NC1(XIX) ; A droite: Peptide P10

Des analyses complémentaires sont effectuées actuellement sur l'analogue de NC1(XIX) dans lequel les résidus proline ont été remplacés par la glycine (peptide P19m). Ce peptide muté P19m n'inhibe pas la migration des cellules tumorales dans le modèle de blessure artificielle. La mutation des résidus de proline par des résidus de glycine fait donc perdre à NC1(XIX) son activité inhibitrice de la migration cellulaire. Le remplacement des résidus de proline par des glycine induit des modifications profondes de la structure 3D du peptide, le peptide P19m perdant la structure en coude qui existe entre les deux hélices de NC1(XIX) (figure 59). Les résidus de proline paraissent particulièrement importants pour la conformation du peptide dans l'espace et/ou son interaction avec un récepteur. L'absence de la structure en coude pour P19m, résultant de la substitution des résidus de proline par des résidus glycine fait disparaître l'activité biologique. La structure en coude parait donc nécessaire pour l'action du peptide sur la migration cellulaire.



Structure en coude avec une proline

Figure 59: Modélisation moléculaire des peptides NC1(XIX) et P19m

(Travail effectué par le Pr. M. Dauchez)

- En rose: Peptide NC1(XIX)

- En mauve: Peptide P19m

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le collagène de type XIX est un collagène mineur associé aux membranes basales, appartenant à la famille des FACITs. Il a été isolé pour la premiére fois dans une bibliothéque d'ADNc humaine de rhabdomyosarcome. La chaine $\alpha 1$ (XIX) est constituée d'un domaine collagénique discontinu suivi d'un court domaine C-terminal non collagènique (NC1) de 19 résidus d'acides aminés.

Nous avons montré que le domaine NC1 de ce collagène, constitué de 19 acides aminés, présente une activité anti-tumorale en inhibant la progression tumorale dans un modèle expérimental de mélanome malin. Il inhibe la capacité de migration des cellules tumorales et leurs capacités d'envahissement du Matrigel®. De même, il inhibe l'expression du VEGF et de la MT1-MMP dans les tumeurs (Ramont et col 2007).

Les résultats de la présente étude confirment ces caractéristiques anti-tumorales et antiangiogéniques. NC1(XIX) inhibe la croissance tumorale *in vivo*, inhibe la migration des cellules de mélanome murin et humain *in vitro*. De même, il inhibe la formation des pseudotubes par les cellules endothéliales humaines lorsqu'elles sont cultivées sur Matrigel®. De plus, nous avons pu caractériser un peptide actif dérivé du domaine NC1 du collagène de type XIX, possédant les mêmes propriétés biologiques. Ce peptide P10, (constitué des 10 premiers acides aminés du domaine NC1) parait être la séquence peptidique minimale active de NC1(XIX).

Au total le domaine NC1 (XIX) et son peptide dérivé P10 peuvent être considérés comme de nouvelles matrikines anti-tumorales dérivées des collagènes associés aux membranes basales. Ces peptides pourront être utilisés pour concevoir de nouveaux dérivés peptidiques succeptibles d'être utilisées en thérapeutique anti-cancéreuse.

L'exérèse chirugicale reste jusqu'à présent le traitement le plus efficace pour le mélanome, cancer à haut potentiel métastasique. Les traitements contre la dissémination métastasique restent très restreints. Pour étudier le potentiel thérapeutique de NC1(XIX) ou de P10 dans les mélanomes métastasés, nous développerons un modèle de métastases spontanées chez la souris immuno-déficiente, obtenu après injection sous-cutanée de cellules de

mélanome humain (cellules M14 ou UACC 903). Après apparition de la tumeur, les souris seront traitées par des injections intra-péritonéales de NC1(XIX) ou P10.

Les souris seront ensuite sacrifiées, le nombre et le volume des métastases mesurés sur des coupes histologiques.

Pour rechercher une implication de NC1(XIX) dans le contrôle de la progression tumorale chez l'homme, l'expression du collagène XIX sera étudiée par immunohistochimie, à l'aide d'un anticorps monoclonal, au sein et en périphérie de mélanomes humains et nous comparerons son expression avec celle des naevi bénins et de la peau saine.

Les matrikines sont caractérisées par le fait qu'elles agissent par l'intérmédiaire de récepteurs membranaires, les plus souvent de type intégrine. Nous chercherons si NC1(XIX) interagit avec ses cellules cibles par l'intermédiaire d'une intégrine, en particulier $\alpha\nu\beta3$ ou $\alpha2\beta1$, que nous avons déjà mises en évidence comme médiateurs de l'action de certaines matrikines antitumorales dans notre laboratoire.

La fixation des matrikines sur leurs récepteurs spécifiques permet d'activer une ou plusieurs voies de signalisation intracellulaires indispensables à leurs activités biologiques. Une étude des voies de transduction intracellulaires impliquées dans l'activité biologique de NC1(XIX) sera donc réalisée. Nous étudierons en particulier la phosphorylation/déphosphorylation de FAK et l'activation de certaines molécules intracellulaires telles que Rac et Rho, généralement impliquées dans la mobilité cellulaire.

Au total, notre travail a permis la caractérisation de nouvelles molécules d'origine matricielle possédant des propriétés anti-tumorales. Il nous permet de progresser vers le développement d'analogues pseudo-peptidiques susceptibles d'être utilisés comme médicaments anticancéreux, permettant de limiter la progression tumorale et la dissémination métastatique, utilisables dans le traitement du mélanome mais aussi d'autres cancers.

Bibliographie

Liste Bibliographique

- Abe N, Muragaki Y, Yoshioka H, Inoue H and NinomiyaY.
 Identification of a novel collagen chain represented by extensive interruptions in the triplehelical region.
 - Biochem. Biophys.Res Commun 1993; 196: 576-582.
- Ala-aho R, Kahari VM.
 Collagenases in cancer.
 Biochimie 2005; 87:273-286.
- Andreasen PA, Kjoller L, Chritensen L, Duffy MJ.
 The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis.
 Int J Cancer 1997; 72 (1): 1-22.
- Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, et al.
 Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a casecontrol study.

Br J Cancer 1996; 73:1605-1611.

 Berking C, Takemoto R, Schaider H, Showe L, Satyamoorthy K, Robbins P, et al. Transforming growth factor-beta 1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling.

Cancer Res 2001; 61:8306–8316.

Blasi F.

uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? Immunol Today 1997; 18:415-417.

Blumberg B, MacKrell AJ, Olson PF, Kurkinen M, Monson JM, Natzle, JE et al.
 Basement membrane procollagen IV and its specialized carboxyl domain are conserved in drosophila, mouse, and human.

J Biol Chem 1987; 262: 5947-5950

- Boutaud A, Borza DB, Bondar O, Gunwar S, Netzer KO, Singh N et al. Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domain. J Biol Chem 2000; 275: 30716-30724.
- Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Van- Westrum SS et al. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. J Biol Chem 1998; 273: 871–880.
- 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.
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco M.J, MG del Barrio.
 The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing Ecadherin expression.
 Nat Cell Biol 2000; 2: 76–83.
- Colognato H, Yurchenco PD.
 Form and function: the laminin family of heterotrimers.
 Dev Dyn 2000; 218: 213-234.
- Colorado P C, Torre, A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. Cancer Res 2000; 60: 2520-2526.
- Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, et al. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors.

Oncogene 1999; 18:2883-2891.

- Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ and Meininger GA..
 Regulation of Tissue Injury Responses by the Exposure of Matricryptic Sites within Extracellular Matrix Molecules.
 American journal of Patologie. 2000 ; 156:1489-1498.
- 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.
- Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis.
 J Biol Chem 1999; 274: 11721-11726.
- Dolz, R, Engel J and Kuhn, K.
 Folding of collagen IV.
 Eur J Biochem 1988; 178: 357-366.
- Ekblom P, Ekblom M, Fecker L, Klein G, Hong-Yan Zhang, Kadoya Y et al. Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. Development 1994; 120: 2003-2014.
- Eklund L, Piuhola J, Komulainen J, Sormunen R, Ongvarrasopone C, Fässler R.
 Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice.
 Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 1194-1199.
- Feng Q, Zi-Chao Z, Xue-Feng W, Yu-Pei L, Qiang X Interaction between integrin *a*5 and fibronectin is required for metastasis of B16F10 melanoma Cells.
 Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 333:1269–1275.

- Ferreras M, Felbor U, Lenhard, T, Olsen BR and Delaisse J-M.
 Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases.
 FEBS Lett 2000; 486: 247-251.
- Ferrier CM, van Muijen GNP, Ruiter DJ.
 Proteases in cutaneous melanoma
 Ann Med 1998; 30: 431–442.
- Folkman J.
 Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis.
 Semin Oncol 2002; 29:15-18.
- Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B and Zanker K.
 CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion.
 Eur J Immunol 1998; 28: 2331–2343.
- Friedl P.
 Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration.
 Curr Opin Cell Biol 2003; 16: 14–23.
- Fukai N, Eklund L, Marneros AG, Tamarkin L, Niemela M, Li E et al. Lack of collagen XVIII/endostatin results in eye abnormalities. Embo J 2002; 21: 1535-1544.
- Gelse K, Poschl E, Ainger T.
 Collagens--structure, function, and biosynthesis.
 Adv Drug Deliv Rev 2003; 55: 1531-1546.

Greenburg and Hay ED.
 Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells.

J Cell Biol 1982; 95: 333–339.

- Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions Eur J Cell Biol 1997; 74: 111–122.
- Gupta MK, Qin RY.
 Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis.
 World J Gastroenterol 2003; 9:1144-1155.
- Halfter W, Dong S, Schurer B and Cole G J.
 Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan.
 J Biol Chem 1998; 273: 25404-25412.
- Henriet P, Zhong ZD, Brooks PC, Weinberg KI, DeclerckYA.
 Contact with fibrillar collagen inhibits melanoma cell proliferation by up-regulating p27KIPI.
 Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97:10026–10031.
- Hernandez-Barrantes S, Toth M, Bernardo MM, Yurkova M, Gervasi DC, Raz Y, et al. Binding of active (57 kDa) membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) regulates MT1-MMP processing and proMMP-2 activation.

J Biol Chem 2000; 275:12080–12089.

 Hofmann UB, Westphal JR, vanMuijen GNP, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma.
 J Invest Dermatol 2000; 115: 337–344.

- Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, Becker.
 Role of matrix metalloproteinases in melanoma a cell invasion.
 Biochimie 2005; 87: 307-314.
- Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ.
 Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3.
 J Cell Biol 2000; 149:1309-1323.
- 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.
- Jianmin Su, Karen Gorse, Francesco Ramirez, Michael A Fox.
 Collagen XIX is expressed by interneurons and contributes to the formation of hippocampal synapses.

The Journal of Comparative Neurology 2010; 518 (2): 229-253.

• Johansson S.

Non-collagenous matrix proteins. In : Extracellular matrix : Molecular components and interactions. Ed Comper WD. Amsterdam: Hardwood Academic Publishers 1996: 60-94.

- Kalluri R, Cosgrove D.
 Assembly of type IV collagen. Insights from alpha3 (IV) collagen-deficient mice.
 J Biol Chem 2000; 275: 12719-12724.
- 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: 1209-1215.

- Kelley PB, Sado Y, Duncan MK.
 Collagen IV in the developing lens capsule.
 Matrix Biol 2002; 21 (5): 415-423.
- Khaleduzzaman Mohammed, Sumiyoshi Hideaki, Ueki Yasuyoshi, Inoguchi Kazuhito, Ninomiya Yoshifumi and Yoshioka Hidekatsu.
 Structure of the Human Type XIX Collagen (COL19A1) Gene, Which Suggests It Has Arisen from an Ancestor Gene of the FACIT Family.
 Genomics 1997; 45: 304-312.
- Kim Y M, Jang JW, Lee O H, Yeon J, Choi EY, Kim KW.
 Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase.
 Cancer Res 2000; 60: 5410-5413.
- Kivirikko S, Saarela J, Myers J C, Autio-Harmainen H and Pihlajaniemi T.
 Distribution of type XV collagen transcripts in human tissue and their production by muscle cells and fibroblasts.
 Am J Pathol 1995; 147: 1500- 1509.
- Kurschat 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: 21056-21062.
- Lauffenburger DA and Horwitz AF.
 Cell migration: a physically integrated molecular process.
 Cell 1996; 84: 359–369.

Lens MB, Dawes M.

Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma.

Br J Dermatol 2004; 150: 179-185.

- Li,D, Clark C C and Myers J C.
 Basement membrane zone type XV collagen is a disulfide-bonded chondroitin sulfate Proteoglycan in human tissues and cultured cells.
 J Biol Chem 2000; 275: 22339-22347.
- Lin H-C, Chang J-H, Jain S, Gabison E E, Kure T, Kato T.
 Matrilysin cleavage of corneal collagen type XVIII NC1 domain and generation of a 28- kDa fragment.

Invest. Ophtalmol Vis Sci 2001; 42: 2517-2524.

- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S.
 Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 1980; 284:67-68.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ.
 Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells.

J Cell Biol 1997; 139:1861-1872.

- MacDougall JR, Bani MR, Lin Y, Rak J, Kerbel RS. The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. Cancer Res 1995; 55:4174-4181.
- Mac Dougall JR, Bani MR, Lin Y, Muschel RJ, Kerbel RS.
 "Proteolytic switching": opposite patterns of regulation of gelatinise B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinise B overexpression.

Br J Cancer 1999; 80:504–512.

 Maeshima Y, Colorado P C, Torre A, Holthaus K A, Grunkemeyer J A et al. Distinct anti-tumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane.

J Biol Chem. 2000a; 275: 21340-21348.

- Maeshima, Y, Colorado PC.and Kalluri R. Two RGD-independent α_vβ₃ integrin binding sites on Tumstatin regulate distinct antitumor properties.
 J Biol Chem 2000b; 275: 23745-23750.
- Malo M, Charrière-Bertrand C, Chettaoui C, Fabre -Guillevin, Maquerlot F, Lackmy A et al. Microenvironnement cellulaire, PAI-1 et migration cancéreuse.
 Soc.Biol 2006; 329: 919-927.
- 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.
- Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. APMIS 1999; 107:38–44.
- Muragaki Y, Abe N, Ninomiya, Y, Olsen BR. and Ooshima A. The human alpha 1 (XV) collagen chain contains a large amino-terminal non-triple helical domain with a tandem repeat structure and homology to alpha 1 (XVIII) collagen. J Biol Chem 1994; 269: 4042-4046.
- Musso O, Theret N, Heljasvaara R, Rehn M, Turlin B, Campion J P, Pihlajaniemi T. Tumor hepatocytes and basement membrane-Producing cells specifically express two different forms of the endostatin precursor, collagen XVIII, in human liver cancers. Hepatology 2001; 33: 868-876.

Myers JC, Sun MJ, Dippolito JA, Jabs EJ, Neilson EG, Dion AS.
 Human cDNA clones transcribed from an unusually high-molecular weight encode a new collagen chain.

Gene 1993; 123:211–217.

- Myers JC, Yang H, Dippolito JA, Presente A, Miller MK, Dion AS. M. 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.
 Biochemicaland immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens.
 Am J Pathol 1997; 151 (17): 29–40.
- 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, disulfidelinked, and heparin-binding amino termini.
 J Biol Chem 2003; 278: 32047-33057.
- Myllyharju J, Kivirikko KI.
 Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms.
 Trends Genet 2004; 20: 33-43.
- Nagase.

Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. Cell Res 1998; 8: 179–186. • Naito Z.

The role of small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth.

J Nippon Med Sch 2005; 72: 137-145.

- Netzer KO, Suzuki K, Itoh,Y, Hudson BG and Khalifah RG.
 Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis.
 Protein Sci1998; 7: 1340-1351.
- Ntayi C, Lorimier S, Berthier-Vergnes O, Hornebeck W, Bernard P.
 Cumulative influence of matrix metalloproteinase-1 and -2 in the migration of melanoma cells within three-dimensional type I collagen lattices.
 Exp Cell Res 2001; 270:110–118.
- Nykjaer A, Christensen M EI, Olson D, Cremona O, Gliemann J and Blasi F.
 Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes.
 Embo J 1997; 16: 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: 277-285.
- Oh S P, Warman ML, Seldin M F, Cheng SD, Knoll JH, Timmons S et al.
 Cloning of cDNA and genomic DNA encoding human type XVIII collagen and localization of the alpha 1 (XVIII) collagen gene to mouse chromosome 10 and human chromosome 10.
 Genomics 1994(a); 19: 494-499.
- Oh PS, Kamagata Y, Muragaki Y, Timmons S, Ooshima A and Olsen BR. Isolation and sequencing of cDNAs for proteins with multiple domains of Gly-Xaa-Yaa repeats identify a distinct family of collagenous proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1994b; 91: 4229-4233.

- OhnishiY, Tajima S, Ishibashi A.
 Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinase-2 and -3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma.
 Eur J Dermatol 2001, 11:420–3.
- Ortega Nathalie and Werb Zena.
 New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens.
 Journal of Cell Science2002; 115: 4201-4214.
- Pasco S, Han J, Gillery P, Bellon G, Maquart FX, Borel JP T 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 2000; 60: 467-473.
- Paulsson M, Yurchenco PD, Ruben GC, Engel T, Timpl R.
 Structure of low density heparan sulfate proteoglycan isolated from a mouse tumor basement membrane.

J Mol Biol 1987; 197: 297-313.

- Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJF, 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: 735-739.
- Ramont L, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Deshorgue A, Venteo L, Laronze JY, Pluot M, Monboisse JC.
 The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth.
 Mol Cancer Ther 2007; 6: 506-514.
- 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.

- Ray JM, Stetler-Stevenson WG.
 Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading.
 Embo J 1995; 14: 908–917.
- Rehn M and Pihlajaniemi T.
 al(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 USA 1994; 91: 4234-4238.
- Rehn M and Pihlajaniemi T.
 Identification of three N-terminal ends of type XVIII collagen chains and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts.
 J Biol Chem 1995; 270: 4705-4711.
- Rerolle J-ph, Vigneau C, Hertig A, Berrou J, Rondeau E.
 L'inhibiteur de type 1 des activateurs du plasminogène : physiologie et rôle en physiopathologie rénale.
 Néphrologie 2001; 22: 5-13.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F.
 The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane.
 Pathol Biol 2005; 53: 430-442.
- Saarela J, Ylikarppa R, Rehn M, Purmonen S.and Pihlajaniemi T.
 Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissuespecific differences in the expression of the corresponding transcripts.
 Matrix Biol 1998a; 16: 319-328.
- Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, Autio-Harmainen H.and Pihlajaniemi T. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans. Am J Patho 1998b; 153: 611-626.

- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Göhring W, Olsen B R and Timpl R.
 Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin.
 Embo J 1998; 17: 4249-4256.
- Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E and 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: 1179-1190.
- Sahai E and Marshall CJ.
 Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis.
 Nat Cell Biol 2004; 5: 711–719.
- Sarras MP Jr, Zhang X, Huff J.K, Accavitti M A, St John,PL and Abrahamson DR. Extracellular matrix (mesoglea) of Hydra vulgaris III. Formation and function during morphogenesis of hydra cell aggregates. Dev Biol.1993; 157: 383-398.
- Seiki M.

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. Cancer Lett 2003; 194: 1-11.

Sertie A L, SossiV, Camargo A A, Zatz M, Brahe C.and Passos-Bueno, M R.
 Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome).

Hum Mol Genet 2000; 9: 2051-2055.

- Siméon A, Monier F, Emonard H, Wegrowski Y, Bellon G, Monboisse JC et al. Fibroblast-cytokine-extracellular matrix interactions in wound repair. Curr Top Pathol.1999; 93: 95-101.
- Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, Noel A.
 Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis.
 Matrix Biology 2003; 22: 55–61.
- Sumiyoshi H, Inoguchi K, Khaleduzzaman M, Ninomiya Y, Yoshioka H. Ubiquitous expression of the α1 (XIX) collagen gene (Col19a1) during mouse embryogenesis becomes restricted to a few tissues in the adult organism. J Biol Chem 1997; 272: 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: 155–162.
- Taddei L, Chiarugi P, Brogelli L, Cirri P, Magnelli L, Raugei G et al. Inhibitory effect of full-length human endostatin on in vitro angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun 1999; 263: 340-345.
- Thevenard J, Ramont1 L, Devy J, Brassart B, Dupont-Deshorgue A, FloquetN et al. The YSNSG cyclopeptide derived from tumstatin inhibits tumor angiogenesis by downregulating endothelial cell migration. Int J Cancer 2010; 126: 1055–1066.
- Tromme I, Richez P.
 Epidémologie, Facteurs de risque et dépistage du mélanome.
 Louvain : Louvain médical ; 2007 : 126-190.

 Tsilibary EC, Reger LA, Vogel AM, Koliakos GG, Anderson SS, Charonis AS et al. Identification of a multifunctional, cell-binding peptide sequence from the a1 (NC1) of type IV collagen.

J Cell Biol 1990; 111: 1583-1591.

- Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T.
 Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value.
 J Pathol 1996; 180: 283-289.
- Van Wart He, Hbirkedal-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: 5578-5582.
- Visse R, Nagase H.
 Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.
 Circ Res 2003, 92: 827-839.
- Wen W, Moses M A, Wiederschain D, Arbiser J L and Folkman J. The generation of endostatin is mediated by elastase. Cancer Res 1999, 59: 6052-6056.
 - Yamaguchi N, Anad-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapiro R et al. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. Embo J 1999; 18: 4414-4423.
 - You WK, So S H, Lee H, Park SY, Yoon M.R, Chang SI et al.
 Purification and characterization of recombinant murine endostatin in E. coli.
 Exp Mol Med 1999; 31: 197-202.

 Zahm JM, Kaplan H, Hérard AL, Doriot F, Pierrot D, Somlette P et al. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium.

Cell Motil. Cytoskel. 1997; 37: 33-43.

 Zinzindohoué F, Lecomte T, Puig Pierre I.
 Métalloprotéases de la matrice extracellulaire et cancers du tractus digestif :Gastroenterol Clin Biol 2005; 29: 434-444.

Annexe

THE NC1 DOMAIN OF TYPE XIX COLLAGEN INHIBITS MELANOMA CELL MIGRATION

Short title : NC1(XIX) inhibits melanoma cell migration.

<u>Authors</u> : Aida Toubal¹⁺, Laurent Ramont^{1,2+}, Christine Terryn³, Sylvie Brassart-Pasco¹, Dominique Patigny⁴, Janos Sapi⁴, Jean Claude Monboisse^{1,2} and François-Xavier Maquart^{1,2} (⁺ : these two authors contributed equally to this work.)

Author addresses :

- Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6237, Faculté de Médecine, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France
- 2- Laboratoire Central de Biochimie, CHU de Reims, rue Serge Kochman, 51092 Reims Cedex
- 3- IFR 53, Interactions Cellules-Microenvironnement, Pôle Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims, France
- 4- Institut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS UMR 6229, Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51095 Reims, France

Proofs and reprints request : lramont@chu-reims.fr

Tel : 33 (0)3 26 78 83 46 Fax : 33 (0)3 26 78 85 39

Total number of words : 4796

Figures, Tables and References

- 6 figures
- 0 tables
- 38 references.

Abstract

Type XIX collagen is a minor collagen that localizes to basement membrane zones. We previously demonstrated that the C-terminal NC1, domain of type XIX collagen inhibits tumor growth *in vivo*. In the present study, we analyzed the effects of the NC1(XIX) collagen domain on migratory behaviour of melanoma B16F10 cells. We found that NC1(XIX) do not inhibit melanoma cell proliferation. On the contrary, NC1(XIX) strongly inhibited the migratory capacities of melanoma cells in the scratch wound model and in Ibidi[®] devices : cell migration speed was $7.69 \pm 1.49 \mu$ m/h for the controls vs $6.64 \pm 0.82 \mu$ m/h for cells incubated with 30 µmol/L NC1(XIX) and $5.72 \pm 0.67 \mu$ mol/h with 60 µmol/L NC1 (XIX). Similar results were obtained with UACC 903 human melanoma cells. Further works will be necessary to elucidate the molecular mechanisms of this migration inhibition. It may, however, explain, at least partially, the inhibition of tumor growth that we observed *in vivo*.

<u>Keywords</u> : Angiogenesis, basement membranes, cell migration, collagen XIX, matrikines, melanoma, NC1 domains.

INTRODUCTION

Type XIX collagen is a minor collagen initially isolated from human rhabdomyosarcoma [1,2]. It belongs to the FACIT collagen family (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple helix) [3] which includes collagen types IX, XII, XIV, XX, XXI, and XXII (for review, see [4]). It is localized in the basement membrane zone of vascular, neuronal, mesenchymal and epithelial tissues, associated with type IV, type XV and type XVIII collagens [5,6]. The molecule is a homotrimer formed by three $\alpha 1$ (XIX) chains, each one composed of a 266-residue non-collagenous amino-terminus domain, a 832-residue discontinuous triple helical domain and a short 19-residue C-terminal non collagenous (NC1) domain [7, 8].

The three $\alpha 1(XIX)$ chains are linked together by interchain disulfide bridges located just at the end of the last collagen domain. Trimerization and triple helix stabilization depend, however, on the NC2 domain, which forms a stable trimer and substantially stabilizes the triple helical domains attached to it [9].

Many experimental data suggested that type XIX collagen might be involved in embryonic development. It was first shown to be ubiquitously expressed during mouse embryogenesis, becoming restricted to a few tissues in the adult organism [6]. Further experiments demonstrated that it may be strongly involved in muscle differentiation [10, 11], especially in the limbs, tongue and the smooth muscle layer of the stomach and oesophagus [11, 12]. More recently, collagen XIX was shown to be expressed by neurons of the central nervous system and to contribute to the formation of hippocampal synapses [13].

Since type XIX collagen was found to be present in basement membrane zones, it was suggested that it might have a role in basement membrane-cell interactions. Particularly, its pronounced vascular association suggested that it might be involved in the control of angiogenesis processes [5]. Particular attention was paid to the potential role of collagen XIX in the control of cancer progression occurred when Amenta et al [14] demonstrated that loss of type XV and type XIX collagens preceded basement membrane invasion in breast carcinoma. These authors observed that these collagens were lost early in the development of invasive tumors, prior to penetration and dissolution of the epithelial basement membrane. They suggested that disappearance of these collagens from the basement membrane zone might promote tumor cell infiltration.

Since type XIX collagen contains a C-terminal NC1 domain analogous to that of the type IV collagen α (IV) chains, which were previously described to inhibit tumor growth and/or angiogenesis (for review, see [15]), we decided to investigate whether the NC1(XIX) domain of type XIX collagen

could inhibit tumor growth. We demonstrated that NC1(XIX) was able to decrease tumor growth and invasion in a mouse melanoma model [16]. In the present paper, we demonstrate that NC1(XIX) may inhibit melanoma cell migration, which might partly explain its anti-tumor effects.

MATERIALS AND METHODS

Reagents :

Culture medium and molecular biology products were from Life Technologies (Invitrogen, Strasbourg, France). All other reagents were purchased from Sigma (St Quentin-Fallavier, France)

Cells cultures :

B16F1 and B16F10 cells, two lung metastatic sublines of murine B16 melanoma, and UACC 903 cells, a human melanoma cell line, were provided by the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). They were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5 % Fetal Bovine Serum (FBS) in Nunclon[®] 25 cm² flasks (Dutscher, Brumath, France) at 37°C in a humid atmosphere (5% CO_2 , 95 % air).

Peptides :

The NC1(XIX) peptide, NPEDCLYPVSHAHQRTGGN, and the corresponding scrambled peptide, AGNEQPNYHSDPGTHLCRV, were obtained by solid-phase synthesis using Fmoc [N-(9-fluorenyl)methoxycarbonyl] strategy (PerSeptive Biosystems, Pioneer, USA). They were purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (Gilson-Thermo, UK) on a C18 column (150x10 mm, 5 µm) eluted by a gradient (1 %/min from 30 to 60 %) of acetonitrile containing 0.1% of trifluoroacetic acid in water, and the obtained peptides were lyophilized [17].

Animals :

C57B16 mice (average body weight, 16-18 g) were purchased from Harlan (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 guidelines of our Federative Research Institute ethical committee. They were sacrified at day 18 by CO2 inhalation after Ketamine / Xylazine anesthesia.

Cell proliferation measurement :

Cell number was determined using the WST-1 reagent according to the manufacturer instructions (Roche Diagnostic, Meylan, France). This test is a colorimetric assay of cell proliferation and cell viability, based on the cleavage of a tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenases in viable cells [18].Cell viability was also checked by the trypan blue exclusion test.

In vitro matrigel invasion assays

Cell invasion capacity were assayed in Transwell devices (Costar, distributed by Dutscher, Brumath, France). RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and 2% BSA was used as a chemoattractant. Briefly, 50,000 cells were suspended in serum-free RPMI containing 0.2% BSA and seeded onto the Transwell membranes (6.5 mm diameter, 8 μ m pores) coated with Matrigel[®] (30 μ g/cm²). After a 92h 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 using an inverted microscope.

Scratch wound assay :

Cells (5.10⁴ per well) were seeded in 24-well plates and cultivated to confluence in RPMI 1640 medium supplemented with 5 % FBS. The cell layer was then wounded with a sterile 100 to 1000 μ l pipet tip. After 2 washes with phosphate buffered saline (PBS) to eliminate cell debris, they were reincubated in fresh culture medium in the absence or presence of NC1(XIX) at increasing concentrations. After 24h or 36h, cells were photographed and the size of the remaining wound measured. Twelve to 14 measurements were done for each wound.

Cell migration quantification using time lapse microscopy :

Kinetic analysis of the migration process was measured using time-lapse microscopy in Ibidi[®] devices. In the devices, cells (3,500 cells in 70 μ l) were seeded in 2 compartments separated by a silicon insert. At subconfluence, inserts were removed, cells rinsed twice with PBS, and the culture medium was replaced by fresh medium containing or not the NC1(XIX) peptide at the desired concentration. Cell motility was then followed using an inverted microscope (Axiovert 200 M; Zeiss, Oberkoken, Germany) equipped with a transparent environmental chamber (Climabox; Zeiss) at 37°C under 5 % (v/v) CO₂ and 95 % air. The microscope was driven by the Metamorph[®] software (Roper Scientific, Evry, France). Images were taken every hour and recorded with a charge-coupled device camera

(CoolsnapHQ: Roger Scientific). Cell migration was characterized and quantified using the Qmig-2D software [19].

The trajectories of 15 randomly chosen single cells for each condition were recorded and their average migration speed (μ m/h) calculated.

In vivo tumor growth measurement :

A suspension of B16F1 cells (2.5 x 10^5 in 0.1 mL RPMI 1640) was subcutaneously injected into the left side of syngenic C57B16 mice. NC1(XIX) (10 mg/kg mouse weight) was injected intraperitoneally at days 7 and 14. Control mice received the injection on the same days of either scrambled peptide (10 mg/kg mouse weight) or the same volume of saline without any peptide. Each group contained six or seven mice. Tumor volumes were determined according to the formula $V = \frac{1}{2} A \times B^2$, where A denotes the largest dimension of the tumor and B represents the smallest

dimension [20]. They were measured on days 7, 14, 18. Animals were euthanazied at day 18.

Statistical analyses :

For *in vitro* experiments, statistical analyses were done by Student's t test and results expressed as mean \pm SD. At least 3 different experiments were done in each case. For *in vivo* experiments, volumes of primary tumors were statistically analyzed using the non parametric U test of Mann and Whitney.

RESULTS

-NC1(XIX) inhibits in vivo tumor growth.

Subcutaneous injection of B16 melanoma cells (2.5 x 10^5 cells/mouse) induced the development of a tumor at the injection site. Intra-peritoneal injection of NC1(XIX) (10 mg/kg mouse weight) at days 7 and 14 after subcutaneous injection of tumor cells induced a strong reduction of the tumor growth (-65 %, p <0.01 at day 18), whereas the corresponding scramble peptide had no significant effect (Fig 1).

-NC1(XIX) does not inhibit tumor cell proliferation

To test the effects of NC1(XIX) on tumor cell proliferation, melanoma cells were seeded in 24 well plates (20 000 cells per well) and incubated for 24 or 48 h in the absence or presence of NC1(XIX) at the concentrations 30, 60 or 120 μ mol/L, or the scramble peptide at 120 μ mol/L (Fig 2). No significant effect on melanoma cell proliferation was found. No sign of cell toxicity was observed and more than 98 % of the cells excluded trypan blue. Similar results were obtained with mice (Fig 2A) and human (Fig 2B) melanoma cells.

-NC1(XIX) inhibits melanoma cell migration in the scratch wound assay

Measurement of the wound size 24h after scratching the confluent cell layer demonstrated that the wound size remained significantly larger when cells were incubated with NC1(XIX) at the concentrations 30μ mol/L, (+ 40 %, p<0.01), 60μ mol/L (+95 %, p<0.001), or 120μ mol/L (+65 %, p<0.001), μ mol/L (Fig 3).

-Time-lapse microscopy analysis of cell migration

Time-lapse microscopy analysis was performed in Ibidi[®] devices. We observed that control wounds were nearly completely closed 36h after removal of the silicon insert whereas wound closure was significantly reduiced (-52 %, p<0.01 after 24 h ; -48 %, p<0.01 after 36h) in the presence of NC1(XIX) at the concentration 30 μ mol/L (Fig 4).

Cell migration parameter analysis, using the Qmig-rt software, demonstrated that cell motility was significantly reduced when cells were incubated with NC1(XIX) at the concentration 30 or 60 μ mol/L (Fig 5A). Displacement along the "X" axis (that is the axis perpendicular to the wound) was significantly decreased (-64%, p< 0.01, for 30 μ g/mL, -87 %, p<0.001 for 60 μ g/mL), (Fig 5B), whereas the displacement along the "Y" axis was not.

Measurement of cell migration speed performed 24h after wounding confirmed that NC1(XIX) significantly decreased cell motility: Cell migration speed was $7.69 \pm 1.49 \,\mu$ m/h for the control *vs* 6.64 \pm 0.82 μ m/h (p<0.05) and 5.72 \pm 0.67 μ m/h (p<0.001) for cells incubated with NC1(XIX) at the concentrations 30 and 60 μ g/ml respectively.

Similar inhibition of cell migration was observed when using UACC903 human melanoma cells instead of murine B16 melanoma cells in the scratch wound assay (Fig.6). The inhibition was significant, however, at the concentration 60 μ mol/L only, suggesting that these cells might be less sensitive to the inhibiting effect of NC1(XIX).

- NC1 (XIX) decreases in vitro cell Matrigel[®] invasion by melanoma cells.

For testing the capacity of NC1 (XIX) to inhibit invasive properties of melanoma cells, 50,000 UACC 903 cells were seeded onto Transwell membranes coated with Matrigel[®].

After a 92h incubation in the absence (control) or presence of NC1 (XIX) in the culture medium (30 μ M), migrated cells on the lower face of the membrane were counted. As shown in fig. 6, NC1 (XIX) induced a significant reduction (-66%, p< 0.05) of melanoma cell Matrigel[®] invasion.

DISCUSSION

Melanoma is the most serious form of skin cancer and its incidence has been rising steeply in the white population over the last 30 years [21].

Cancer cell migration is a key event in tumor progression and metastasis [22]. For local invasion, cells may migrate in interstitial tissue and around blood vessels [23].Melanoma cells have also, however, to cross the epithelial basement membrane to invade the underlying dermis during the vertical expansion phase, then to penetrate into the blood capillaries, disseminate and leave the capillaries to form metastasis at distance of the primary tumor. These steps necessitate complex interactions between cells and basement membrane components [24,25]. Many previous data, from our laboratory and others, demonstrated that basement membrane collagen chains may exert inhibitory effects on tumor cell invasion. Such effects were demonstrated, for instance, for the C-terminal NC1 domains of $\alpha 1(XVIII)$ (endostatin), $\alpha 1(XV)$ (restin), $\alpha 1(IV)$ (arresten), $\alpha 2(IV)$ (canstatin) or $\alpha 3(IV)$ (tumstatin) collagen chains, all present in the basement membrane zone (for review, see [26]). In the case of type XIX collagen, its involvement in the control of cancer cell invasion was suggested by the demonstration that its loss precedes basement membrane invasion in breast carcinoma [14]. Immuno-histological studies are presently in progress in our laboratory to check if it could be the same in melanoma.

Recently, we demonstrated that the C-terminal NC1 domain of human type XIX collagen also exhibited anti-tumor properties [17]. Searches in protein data bases showed that the amino acid sequence of NC1(XIX) is highly specific of type XIX collagen and is not found in other collagen types. We observed that NC1(XIX) was able to significantly decrease tumor growth in an experimental *in vivo* model of mouse melanoma. Some preliminary data suggested that NC1(XIX) could impair the invasive capacity of melanoma cells.

In this paper, we confirm that systemic administration of NC1(XIX) in mice significantly reduced tumor growth in an experimental melanoma model. This effect was not due to an inhibition of tumor cell proliferation or toxicity. It does not seem that NC1(XIX) is able to induce melanoma cells apoptosis. For instance, prelimary experiments showed no modification of the expression of annexin V at the surface of B16 melanoma cells after incubation with NC1(XIX). Moreover, the finding that NC1(XIX) does not decrease the cell number in cell proliferation experiments is not in favour of a pro-apoptotic effect.

To investigate whether NC1(XIX) might actually decrease tumor cell migration, we decided to use the "scratch wound" model, in which a sub confluent cell layer is wounded using a pipet tip. The scratch results in a cell free gap of approximately 1.0 mm between two areas of cancer cells, which will then migrate from both sides for covering the wounded area. An improved variant of this test is constituted

by the Ibidi[®] devices in which cancer cells are seeded and grown to sub-confluence in two culture compartments separated by a silicone insert. Elimination of the insert induces cell migration without the need to scratch the cell layer. In both cases, cell migration may be followed, either by measuring the size of the wound at different times after the scratch, or by following individual cell trajectories using time-lapse microscopy. Quantitative analysis of cell migration by time-lapse video-microscopy allowed us to demonstrate that cell migration speed and cell displacement were significantly decreased in the presence of NC1(XIX), showing that intrinsic capacities of cells to migrate were altered.

The decreased invasive capacities of melanoma cells incubated with NC1(XIX) was confirmed by the Matrigel[®] invasion test. Previous data from our laboratory [16] showed that the invasive capacities of B16 melanoma cells were strongly decreased by NC1(XIX). This effect was confirmed in this paper by showing that it was also found with UACC903 human melanoma cells.

Cell migration is a complex and heterogeneous process [27]. It results from coordinated actomyosindriven shape changes of the cell body [28] and involves many intracellular signalling cascades including Focal Adhesion Kinase (FAK) phosphorylation [29], Rac and Rho signalling [30,31], Phospholipase C β activation [32] Erk 1/2 activation [33], and many others. It also involves the expression of specific proteinases, particulary Matrix Metallo-Proteinases (MMP) [34]. Prelimary results indicate that the expression of uPA, an enzyme known to activate the plasminogen / plasmin system, involved in cancer invasion [35], is decreased in melanoma cells incubated with NC1 (XIX). It was not the aim of this paper to investigate the machinery involved in the inhibiting effects of the NC1(XIX) peptide. It is likely, however, that NC1(XIX) alters one or more of these intracellular pathways for inhibiting cell migration. We previously showed that other similar extracellular matrixderived peptides (also called matrikines), may modify cell response by interacting with specific membrane integrin subunits [36,37]. Our present results lead us to make the hypothesis that the same process might occur with the NC1(XIX) peptide.

Collectively, our results show that the inhibitory effect of the NC1(XIX) peptide on experimental melanoma is mediated, at least in part, by an inhibition of tumor cell migration. It does not exclude, however, that other effects might be involved, for instance on tumoral neo-angiogenesis [16] or on melanoma stem cells [38]. Further investigations will be necessary to elucidate its mechanism of action.

<u>Acknowledgements</u>: The authors thank the Institut National Contre le Cancer (INCA) (ACI Cancéropole 2008-2010), the Fonds Européen pour le Développement Régional (FEDER), the Région Champagne-Ardenne and the Ligue Nationale contre le Cancer, Comité de la Haute Marne, for their financial support. A.T. is a fellow of the Institut Francais de Coopération (IFC) de Tunis. Mrs S. Etienne is greatly acknowledged for typing the manuscript.

Conflict of interest : None

<u>References</u> :

- Yoshioka H, Zang H, Ramirez F, Mattei MG, Moradi-Ameli M, Van der Rest M, Gordon MK. Synteny between the loci from a novel FACIT-like collagen locus (D6S228E) and α1(XIX) collagen (COL19A1) on 6q12-14 in human. *Genomics* 1992;13:884-886.
- 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;123:211-217.
- Inoguchi K, Yoshioka H, Khaleduzzaman M, Ninomiya Y. The mRNA for α1(XIX) collagen chain, a new member of FACITs, contains a long unusual 3' untranslated region and displays many unique splicing variants. *J Biochem* 1995;117:137-148.
- Ricard-Blum S, Dublet B, Van der Rest M. Unconventional collagens : types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV and XIX. *Protein profile*. Oxford University Press (Oxford, England), 2000, pp 68-73.
- 5. 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;151:1729-1740.
- 6. 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;272:17104-17111.
- Myers JC, Li D, Amenta PS, Clark CC, Nagaswani 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 heparinbinding amino termini. *J Biol Chem* 2003;278:32047-32057.
- 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 α1(XVI). *J Biol Chem* 1994;269:18549-18557.
- 9. Boudko SP, Engel T, Bächinger HP. Trimerization and triple helix stabilization of the collagen XIX NC2 domain. *J Biol Chem* 2008;283:34345-34351.
- Myers JC, Li D, Rubinstein NA, Clark CC. Up-regulation of type XIX collagen in rhabdomyosarcoma cells accompanies myogenic differentiation. *Exp Cell Res* 1999;253:587-598.
- 11. Sumiyoshi H, Laub F, Yoshioka H, Ramirez F. Embryonic expression of type XIX collagen is transient and confined to muscle cells. *Dev Dyn* 2001;220:155-162.
- Sumiyoshi H, Mor N, Lee SY, Doty S, Henderson S, Tanaka S, Yoshioka H, Rattan S, Ramirez F. Eosophageal muscle physiology and morphogenesis require assembly of a collagen XIX-rich basement membrane zone. *J Cell Biol* 2004;166:591-600.

- 13. Su J, Gorse K, Ramirez F. Collagen XIX is expressed by interneurons and contributes to the formation of hippocampal synapses. *J Comp Neurol* 2010;518:229-253.
- Amenta PS, Hadad S, Lee MI, Barnard N, Li D, Myers JC. Loss of type XV and XIX collagens precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of the female breast. *J Pathol* 2003;199:298-308.
- 15. 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.
- Ramont L, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Deshorgue A, Venteo L, Laronze JY, Pluot M, Monboisse JC. The NC1 domain of type XIX collagen inhibits *in vivo* melanoma growth. *Mol Cancer Ther* 2007;6:506-514.
- 17. Bouifraden S, Drouot C, El Hadrami M, Guenoun F, Lecointe L, Mai N, Paris M, Pothion C, Sadoune M, Sauvagnat B, Amblard M, Aubagnac JL, Calmes M, Chevallet P, Daunis J, Enjalbal E, Ferentz JA, Lamaty F, Lavergne JP, Lazaro R, Rolland V, Roumestand ML, Viallefond P, Vidal Y, Martinez J. Some of the amino acid chemistry going on in the laboratory of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 1999:345-379.
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. Biol Pharm Bull. 1996 Nov;19(11):1518-20.
- Zahm JM, Kaplan H, Hérard AL, Doriot F, Pierrot D, Somlette P, Puchelle E. Cell migration and proliferation during the *in vitro* wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil. Cytoskel*. 1997;37:33-43.
- 20. Wald M, Olejar T, Sebkova M, Zadinova M, Boubelik M, Pouckova P. Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57B16 mice with syngenic melanoma B16. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;47:16-22
- 21. Fritsch P, Burgdorf W, Murphy G, Ring J. Skin diseases in Europe. *Eur J Dermatol*, 2006;16:209-218.
- 22. Friedl P, Wolf K. Tumour cell invasion and migration : diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362-637.
- 23. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration : a multiscale tuning model. J Cell Biol, 2010,188:11-19.
- 24. Linder S. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. Trends Cell Biol, 2007,17:107-117.
- 25. Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: Who, When and How? Trends Cell Biol, 2008,18:560-574.
- Pasco S, Ramont L, Maquart FX, Monboisse, JC. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:221-233.
- 27. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration : a multiscale tuning model. *J Cell Biol* 2010;188:11-19.
- 28. Lauffenburger DA, Horwitz AF Cell migration : a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359-369.
- 29. Spack J, Adams RB, Rovin JD, Bissonette EA, Stoker CE, Parsons JT. Alteration in the Focal Adhesion Kinase/Src signal transduction pathway correlates with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:1152-1163.
- 30. Nobes CD, Hall A. Rho-GTPases control polarity, protrusion and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 1999;144:1235-1244.
- 31. Sanz-Moreno V, Marshall CJ. Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. *Cell Cycle* 2009;8:1484-1487.
- Bertagnolo V, Benedusi M, Brugnoli F, Lanuti P, Marchisio M, Querzoli P, Capitani S. Phospholipase-C-beta-2 promotes mitosis and migration of human breast cancer-derived cells. *Carcinogenesis* 2007;28:1638-1645.
- 33. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, De Lanerolle P, Cheresh DA. Regulation of cell motility by mitogen activated protein kinase. *J Cell Biol* 1997;137:481-492.
- 34. Ohnishi Y, Tajima S, Ishibashi A. Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinases-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells. *Eur J Dermatol* 2001;11:420-423.
- 35. Mekkawy AH, Morris DL, Pourgholami MH. Urokinase plasminogen activator system as a potential target for cancer therapy. Future Oncol, 2009,9:1487-1499.
- 36. Shahan TA, Ziaic Z, Pasco S, Fawzi A, Bellon G, Monboisse JC, Kefalides NA. Identification of CD47/integrin-associated protein and alpha(v)beta-3 as two receptors for the α3(IV) chain of type IV collagen on tumor cells. *Cancer Res* 1999;59:4584-4590.
- 37. Pasco S, Monboisse JC, Kieffer N. The alpha 3 (IV) 185-206 peptide from non collagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the beta-3 suburit of integrin alpha-v beta-3 and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidyl-inositol 3 kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:32299-33007.
- 38. Kyrgidis A, Tzellos TG, Triaridis S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. J Carcinog, 2010,9:3.

Legend for figures :

Fig 1 : NC1 domain of type XIX collagen inhibits tumor growth in an experimental melanoma model.

B16F1 cells were subcutaneously injected to syngenic C57B16 mice (2.5 x 10^5 cells per mouse). Intraperitoneal injections of NC1(XIX) or scrambled peptides (10 mg/kg) were performed at days 7 and 14. Control animals received the same volume of normal saline at the same days. Tumor volume was measured at days 7, 10, 14 and 18. (Mean of 6 or 7 animals for each group \pm SD : * : significantly different from controls, p<0.05; ** p<0.01).

Fig 2 : NC1 domain of type XIX collagen has no significant effect on B16F10 and UACC 903 melanoma cell proliferation.

B16F10 cells (A) or UACC 903 cells (B) were plated into 96-well plates and incubated for 24 or 48h with NC1(XIX) or scrambled peptides (30, 60 or 120 μ mol/L). Cell number was appreciated using the WST1 test. (Mean of 4 experiments \pm SD : NS : No significant difference)

Fig 3 : NC1 domain of type XIX collagen inhibits wound closure by B16F10 melanoma or UACC 903 cells in the scratch wound assay.

B16F10 (A) or UACC (B) melanoma cells were seeded in 24-well plates until subconfluence. Artificial scratch wound was performed as described in the "Methods " section and the cells were incubated with or without NC1(XIX) peptide at the concentration 30, 60 or 120 μ mol/L. Photographs were taken after 24h, using a phase-contrast inverted microscope, and the mean wound size \pm SD after 0 and 24h of at least of 10 measurements was calculated. The black lines indicate the margins of the wounds.

Fig 4 : Kinetic analysis of the inhibition of migration of B16F10 melanoma cells by the NC1 domain of type XIX.

B16F10 melanoma cells were seeded on 24-well plates. Artificial wound was performed and the cells were incubated with or without NC1(XIX) peptide at the concentration 30 μ mol/L. Kinetic analysis of the migration of at least 15 cells, was performed using time-lapse microscopy. Difference of mean wound size between t0 and t12h, t24h and t36h are presented.

Fig 5 : NC1 domain of type XIX collagen decreases cell displacement along the "X" axis during artificial wound closure.

B16F10 melanoma cells were seeded in Ibidi[®] devices and grown to subconfluence. Artificial wound was performed by removing the silicon insert and the cells were incubated with or without NC1(XIX) peptide at the concentration 30 or 60 µmol/L. Individual migration of 15 randomly choosed cells was followed using time-lapse microscopy, using the Metamorph[®] software. Individual cell trajectories (A) and cell displacement along the "X" axis (B) are presented.

(Mean \pm SD : * : significantly different from control, p<0.05; ** p<0.01).

Fig 6 : NC1 domain of type XIX collagen inhibits the invasion of UACC903 human melanoma cells in Matrigel assay.

50,000 UACC cells were seeded onto Transwell membranes coated with Matrigel[®].

After 24h incubation in the absence (control) or presence of NC1 (XIX) in the culture medium (30 μ mol/L), migrated cells on the lower face of the membrane were counted.

Left : representative photographs of the migrated cells after 24h incubation.

Right : Quantification of the migrated cells (mean of 4 transwell membranes ± 1 SD, * p<0.05)

Fig. 1



Fig. 2



■ Control □ NC1(XIX) 30 µmol/L ■ NC1(XIX) 60 µmol/L ■ NC1(XIX) 120 µmol/L







Α



В



Fig. 4





-100

-50

-50 -

100

50

150

200

250



Fig. 6









Effet anti-tumoral et anti-angiogénique du domaine NC1 du collagène XIX: Caractérisation de la séquence minimale active et étude du mécanisme d'action

Résumé

Le nefinarme, cancer à huit potentiel métastatique, est actuellement en pleine expansion. C'est une timeur cannée qui prend missance à la jonction derme-épideme, où sont localisés les melanorytes. L'invasion tumorale est la plase clé du processus cancéroux. La migration cellulaire constitue le point de dayra du processus métastique et accompagne l'invasion tumorale. Le collagène XIX est un collagène mineur de la zone des membranes baales, associe à d'aures types de collagène est les losaries (Ramon et al 2007). Dans l'index que est le domaine NC1 (XIX) est eu collagène mineur de la zone des membranes baales, associe à d'aures, types de collagène est la sourie (Ramon et al 2007). Dans l'index que est présentent est les constructions et al 2007). Dans l'index que est présentent est vises de la souries (Ramon et al 2007). Dans l'index que est présentent est vises de la souries (Ramon et al 2007). Dans l'index que est resonauxes du di l'effet aut-iumoral discrevé in vivo n'est pas dù à l'inhibition de la proliferation in la des modifications est capacités d'attivision tenzendie et sur l'effet anti-tumoral est errouré aussis des capacités d'attivis des la constru (Ramon et la visor). Cet effet anti-tumoral est errouré aussis les portes cellulaire de melanome minitre (II-10), construction de la distruction d'attivis des la présent munisse (HUVE). L'inhibition de la progression tumorale tavité n'ivo dans les modifies de blessare artificielle. NCI (XIX) inthe aussis len la migration des cellulas modifies de blessare artificielle. NCI (XIX) inthe aussis len la migration de scellulas modifies de blessare artificielle. NCI (XIX) inthe aussis len la migration de scellulas modifies de blessare artificielle. NCI (XIX) inthes aussis pour les cellulas modifies de blessare artificielle. NCI (XIX) inthe aussis len la migration de scellulas modifies de blessare artificielles. NCI (XIX) inthes aussis len la migration des cellulas modifies de blessare artificielles. NCI (XIX) inthes aussis len la neingristione

Mots clés Collagène associés aux fibrilles(FACITs)- Collagène de type XIX- Mélanome- Invasion tumorale- Migration cellulaire-Angiogenése

COORDONNEES Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire CNRS UMR 6237 – IFR 53 Interactions Cellules-Microenvironn UFR Médecine – 51 Ruc Cognacq-Jay - 51095 REIMS Cedex