

Université de Reims Champagne Ardenne
UFR Médecine
Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

Année 2011

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNE

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 9 décembre 2011

par

Karine SENECHAL

Activité anti-tumorale d'une matrikine dérivée des domaines NC1 du collagène IV de membrane basale

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire

CNRS UMR 6237 - IFR 53 Biomolécules

UFR Médecine de Reims

Co-direction : Monsieur le Docteur Jean-Claude MONBOISSE

Madame le Docteur Sylvie BRASSART-PASCO

Membres du Jury

Rapporteurs : Madame le Professeur Sylvie RICARD-BLUM (Lyon)
Monsieur le Professeur Franck CARREIRAS (Cergy-Pontoise)

Président du jury : Monsieur le Professeur Philippe BIREMBAUT (Reims)

Examineur : Madame le Docteur Marie-Lise JOURDAN (Tours)

Directeurs de thèse : Monsieur le Docteur Jean-Claude MONBOISSE (Reims)
Madame le Docteur Sylvie BRASSART-PASCO (Reims)

À la mémoire d'Anne,

À mes parents,

À mes frères,

À Mélanie,

À Michaël, mon amour

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le *Pr François-Xavier Maquart* de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, le laboratoire de biochimie médicale et de biologie moléculaire (UMR CNRS 6237). Merci de m'avoir donné les moyens d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions.

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à mes directeurs de thèse, le *Dr Jean-Claude Monboisse* et le *Dr Sylvie Brassart-Pasco*, pour avoir dirigé cette thèse ainsi que pour leur aide précieuse au cours de ces trois années. Je vous remercie pour vos conseils, votre disponibilité, votre gentillesse et pour votre aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le *Pr Sylvie Ricard-Blum* et le *Pr Franck Carreiras* d'avoir accepté de juger ce travail et d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également au *Pr Sylvie Ricard-Blum* pour votre collaboration et votre accueil chaleureux lors de ma venue dans votre laboratoire.

Je remercie le *Pr Philippe Birembaut* et le *Dr Marie-Lise Jourdan* d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs. Merci au *Dr Marie-Lise Jourdan* pour sa collaboration et sa disponibilité lors des études du cycle cellulaire.

Je remercie très sincèrement le *Dr Jessica Thevenard* d'avoir initié ce travail lors de sa thèse.

Je tiens à remercier le *Dr Laurent Ramont* et le *Dr Sylvain Dukic* pour leur aide, leur disponibilité et leurs conseils lors des études *in vivo*. Merci pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Merci au *Dr Jérôme Devy* pour sa collaboration et sa disponibilité lors des études d'immunocytochimie.

Je tiens également à exprimer ma gratitude au *Dr Stéphane Brézillon* pour son aide précieuse lors des immunomarquages sur les coupes de tumeurs, les conseils techniques et scientifiques qu'il m'a apportés et pour sa gentillesse.

Merci à *Jean-François Jazeron* pour l'aide qu'il m'a apportée lors de l'analyse histologique des coupes de tumeurs.

J'aimerais également remercier le *Dr Christine Terry* pour son aide lors des acquisitions en microscopie et la quantification des immunomarquages. Merci beaucoup pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta bonne humeur.

Je remercie *Monsieur Yves Gourdin* pour sa disponibilité et sa gentillesse pour l'impression de ce manuscrit.

J'associe à ces remerciements le *Pr Philippe Gillery*, ainsi que les *Dr Franck Antonicelli*, *Dr Georges Bellon*, *Dr Roselyne Garnotel*, *Dr Hervé Hémonard*, *Dr William Hornebeck*, *Dr Stéphane Jaisson*, *Dr Didier Marot* et *Dr Yanusz Wegrowski* pour leurs nombreux conseils et remarques au cours des réunions de laboratoire.

Un grand merci à tout le personnel du laboratoire et en particulier à nos supers techniciennes pour leur expertise technique. Un grand merci à *Martine*, ton départ à la retraite bien mérité l'année dernière à laisser un vide dans le laboratoire. Merci de tout cœur à *Coco* pour ta bonne humeur, tes conseils, ton soutien et ta gentillesse. Un grand merci également à *Aurélie*, pour ton soutien, ta persévérance dans la production de la protéine recombinante et ta bonne humeur. Je remercie également *Christèle*, pour le temps que tu consacres à l'entretien de la pièce de culture et tes conseils, ainsi qu'*Isabelle*, reine des mots-fléchés du midi, pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Je remercie également *Catherine*, notre secrétaire géniale, pour ta disponibilité sans faille et ta gentillesse. Enfin, merci à *Joan*, *Julien*, *Jean-Baptiste*, *Mariusz*, *Kasia* et *Laëtitia* pour les bons moments partagés.

A toutes mes collègues de bureau, merci beaucoup. D'abord *Aida*, pour ton soutien et ta bonne humeur, je tiens à te remercier chaleureusement. C'était un peu du soleil de Tunis que tu apportais dans notre bureau. Puis *Jeza*, merci pour nos discussions, nos rires, ton soutien et ton don pour rappeler les « deadline » (lol !!!). Je te souhaite de continuer aussi bien tes deux dernières années de thèse que la première, beaucoup de courage et ne perds pas ta motivation ! Merci à *Sandrine*, qui n'a fait qu'un court passage dans notre bureau mais qui a rempli le laboratoire de joie, de bonne humeur et de beaucoup de petites expressions bien sympathiques tout au long de ma thèse ! Je te souhaite beaucoup de réussite à Toulouse. Enfin, merci à *Emilie*, qui vient de revenir dans notre laboratoire, pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier du fond du cœur mes collègues et amies *Caro*, *Julia* et *Claire*. Je vous remercie toutes les trois pour votre soutien, votre aide, vos conseils, nos fous-rires, nos discussions, les petites pauses à regarder des choses et d'autres sur internet, les petits restos le midi (qui ne seront

pas les derniers, j'en suis sûre !). Ces dernières années de thèse ont été d'autant plus agréables grâce à vous. *Caro*, merci pour ta joie de vivre, nos discussions et ces bons moments passés ensemble. *Julia*, tu m'as beaucoup fait rire et tes conseils au cours de ma thèse m'ont beaucoup aidé (je pense d'ailleurs que je vais bientôt mettre en pratique celui des escaliers !!!). *Claire*, je te remercie pour tes conseils, tes corrections de mon manuscrit, ton aide, ta bonne humeur et ton soutien. A toutes les trois, je vous souhaite beaucoup de bonheur dans votre vie et beaucoup de réussite pour la suite ; en particulier *Caro*, pour ta dernière année de thèse, bon courage !!! Les quatre mousquetaires s'en vont peu à peu ... Allez, dispersion ...

Merci à mes amis du midi pizza : *Medhi, Cric, Aurore, Fred, Floriane, Florence, Sana* et tous les autres pour ces bons moments durant ces trois années.

Je remercie également *Christelle* pour nos délires du vendredi après-midi pendant ma première année de thèse, pour tes conseils et ton soutien.

Un grand merci à *Aurélie*, mon amie depuis la seconde année de Fac. Merci pour ton aide précieuse et tes corrections de mon manuscrit, nos discussions pendant la pause café, pour ton soutien sans faille, tes conseils, ton amitié, d'être ma mauvaise conscience parfois. Je te remercie d'avoir toujours été là durant les petits « coups de blues ». Merci d'être une amie aussi géniale qui assure même quand je suis « bloquée » sur le parking !!! Merci pour tout.

Enfin, je souhaite remercier *ma famille* et *mes belle-familles* pour leur confiance et leur soutien. Je remercie *mes parents*, en particulier *maman*, tu m'as toujours soutenue et poussée à aller au bout de ce que je voulais. C'est grâce à toi si je suis celle que je suis aujourd'hui. Merci à mes frères pour leur soutien. *Mickaël*, mon grand frère, c'est l'admiration que je te porte, le respect que tu m'inspires et ton soutien qui me permettent d'aller toujours plus loin. *Sébastien*, mon petit frère que j'adore, tes sourires me remplissent de joie et m'ont permis de me ressourcer. Je remercie *Mélanie*, ma belle-sœur et ma sœur de cœur, tu me rappelles que je ne suis pas infaillible et ton amitié, ton soutien sont très importants pour moi.

Je ne saurais terminer ces remerciements par celui que j'aime et qui partage ma vie, *Mickaël*. Pour ton amour, ton soutien, ta présence, ta patience, ta compréhension, ton humour pas toujours drôle mais qui me fait rire quand même, je te remercie. Merci d'être celui que tu es et de m'avoir supportée durant ces années même si ce n'était pas tous les jours facile.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail et que j'ai malencontreusement oublié de citer, désolé et merci pour tout !!!

FINANCEMENTS

Je tiens à remercier la *région Champagne Ardenne* pour le financement de ces travaux dans le cadre du CPER-FEDER.

RESUME

Titre : Activité anti-tumorale d'une matrikine dérivée des domaines NC1 du collagène IV de membrane basale

Le mélanome est le cancer cutané le plus invasif. Au cours de l'invasion tumorale et de la dissémination métastatique, les cellules tumorales sont capables de dégrader la matrice extracellulaire par la sécrétion de protéases telles que les MMPs. Lors de cette protéolyse matricielle, différents fragments de la matrice extracellulaire exerçant des activités anti-tumorale et/ou anti-angiogénique, nommés matrikines, sont libérés et modulent la croissance tumorale. De nombreuses matrikines dérivées des collagènes de membrane basale sont capables de limiter la progression tumorale. Nous avons étudié les propriétés anti-tumorales du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, nommé tétrastatine, à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de mélanome humain. La tétrastatine induit une inhibition de la prolifération et de l'invasion des cellules de mélanome *in vitro*. L'inhibition de prolifération est corrélée à un retard en phase G1/S du cycle cellulaire en présence de tétrastatine. L'inhibition de l'invasion peut notamment s'expliquer par une inhibition de l'activation de la MMP-14 et une modification de sa répartition cellulaire, avec perte du phénotype migratoire en présence de tétrastatine. *In vivo*, la surexpression de la tétrastatine induit une forte inhibition de la croissance tumorale, dans un modèle de xéno greffe de mélanome humain chez la souris nude. Nous avons également pu identifier l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme un récepteur potentiel de la tétrastatine. Enfin, l'étude des capacités anti-prolifératives et anti-invasives des cellules UACC 903 en présence de différents peptides permet aujourd'hui de mieux préciser la séquence responsable de l'activité anti-tumorale de ce domaine. En conclusion, la tétrastatine est une nouvelle matrikine à fort potentiel anti-tumoral capable de limiter la progression du mélanome.

Mots – clés : collagène type IV, mélanome, matrikine, intégrine $\alpha_v\beta_3$, métalloprotéinases matricielles, invasion tumorale.

Title : Anti-tumor activity of a matrikine derived from NC1 domains of basement membrane collagen IV.

Melanoma is the most invasive cutaneous cancer. During tumor invasion and metastatic dissemination, tumor cells degrade the extracellular matrix by secretion of proteases such as MMPs. During matrix proteolysis, fragments of the extracellular matrix with anti-tumor and/or anti-angiogenic activities, called matrikines, are released and modulate tumor growth. Many matrikines derived from basement membrane collagens are able to inhibit tumor progression. We studied the anti-tumor properties of the domain NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, named tetrastatin, both *in vitro* and *in vivo* in a human melanoma model. Tetrastatin induces inhibition of proliferation and invasion of melanoma cells *in vitro*. This inhibition of proliferation is correlated to a cell cycle delay in G1/S phase when cells are incubated with tetrastatin. The inhibition of invasion could be due, at least partly, to the inhibition of MMP-14 active form and modification of its cellular distribution, with a loss of the migratory phenotype in the presence of tetrastatin. *In vivo*, tetrastatin overexpression induces a strong inhibition of tumor growth, in a human melanoma xenograft model in nude mice. We also identified integrin $\alpha_v\beta_3$ as a potential receptor of tetrastatin. Finally, the study of the anti-proliferative and anti-invasive properties of the UACC 903 cells in the presence of different peptides allows us to better identify the sequence responsible of the anti-tumor activity. In conclusion, tetrastatin is a new potent anti-tumor matrikine capable of limiting melanoma progression.

Keywords: collagen type IV, melanoma, matrikine, $\alpha_v\beta_3$ integrin, matrix metalloproteinases, tumor invasion.

SOMMAIRE

Liste des illustrations	1
Liste des abréviations	6
Liste des communications	11
I/ INTRODUCTION	13
<i>I-1/ Le cancer</i>	14
<u>I-1-1/ Généralités</u>	14
<u>I-1-2/ Le mélanome</u>	15
<i>I-1-2-1/ La peau</i>	15
<i>I-1-2-2/ Epidémiologie</i>	17
<i>I-1-2-3/ Les facteurs de risques</i>	17
<i>I-1-2-4/ Diagnostic et traitements</i>	18
<u>I-1-3/ La progression tumorale</u>	20
<i>I-1-3-1/ Dérégulation du cycle cellulaire</i>	20
I-1-3-1-1/ Les différentes phases du cycle cellulaire	20
I-1-3-1-2/ Principaux acteurs du cycle cellulaire	21
<i>I-1-3-2/ La protéolyse matricielle</i>	24
I-1-3-2-1/ Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs, les TIMPs	24
I-1-3-2-2 / Le système plasminogène-plasmine	29
I-1-3-2-3/ Les adamalysines ADAMs et ADAMTSs	31
<i>I-1-3-3/ Adhésion et migration cellulaire</i>	33
I-1-3-3-1/Les différentes phases du phénomène migratoire	34
I-1-3-3-2/ Les acteurs de la migration	36
<i>I-1-3-4/ L'angiogenèse tumorale</i>	42
<i>I-2/ La matrice extracellulaire</i>	45
<u>I-2-1/Généralités</u>	45

<u>I-2-2/ Les membranes basales</u>	46
I-2-2-1/ Généralités	46
I-2-2-2/ Structure des membranes basales	46
I-2-2-3/ Les composants des membranes basales	48
I-2-2-3-1/ Protéoglycannes	48
I-2-2-3-2/ Glycoprotéines non collagéniques	48
I-2-2-3-3/ Les collagènes	50
<i>I-3/ Les matrikines dérivées du collagène IV</i>	57
<u>I-3-1/ La triple hélice</u>	57
<u>I-3-2/ L'arrestène</u>	58
<u>I-3-3/ La canstatine</u>	58
<u>I-3-4/ La tumstatine</u>	59
<u>I-3-5/ La pentastatine-1</u>	60
<u>I-3-6/ L'hexastatine</u>	60
<u>I-3-7/ Le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4(IV)$</u>	60
<i>But de l'étude</i>	62
II/ MATERIELS ET METHODES	64
<i>II-1/ Matériels et réactifs utilisés</i>	65
<i>II-2/ Culture cellulaire</i>	68
<u>II-2-1/ Lignées cellulaires</u>	68
<u>II-2-2/ Conditions de culture</u>	69
<u>II-2-3/ Etude de la viabilité cellulaire</u>	69
<i>II-3/ Peptides synthétiques utilisés</i>	70
<i>II-4/ Production du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$</i>	70
<u>II-4-1/ Production en système procaryote</u>	70
<u>II-4-2/ Surexpression de la protéine recombinante 3xFLAG-NC1 $\alpha 4(IV)$ par les cellules UACC 903</u>	71

<i>II-5/ Etude de l'effet anti-tumoral de la surexpression du domaine NC1 α4(IV) in vivo</i>	71
<u>II-5-1/ Modèle expérimental</u>	71
<u>II-5-2/ Mesure des tumeurs</u>	72
<i>II-6/ Prolifération cellulaire</i>	72
<i>II-7/ Etude du cycle cellulaire</i>	72
<u>II-7-1/ Synchronisation des cellules</u>	73
<u>II-7-2/ Cinétique du cycle cellulaire</u>	73
<u>II-7-3/ Marquage à l'iodure de propidium</u>	73
<i>II-8/ Migration cellulaire</i>	74
<i>II-9/ Invasion cellulaire</i>	74
<i>II-10/ Etude biochimique</i>	74
<u>II-10-1/ Préparation des échantillons</u>	75
<i>II-10-1-1/ Préparation d'extraits protéiques totaux</i>	75
<i>II-10-1-2/ Préparation d'extraits protéiques nucléaires</i>	75
<i>II-10-1-3/ Préparation d'extraits protéiques à partir des tumeurs</i>	76
<u>II-10-2/ Zymographie</u>	76
<u>II-10-3/ Zymographie inversée</u>	77
<u>II-10-4/ Zymographie plasminogène</u>	77
<u>II-10-5/ Western-blot</u>	78
<i>II-10-5-1/ Electrophorèse en conditions dénaturantes</i>	78
<i>II-10-5-2/ Transfert</i>	78
<i>II-10-5-3/ Immunodétection</i>	78
<i>II-11/ Immunocytochimie</i>	79
<u>II-11-1/ Conditions de culture</u>	79
<u>II-11-2/ Immunomarquages</u>	79
<i>II-12/ Immunohistochimie</i>	79

<u>II-12-1/ Réalisation des coupes des tumeurs</u>	79
<u>II-12-2/ Immunomarquages</u>	80
II-13/ Analyse en PCR quantitative	80
<u>II-13-1/ Extraction d'ARN</u>	80
<u>II-13-2/ Transcription inverse</u>	81
<u>II-13-3/ PCR quantitative</u>	82
II-14/ Etude du récepteur	82
<u>II-14-1/ Adhésion dépendante des cations divalents</u>	82
<u>II-14-2/ Adhésion en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou la sous-unité d'intégrine β_1</u>	83
<u>II-14-3/ Interaction de la protéine recombinante avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou l'intégrine $\alpha_5\beta_1$</u>	83
<u>II-14-4/ Marquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules</u>	84
III/ RESULTATS	86
<i>III-1/ Effet de la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par les cellules de mélanome UACC 903 in vitro</i>	87
<u>III-1-1/ Mise en évidence de la sécrétion de la protéine 3xFLAG NC1 $\alpha 4(IV)$ par les cellules de mélanome</u>	87
<u>III-1-2/ Inhibition de la prolifération cellulaire</u>	88
<u>III-1-3/ Inhibition de la migration cellulaire</u>	90
<u>III-1-4/ Inhibition de l'invasion cellulaire</u>	91
<u>III-1-5/ Effets sur le système protéolytique</u>	92
<i>III-1-5-a/ Effets sur la production de MMP-2 et MMP-9</i>	92
<i>III-1-5-b/ Effets sur les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMP)</i>	93
<i>III-1-5-c/ Etude du système plasminogène</i>	94
<i>III-1-5-d/ Effets du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ sur la MMP-14</i>	95
<i>III-2/ Effet de la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par les cellules de mélanome UACC 903 in vivo</i>	99
<u>III-2-1/ Evolution du volume tumoral</u>	99
<u>III-2-2/ Observation histologique des tumeurs</u>	100
<u>III-2-3/ Effet de la tétrastatine sur la sécrétion du collagène I</u>	102

<u>III-2-4/ Immunohistochimie sur les coupes de xénogreffes</u>	103
<i>III-2-4-1/ Production de la tétrastatine</i>	103
<i>III-2-4-2/ Effet sur la prolifération</i>	105
<i>III-2-4-3/ Effet sur la MMP-14</i>	105
<i>III-2-4-4/ Effet sur la néo-angiogenèse</i>	106
<u>III-2-5/ Effet sur la sécrétion de protéases <i>in vivo</i></u>	107
<i>III-3/ Effet de la protéine recombinante <i>in vitro</i></i>	109
<u>III-3-1/ Production de la protéine recombinante dans un système procaryote</u>	109
<u>III-3-2/ Activité biologique de la protéine recombinante NC1 $\alpha 4(IV)$</u>	110
<i>III-3-2-1/ Etude de la prolifération de différentes lignées cellulaires en présence de NC1 $\alpha 4(IV)$</i>	110
<i>III-3-2-2/ Etude du cycle cellulaire des UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$</i>	114
III-3-2-2-1/ Synchronisation des cellules	114
III-3-2-2-2/ Etude du cycle cellulaire en présence du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$	116
<u>III-3-3/ Inhibition de la migration en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$</u>	124
<u>III-3-4/ Inhibition de l'invasion en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$</u>	125
<u>III-3-5/ Etude des systèmes protéolytiques en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$</u>	125
<i>III-4/ Etude d'un récepteur potentiel du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$: l'intégrine $\alpha_v\beta_3$</i>	126
<u>III-4-1/ Adhésion des cellules UACC 903 au domaine NC1 $\alpha 4(IV)$: dépendance des cations divalents</u>	126
<u>III-4-2/ Expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules UACC 903</u>	127
<u>III-4-3/ Inhibition de l'adhésion des cellules UACC 903 au domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ en présence d'anticorps bloquant</u>	129
<u>III-4-4/ Interaction du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$</u>	131
<u>III-4-5/ Etude de la prolifération et de l'invasion en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la sous-unité d'intégrine β_1</u>	133
<i>III-4-5-1/ Prolifération en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou la sous unité d'intégrine β_1</i>	133
<i>III-4-5-2/ Invasion en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$</i>	135
<i>III-5/ Etude de la séquence active du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$</i>	136

<u>III-5-1/ Mise en évidence de la sécrétion de la protéine 3xFLAG-NC1 α4(IV) [180-229]</u>	136
<u>par les cellules de mélanome</u>	
<u>III-5-2/ Effets biologiques de la surexpression du domaine NC1 α4(IV) [180-229]</u>	137
<u>III-5-3/ Etude de la prolifération et de l'invasion des cellules UACC 903 en présence du peptide AR-50</u>	138
<u>III-5-4/ Etude de la prolifération et de l'invasion des cellules UACC 903 en présence du peptide CS-50</u>	140
IV/DISCUSSION	142
<u>IV-1/ Inhibition de la croissance tumorale <i>in vivo</i></u>	143
<u>IV-2/ Effet sur l'angiogenèse <i>in vivo</i></u>	144
<u>IV-3/ Inhibition de la croissance tumorale <i>in vitro</i></u>	146
<u>IV-4 Inhibition de la prolifération <i>in vitro</i></u>	147
<u>IV-5/ Etude du récepteur potentiel</u>	148
<u>IV-6/ Détermination de la séquence active</u>	150
V/ CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	152
VI/ BIBLIOGRAPHIE	158
VII/ ANNEXE	178

LISTE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Structure de la peau</i>	16
<i>Figure 2 : Régulation du cycle cellulaire</i>	22
<i>Figure 3 : Structure des MMPs</i>	25
<i>Figure 4 : Mécanisme d'activation de la MMP-2</i>	28
<i>Figure 5 : Le système plasminogène-plasmine</i>	31
<i>Figure 6 : Activation des ADAMs et ADAM-TSs</i>	32
<i>Figure 7 : Etapes de la migration</i>	35
<i>Figure 8 : Structure des intégrines</i>	37
<i>Figure 9 : L'adhésion focale et le rôle de FAK</i>	39
<i>Figure 10 : Régulation de l'endocytose de la MMP-14 par le complexe FAK/Src</i>	40
<i>Figure 11 : Rôle de la polymérisation de l'actine dans l'initiation de la migration</i>	41
<i>Figure 12 : L'angiogénèse tumorale</i>	43
<i>Figure 13 : Classement des principaux miRNA en fonction de leur implication dans l'angiogénèse tumorale</i>	44
<i>Figure 14 : Structure et assemblage de la membrane basale</i>	47
<i>Figure 15 : Classification des collagènes</i>	51
<i>Figure 16 : Structure du collagène XV</i>	52
<i>Figure 17 : Structure du collagène XVIII</i>	53
<i>Figure 18 : Structure du collagène XIX</i>	54
<i>Figure 19 : Structure du collagène IV</i>	56
<i>Figure 20 : Formation du réseau du collagène IV</i>	57
<i>Figure 21: Caractérisation par PCR des clones UACC 903 transfectés par le plasmide p3xFLAG-CMV-9 contenant ou non la séquence codant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$</i>	87
<i>Figure 22 : Mise en évidence de la sécrétion du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par les cellules de mélanome UACC 903</i>	88
<i>Figure 23 : Prolifération des clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ pendant 48h</i>	89
<i>Figure 24 : Prolifération moyenne des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ pendant 48h</i>	89
<i>Figure 25 : Migration des clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 24h</i>	90

<i>Figure 26 : Migration moyenne des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 24h.....</i>	<i>91</i>
<i>Figure 27 : Invasion des clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 72h.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 28 : Etude de la sécrétion des MMP-2 et MMP-9 dans les surnageants de culture des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par zymographie (A) et quantification (B).....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 29 : Etude de la sécrétion des TIMP dans les surnageants de culture des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par zymographie reverse (A) et quantification (B).....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 30 : Etude de la sécrétion des activateurs du plasminogène t-PA et u-PA dans les surnageants de culture des différents clones UACC 903 par zymographie en gel de gélatine-plasminogène (A) et quantification (B).....</i>	<i>95</i>
<i>Figure 31 : Expression relative de l'ARNm de la MMP-14 dans les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ analysée par RT-PCR quantitative.....</i>	<i>96</i>
<i>Figure 32 : Etude de l'expression et de l'activation de la MMP-14 dans les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ analysée par western-blot (A) et quantification (B)....</i>	<i>97</i>
<i>Figure 33: Etude de la quantité moyenne de MMP-14 active par rapport à la quantité de MMP-14 totale dans les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$.....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 34 : Etude de la localisation de la MMP-14 à la surface des cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par microscopie confocale après immunomarquages à l'aide d'anticorps dirigés contre la MMP-14 et la cavéoline-1.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 35 : Morphologie finale (A) et évolution du volume tumoral (B) de xénogreffes de mélanome humain après injection de cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ en sous-cutané chez la souris athymique</i>	<i>100</i>
<i>Figure 36 : Histologie des tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 37 : Expression de la chaîne $\alpha 1(I)$ par les fibroblastes dermiques humains après incubation pendant 48h en présence de milieux conditionnés de cellules UACC 903 surexprimant ou non la tétrastatine, analysée par western-blot (A) et quantification (B)</i>	<i>102</i>
<i>Figure 38 : Immunomarquages anti-NC1 $\alpha 4(IV)$ (A) et anti-FLAG (B) sur les coupes de tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$</i>	<i>103</i>

<i>Figure 39 : Immunomarquage anti-Ki-67 et contre-coloration sur les coupes de tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NCI $\alpha 4(IV)$ (A) et quantification du marquage (B)</i>	104
<i>Figure 40 : Immunomarquage anti-MMP-14 et contre-coloration sur les coupes de tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NCI $\alpha 4(IV)$ (A) et quantification du marquage (B).....</i>	105
<i>Figure 41 : Quantification du nombre de vaisseaux par champ sur les coupes de tumeurs résultant de l'injection des cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NCI $\alpha 4(IV)$</i>	106
<i>Figure 42 : Quantification du périmètre des vaisseaux (en pixels) sur les coupes de tumeurs résultant de l'injection des cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NCI $\alpha 4(IV)$</i>	107
<i>Figure 43 : Etude de différents systèmes protéolytiques dans les extraits protéiques des tumeurs résultant de l'injection des cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NCI $\alpha 4(IV)$</i>	108
<i>Figure 44 : Production et purification de la protéine 6His-NCI $\alpha 4(IV)$ en système procaryote analysées par électrophorèse SDS-PAGE et western-blot anti-NCI $\alpha 4(IV)$ et anti-6His</i>	110
<i>Figure 45 : Etude de la prolifération de différentes lignées cellulaires de mélanome et de fibroblastes en présence de différentes concentrations du domaine recombinant NCI $\alpha 4(IV)$ pendant 72h.....</i>	111
<i>Figure 46 : Prolifération des cellules UACC 903 en présence de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NCI $\alpha 4(IV)$ pendant 48h après traitement ou non par l'hydroxyurée 2 mM</i>	115
<i>Figure 47 : Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules UACC 903 dans chacune des phases du cycle cellulaire au temps T_0 après le traitement avec l'hydroxyurée</i>	116
<i>Figure 48 : Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules UACC 903 dans chacune des phases du cycle cellulaire au temps T_0 après privation de SVF suivie du traitement avec l'hydroxyurée</i>	117
<i>Figure 49 : Analyse par cytométrie en flux de la cinétique de répartition dans chacune des phases du cycle cellulaire des cellules UACC 903 incubées en présence du domaine recombinant NCI $\alpha 4(IV)$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i>	118
<i>Figure 50 : Prolifération des cellules UACC 903 synchronisées en présence de différentes concentrations du domaine recombinant NCI $\alpha 4(IV)$</i>	119
<i>Figure 51 : Analyse par cytométrie en flux de la cinétique de répartition dans chacune des phases du cycle cellulaire des cellules UACC 903 incubées en présence du domaine recombinant NCI $\alpha 4(IV)$ à raison de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.....</i>	121
<i>Figure 52 : Etude de l'expression de la cycline D1 et de l'état de phosphorylation de la protéine pRb analysés par western-blot (A) et quantification (B).....</i>	123

<i>Figure 53 : Migration des cellules UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 24 h.....</i>	124
<i>Figure 54 : Invasion des cellules UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) étudiée en chambres de Boyden modifiées.....</i>	125
<i>Figure 55 : Adhésion cations divalents-dépendante des cellules UACC 903 sur un substratum de domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$.....</i>	127
<i>Figure 56 : Analyse par cytométrie en flux du marquage anti-$\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules UACC 903.....</i>	128
<i>Figure 57 : Western-blot anti-intégrine α_v et anti-intégrine β_3 sur les extraits protéiques de différents types cellulaires (A) et quantification (B).....</i>	129
<i>Figure 58 : Etude de l'adhésion des cellules UACC 903 sur le domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et/ou la sous-unité d'intégrine β_1.....</i>	130
<i>Figure 59 : Etude de l'interaction du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par résonance plasmonique de surface.....</i>	131
<i>Figure 60 : Etude par résonance plasmonique de surface de l'interaction du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ injecté à plusieurs concentrations avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ immobilisée.....</i>	132
<i>Figure 61 : Prolifération des cellules UACC 903 pendant 48h soit en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ à raison de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (A) soit en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ à raison de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant la sous-unité d'intégrine β_1 (B).....</i>	134
<i>Figure 62 : Invasion des cellules UACC 903 en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ à raison de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 72h.....</i>	135
<i>Figure 63 : Caractérisation par PCR des clones UACC 903 transfectés par le plasmide p3xFLAG-CMV-9 contenant ou non la séquence codant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$[180-229].....</i>	136
<i>Figure 64 : Mise en évidence de la sécrétion du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$[180-229] dans le milieu de culture des cellules UACC 903.....</i>	137
<i>Figure 65 : Evolution du volume tumoral de xénogreffes de mélanome humain après injection de cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$[180-229] en sous-cutané chez la souris nude.....</i>	138
<i>Figure 66 : Prolifération des cellules UACC 903 en présence de 40 μM de peptide AR-50.....</i>	139
<i>Figure 67: Invasion des cellules UACC 903 étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 72h en présence de différentes concentrations du peptide AR-50.....</i>	139

<i>Figure 68 : Prolifération des cellules UACC 903 pendant 72h en présence de différentes concentrations de peptide CS-50</i>	<i>140</i>
<i>Figure 69: Invasion des cellules UACC 903 étudiée en chambre de Boyden modifiée en présence de 40 µM de peptide CS-50 pendant 72h</i>	<i>141</i>
<i>Figure 70 : Corrélation entre l'expression relative de la sous-unité d'intégrine β₃ et l'inhibition de la prolifération observée chez les fibroblastes, les cellules A375, SK-Mel-28, HT-144 et UACC 903 après 72h d'incubation en présence de tétrastatine (20 µg/mL)</i>	<i>149</i>
<i>Figure 71 : Schéma représentant les séquences des différents peptides testés</i>	<i>151</i>
<i>Figure 72 : Schéma récapitulatif de l'action de la tétrastatine sur les cellules tumorales</i>	<i>156</i>

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac :	Anticorps
ADAM :	A disintegrin and metalloproteinase
ADAMTS :	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APS :	Persulfate d'ammonium
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
Arp :	Actin related protein
ATM :	Ataxia telangiectasia mutated
ATP :	Adénosine triphosphate
ATR :	Ataxia telangiectasia-related
BET :	Bromure d'éthidium
bFGF :	Basic fibroblast growth factor
BRAF :	Sérine/Thréonine protéine kinase B-Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma)
CAK :	Cdk activated kinase
Cdc 25 :	Cell division cycle 25
Cdk :	Cyclin dependant kinase
CKi :	Cyclin dependant kinase inhibitor
DDR :	Discoidin domain receptor

DEPC :	Diéthylpyrocarbonate
DMEM :	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DNase :	Désoxyribonucléase
dNTPs :	Désoxyribonucléotides triphosphates
DTT :	Dithiothréitol
ECL :	Electrochimiluminescence
EDTA :	Acide éthylène diamino tétraacétique
EGTA :	Etylène glycol tétraacétatique acide
EGF :	Endothelial growth factor
EHS :	Engelbreth Holm Swarm
Erk :	Extracellular signal regulated kinase
FAK :	Focal adhesion kinase
FACIT :	Fibril associated collagens with interrupted triplehelix
FGF :	Fibroblast growth factor
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP :	Green Fluorescent protein
GPI :	Glycosyl phosphatidyl inositol
Grb 7 :	Growth factor receptor-bound protein 7
HBSS :	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES :	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HIF :	Hypoxia inducible factor
HRE :	HIF responsive element
HUVEC :	Human umbilical vein endothelial cells
Ig :	Immunoglobuline
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
LYVE-1 :	Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor
MAPK :	Mitogen activated protein kinase
MIDAS :	Metal-ion dependant adhesion site
miRNA :	Micro-ribonucleic acid
MMP :	Matrix metalloproteinase
MT-MMP :	Membrane type matrix metalloproteinase
NEM :	N-éthyl-maléimide
NS :	Non significatif
N-WASP :	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
PAGE :	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAI :	Plasminogen activator inhibitor
pb :	Paire de bases
PBS :	Phosphate buffered saline
PCR :	Polymerase chain reaction
PDGF :	Platelet derived growth factor

PET :	Polyéthylène téréphtalate
PFA :	Paraformaldéhyde
PI3K :	Phosphatidyl inositol 3-kinase
PKC :	Protéine kinase C
PMSF :	Phenylmethanesulfonylfluoride
pRb :	Retinoblastoma protein
PVDF :	Poly(vinylidene fluoride)
RIP :	Regulated intramembrane proteolysis
RT-PCR :	Reverse transcription polymerase chain reaction
SAB :	Serum albumine bovine
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
SH3:	Src Homology 3 domain
SVF :	Serum de veau foetal
TBS :	Tris buffered saline
TBS-T :	Tris buffered saline - tween
TEMED :	Tétraméthyl-éthylène-diamine
TGF :	Transforming growth factor
tPA :	Tissular plasminogen activator
TIMP :	Tissue inhibitor of metalloproteinase
UACC :	University of Arizona Cancer Center
uPA :	Urokinase plasminogen activator

uPAR : Urokinase plasminogen activator receptor

UV : Ultra-violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

vWF : Von Willebrand factor

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications orales :

Senechal K, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Ramont L, Ricard-Blum S, Maquart FX, Monboisse JC
Tetrastatin, the NC1 domain of the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chain : a new anti-tumorigenic matrikine.
XIX^{ème} congrès annuel de la SFBMEc, Toulouse, 24-26 mars 2011

Sénéchal K, Thévenard J, Ramont L, Maquart FX, Brassart-Pasco S, Monboisse JC
Une nouvelle matrikine anti-tumorale: le domaine NC1 de la chaîne alpha 4 du collagène IV
Journée des Jeunes Chercheurs de l'IFR 53, Reims, 29 Avril 2010

Communications par voie d'affiche :

Senechal K, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Ramont L, Ricard-Blum S, Maquart FX, Monboisse JC
Tetrastatin, the NC1 domain of the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chain : a new anti-tumorigenic matrikine.
XIX^{ème} congrès annuel de la SFBMEc, Toulouse, 24-26 mars 2011

Senechal K, Thevenard J, Ramont L, Mir L, Maquart FX, Brassart-Pasco S, Monboisse JC
A new anti-tumorigenic matrikine: the NC1 domain of the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chain
Symposium de l'IFR 53, Reims, du 07 au 09 Juin 2010

Senechal K, Thevenard J, Ramont L, Mir L, Maquart FX, Brassart-Pasco S, Monboisse JC
A new anti-tumorigenic matrikine: the NC1 domain of the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chain
3^{ème} Forum du Cancéropôle Grand Est, Strasbourg, du 19 au 20 Novembre 2009

Senechal K, Thevenard J, Di Stefano L, Mir L, Maquart FX, Brassart-Pasco S, Monboisse JC
A new anti-tumorigenic matrikine: the NC1 domain of the $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chain
Second Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies, Reims, 03-05 Juin 2009

Thevenard J, Brassart-Pasco S, Ramont L, Senechal K, Mir L, Maquart FX, Monboisse JC
Control of tumor progression by basement membrane collagen-derived matrikines
Oncotrans, Nancy, 19 et 20 Mars 2009

Thevenard J, Brassart-Pasco S, Ramont L, Senechal K, Mir L, Maquart FX, Monboisse JC
Control of tumor progression by basement membrane collagen-derived matrikines
Paul Basset Memorial Meeting. Early tumor invasion, Illkirch, 30 Janvier 2009

I - Introduction

I/ INTRODUCTION

I-1/ Le cancer

I-1-1/ Généralités

Dans le monde occidental, les avancées de la médecine moderne permettent une espérance de vie de plus en plus grande. Cependant, avec une population vieillissante, l'apparition de cancers est de plus en plus fréquente. Pour comprendre pourquoi, il faut revenir à la définition même du cancer.

Le cancer est une maladie due à une multiplication anarchique et incontrôlée d'une cellule devenue anormale. Avec le temps, entre autres facteurs, les systèmes de réparation de l'ADN ainsi que les points de contrôle permettant une régulation de la croissance cellulaire peuvent être altérés. A l'origine, si une cellule devient anormale, les points de contrôle et les systèmes de réparation prennent en charge cette cellule pour rétablir son intégrité et si cela est impossible, la cellule exécute son programme de mort cellulaire, appelé également apoptose. Lorsque la cellule échappe aux systèmes de contrôle et de régulation et que l'apoptose de la cellule n'est pas déclenchée, elle est alors qualifiée de cellule tumorale. C'est cette cellule qui, en se développant de façon indéfinie et anarchique au sein d'un tissu, conduit à la formation d'un amas de cellules anormales ou tumeur.

Lorsque la tumeur atteint la taille critique de 1 cm³, l'oxygène et les nutriments nécessaires à la survie des cellules n'accèdent plus au cœur de la tumeur. Les cellules tumorales sécrètent alors des facteurs pro-angiogéniques conduisant au « switch » angiogénique et l'angiogenèse tumorale se développe. Ce processus permet la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants pour alimenter la tumeur en nutriments et oxygène. Ce processus finement régulé résulte d'un déséquilibre entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Lors de l'angiogenèse, la matrice extracellulaire subit un remaniement. Elle est tout d'abord soumise à une dégradation par différents systèmes protéolytiques pour permettre la migration, vers la tumeur, des cellules endothéliales formant la paroi des vaisseaux. Une fois la matrice extracellulaire fragilisée, les cellules tumorales vont pouvoir migrer et passer dans la circulation sanguine (intravasation) pour se déposer dans d'autres tissus (extravasation) où elles vont se multiplier pour donner naissance à d'autres tumeurs appelées métastases : c'est le processus de dissémination métastatique. Parallèlement à la néoangiogenèse tumorale, la lymphangiogenèse, définie comme la formation de vaisseaux lymphatiques à partir de vaisseaux lymphatiques pré-existants, est également fortement impliquée dans la dissémination métastatique, en particulier dans le cas des mélanomes. La dissémination métastatique est une étape importante dans l'invasion tumorale puisque le pronostic

vital du patient est fortement compromis lors de l'apparition de métastases, notamment lors de l'invasion de cellules tumorales au niveau des ganglions lymphatiques.

Lors du remaniement de la matrice extracellulaire, les cascades protéolytiques libèrent des fragments des molécules composant la matrice extracellulaire qui peuvent avoir des activités biologiques : les matrikines. Diverses matrikines dérivent du composant majeur des membranes basales, le collagène de type IV. Celui-ci est composé de 3 chaînes α parmi 6 possibles ($\alpha 1$ à $\alpha 6$). Chaque chaîne α possède une région N-terminale comportant un domaine 7S, un long domaine collagénique et un domaine C-terminal non collagénique NC1. De nombreuses matrikines dérivent du domaine NC1 de diverses chaînes α mais aucune activité n'a encore été démontrée pour le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4$ du collagène IV.

I-1-2/ Le mélanome

Le mélanome est un cancer malin dérivant des mélanocytes, cellules pigmentaires de la peau. Il s'agit du cancer cutané possédant le plus fort pouvoir invasif. Différents facteurs de risques sont connus, notamment une exposition intensive aux UV. Véritable phénomène de mode, la surexposition solaire pour avoir un teint hâlé contribue au développement de nombreux mélanomes. L'incidence de ce cancer a significativement augmenté ces dernières années ce qui en fait un problème de santé publique non négligeable.

I-1-2-1/ La peau

La peau est un organe ayant de nombreuses fonctions, la principale étant d'assurer un rôle de barrière protectrice contre la plupart des agressions extérieures. Recouvrant entièrement le corps, cet organe souple du fait de son élasticité constitue une barrière physique contre les infections, limite les pertes en eau de l'organisme et protège les tissus des rayons solaires, en particulier des UV, grâce à la sécrétion de mélanine par les mélanocytes. La peau joue également un rôle dans la thermorégulation de l'organisme avec la production de sueur. Les nombreux récepteurs sensoriels présents dans la peau en font un organe de perception particulier capable de percevoir des stimuli aussi divers que température, pression et douleur.

D'un point de vue histologique, la peau est constituée de la superposition de quatre couches distinctes énumérées de la plus externe à la plus profonde :

- L'épiderme, recouvert d'une flore cutanée en contact direct avec l'environnement externe
- La lame basale, appelée jonction dermo-épidermique, permettant d'arrimer solidement l'épiderme au derme
- Le derme, tissu riche en fibres assurant le soutien et l'élasticité de la peau
- L'hypoderme, tissu conjonctif lâche contenant plus ou moins de tissu adipeux.

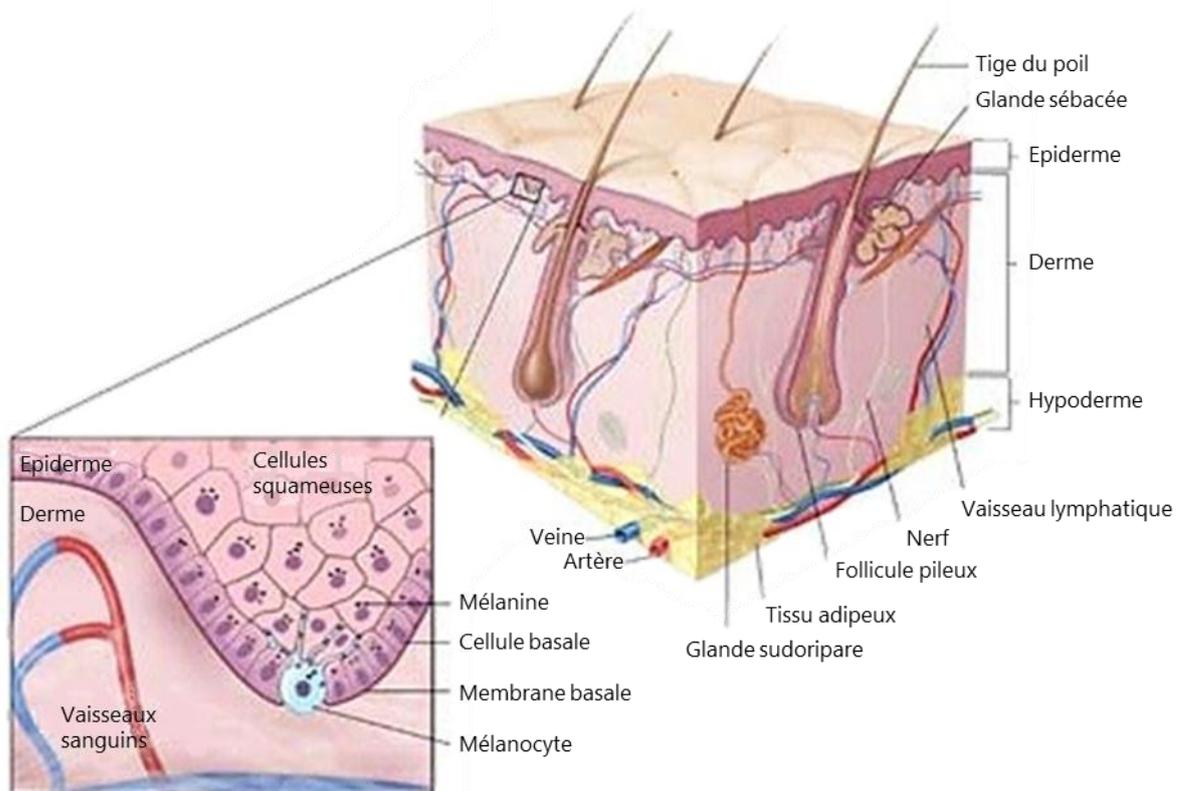


Figure 1 : Structure de la peau

(D'après <http://www.cancer.umn.edu/cancerinfo/NCI/Media/CDR0000579033.jpg>)

Différents types cellulaires sont retrouvés dans la peau dont les kératinocytes, les fibroblastes, qui participent à la sécrétion de macromolécules de la matrice extracellulaire, et les mélanocytes. Les mélanocytes sont des cellules pigmentaires dérivant de la crête neurale et que l'on retrouve à l'âge adulte au niveau de la peau mais également au niveau de la rétine ou encore du tractus intestinal. Le mélanome résulte de la transformation puis du développement anarchique et non régulé d'un mélanocyte. En raison d'une photo-exposition plus importante, la majorité des mélanomes se

développent à partir de la peau mais le mélanome peut se développer à partir d'autres organes comportant des mélanocytes.

I-1-2-2/ Epidémiologie

En France, le mélanome, de par sa fréquence en constante augmentation et son caractère très agressif, est un problème de santé publique non négligeable surtout en cas de prise en charge tardive.

Le mélanome survient chez des personnes de tous âges même si l'apparition de ce type de cancer chez les moins de 25 ans reste occasionnelle. L'âge médian d'apparition de ce cancer est de 67 ans pour les hommes et 72 ans pour les femmes en France avec un âge moyen de 69 ans.

En 2008, 67 431 cas de mélanome ont été recensés en Europe soit 11,3/100 000 habitants dont 7 532 en France ce qui représente 10,4/100 000 habitants. Entre 1978 et 2000, le taux annuel moyen d'évolution de l'incidence était de + 5,13%. En 20 ans, entre 1980 et 2000, l'incidence du mélanome a plus que triplé.

Chaque année sur la période 2003-2007, le taux de mortalité de la population mondiale pour ce cancer était de 1,3/100 000 personnes. En France, avec 2,1/100 000 personnes, ce taux se rapproche du taux européen 1,9/100 000 personnes. Depuis les années 1980, en France, le nombre de décès dus à un mélanome est en constante augmentation. Ce nombre a doublé chez les hommes, passant de 386 décès par an pour la période 1983-1987 à 798 pour la période 2003-2007, et a augmenté d'un facteur 1,5 chez les femmes, passant de 410 à 688 [Institut de Veille Sanitaire ; Observatoire Européen du Cancer].

I-1-2-3/ Facteurs de risque

Le principal facteur de risque environnemental est une exposition intense au soleil. En effet, une exposition excessive aux UV avec apparition de « coup de soleil » de façon intermittente augmente le risque de développer un mélanome. Il existe différents types d'UV : les UVC, stoppés par l'ozone et l'oxygène de l'atmosphère, les UVB, qui provoquent des lésions cellulaires notamment au niveau de l'ADN, et les UVA, généralement décrits comme étant moins carcinogènes que les UVB ; ils pénètrent cependant plus profondément dans la peau. Pour prévenir les dommages liés aux UV, les mélanocytes synthétisent un pigment, la mélanine, capable d'absorber ces rayons et responsable de la couleur de peau [von Thaler et coll., 2009].

Le phototype d'un individu est également un facteur non négligeable dans le risque d'apparition de mélanome. Cette caractéristique est déterminée par la sensibilité de la peau d'un

individu face à une exposition au soleil. Il existe 6 phototypes regroupant divers critères tels que la couleur de peau, des cheveux ou des yeux mais surtout la capacité à bronzer d'un individu. Les phototypes I et II, individus à peau claire et ne bronzant pas ou peu, ont ainsi un risque plus élevé de développer un mélanome. Les populations à peau noire ont un risque moindre de développer ce cancer [Miller et Tsao, 2009].

Les naevi dysplasiques et congénitaux sont également considérés comme un facteur de risque important dans l'apparition du mélanome. En effet, différentes études ont montré qu'un nombre plus élevé de naevi dysplasiques augmente de 2 à 12 fois le risque de développer un mélanome. Le naevus dysplasique est une lésion pigmentée acquise se différenciant par des caractéristiques cliniques et histologiques d'un naevus classique, appelé plus communément « grain de beauté ». Différents critères tels que leur nombre, leur taille ainsi que leur aspect général peuvent constituer des facteurs de risques. Même si la plupart des naevi sont bénins et n'évolueront pas en mélanome, il est important de les surveiller au cours du temps afin d'identifier tout changement [Friedman et coll., 2009].

Bien qu'identifiés, ces facteurs de risques ont toutefois souvent été soumis à controverse. L'apparition du mélanome résulte plus vraisemblablement de la combinaison de ces différents facteurs ajoutée à une prédisposition génétique.

Comme dans la plupart des cancers, le terrain génétique prédispose plus ou moins l'individu à développer un mélanome. Parmi les gènes susceptibles d'être touchés, on retrouve ceux codant les kinases des voies MAPK avec la mutation de BRAF retrouvée dans 66% des mélanomes et la voie PI3K avec activation constitutive de la protéine Akt dans 60% des mélanomes [Takata et Saida, 2006 ; Kuphal et Bosserhoff, 2009].

I-1-2-4/ Diagnostic et traitements

Le diagnostic du mélanome se fait avant tout par observation morphologique d'une lésion pigmentée. Elle repose sur 5 critères ABCDE :

- A : la lésion est asymétrique
- B : elle présente des bords irréguliers
- C : la couleur est non homogène avec des zones dépigmentées
- D : le diamètre de la lésion est généralement supérieur à 6 mm
- E : la lésion évolue et s'étend au cours du temps

Si la lésion est suspectée d'être un mélanome, elle est excisée afin de subir un examen histologique. Ce dépistage précoce permet une prise en charge généralement pendant la phase de croissance horizontale du mélanome avant que la tumeur atteigne un stade trop avancé. En effet, l'évolution du mélanome se fait en 2 temps avec une première phase de croissance horizontale puis une seconde phase de progression en profondeur menant à la dissémination métastatique.

L'étude histologique se fait selon l'indice de Breslow et permet d'affirmer la nature et la malignité de la tumeur. Il repose sur l'épaisseur de la tumeur en mm :

- $\leq 0,75$ mm
- 0,76 à 1,50 mm
- 1,51 à 4 mm
- > 4 mm

Le niveau de Clark permet de mesurer le degré d'invasivité de la tumeur en se basant sur le franchissement de barrières anatomiques :

- Clark I : mélanome malin strictement intra-épidermique
- Clark II : invasion du derme papillaire
- Clark III : invasion de la jonction réticulo-papillaire du derme
- Clark IV : invasion du derme réticulaire
- Clark V : invasion de l'hypoderme

Cette analyse histologique permet d'établir un pronostic de survie. En effet, plus le niveau de Clark et l'indice de Breslow sont élevés, plus le pronostic de survie est mauvais.

Le bilan de ces études permet de classer le mélanome selon trois stades cliniques à but pronostique :

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

Les traitements envisagés sont fonction du stade clinique. Au stade I, il s'agit d'un traitement chirurgical avec exérèse large de la lésion. La marge chirurgicale est dépendante de l'indice de Breslow. Pour un indice de Breslow inférieur à 0,75 mm, le taux de survie à 5 ans est d'environ 95 %. Au stade II, le traitement est également chirurgical mais un curage ganglionnaire régional complet en parallèle s'avère nécessaire. L'efficacité en terme de survie des traitements adjuvants

locaux tels que l'interféron- α reste controversée mais ils semblent être nécessaires. Au stade III, la prise en charge se fait essentiellement par la chimiothérapie cytostatique avec parfois exérèse de métastases. Toutefois les réponses à la chimiothérapie sont généralement de courte durée et la survie de ces patients est faible (environ 6 mois).

Les traitements étant peu efficaces, il convient donc d'avoir une attitude préventive avec une exposition au soleil raisonnable et une protection UV adéquate. Les stades précoces de développement du mélanome étant traitables chirurgicalement dans la majorité des cas, une surveillance des lésions pigmentées chez les personnes à risque est souhaitable avant que le mélanome atteigne un stade plus invasif.

I-1-3/ La progression tumorale

I-1-3-1/ Dérégulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus physiologique qui permet le renouvellement des cellules composant un tissu et regroupe l'ensemble des phases par lesquelles passe une cellule pour mener à terme sa division en deux cellules filles avec maintien de l'information génétique. Dans le cas du développement tumoral, une cellule transformée se divise de façon anarchique. Pour comprendre ce phénomène, il est nécessaire de s'attarder sur le cycle cellulaire.

I-1-3-1-1/ Les différentes phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire peut être divisé en 4 phases : G1, S, G2 et M. Une autre phase ne faisant pas réellement partie du cycle cellulaire peut également être définie : la phase G0.

La phase G0 correspond à une phase de quiescence de la cellule. La cellule ne se divise pas et ne se prépare pas à la division cellulaire. Elle assure simplement ses fonctions au sein d'un tissu par une production de protéines spécifiques.

La phase G1 est la première phase du cycle cellulaire. Lorsqu'une cellule entre en phase G1, elle se prépare à la division. Son volume augmente et elle synthétise les composants nécessaires à la réplication de l'ADN. La phase G1 est la phase la plus longue et la plus variable du cycle cellulaire. Il existe des points de contrôle au niveau de cette phase permettant ou non à la cellule d'entrer en phase S [Krude, 2006].

La phase S est la phase de réplication de l'ADN. Durant cette phase, l'ADN est répliqué de façon semi-conservative : en d'autres termes, un des deux brins d'ADN sert de matrice à l'ADN polymérase qui synthétise un second brin par complémentarité des bases azotées. Chacune des molécules filles est formée d'un brin parental et d'un brin néosynthétisé. Certaines protéines synthétisées en phase G1 vont s'associer au niveau des origines de réplication pour former des complexes pré-réplicatifs selon un ordre précis. Ces complexes seront inactivés pour éviter qu'une même région ne soit répliquée plusieurs fois au cours du même cycle [Foiani et Luccini, 1997].

Après la phase S, débute la phase G2. Il s'agit d'une phase de préparation à la mitose où les composants nécessaires à cette prochaine phase sont synthétisés. Comme pour la phase G1, il existe des points de contrôle pour vérifier que l'ADN n'est pas endommagé et est correctement répliqué afin de permettre l'entrée en phase de mitose.

La mitose peut être séparée en plusieurs phases : la prophase, la prémétaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. Lors de la prophase, il y a condensation des chromosomes et disparition progressive du nucléole. Le fuseau mitotique commence à se mettre en place avec la migration des centrosomes de part et d'autre du noyau. En prémétaphase, la condensation des chromosomes s'accroît, il y a rupture de l'enveloppe nucléaire et les chromosomes se regroupent au niveau du plan équatorial de la cellule. Lors de la métaphase, les chromosomes sont condensés au maximum et se trouvent sur le plan équatorial. L'anaphase correspond à la séparation des chromatides de part et d'autre de la cellule. Enfin, la télophase permet l'individualisation des noyaux fils avec reformation de l'enveloppe nucléaire et décondensation des chromosomes. La cytokinèse permet finalement de séparer les deux cellules filles grâce à un anneau contractile formé d'actine et de myosine. Les cellules retournent ensuite en phase G1.

I-1-3-1-2/ Principaux acteurs du cycle cellulaire

La progression dans le cycle cellulaire se fait essentiellement grâce à l'association d'un complexe protéique cycline-cdk (cyclin-dépendant kinase) spécifique de chaque phase du cycle. Les protéines cdk possèdent l'activité catalytique du complexe alors que les cyclines représentent l'activité régulatrice. Les cdk possèdent un site catalytique constitué par deux poches juxtaposées où se lie d'une part le substrat et d'autre part l'ATP. Ce site est bloqué à l'état inactif par deux boucles, la boucle PSTAIRE et la boucle T. La boucle PSTAIRE subit un changement conformationnel lors de l'association d'une cdk avec une cycline. Ce phénomène conduit à une meilleure orientation du triphosphate dans la poche ATP permettant ainsi la phosphorylation des

protéines impliquées dans les différentes phases du cycle cellulaire. En parallèle, une modification de conformation touche la boucle T dévoilant ainsi certains résidus d'acides aminés (Thréonine 161, Thréonine 14 et Tyrosine 15) soumis à une régulation par d'autres kinases telles que CAK (Cdk-Activated Kinase) et des phosphatases comme cdc25. Ces complexes cyclines-cdk sont finement régulés par des kinases et phosphatases.

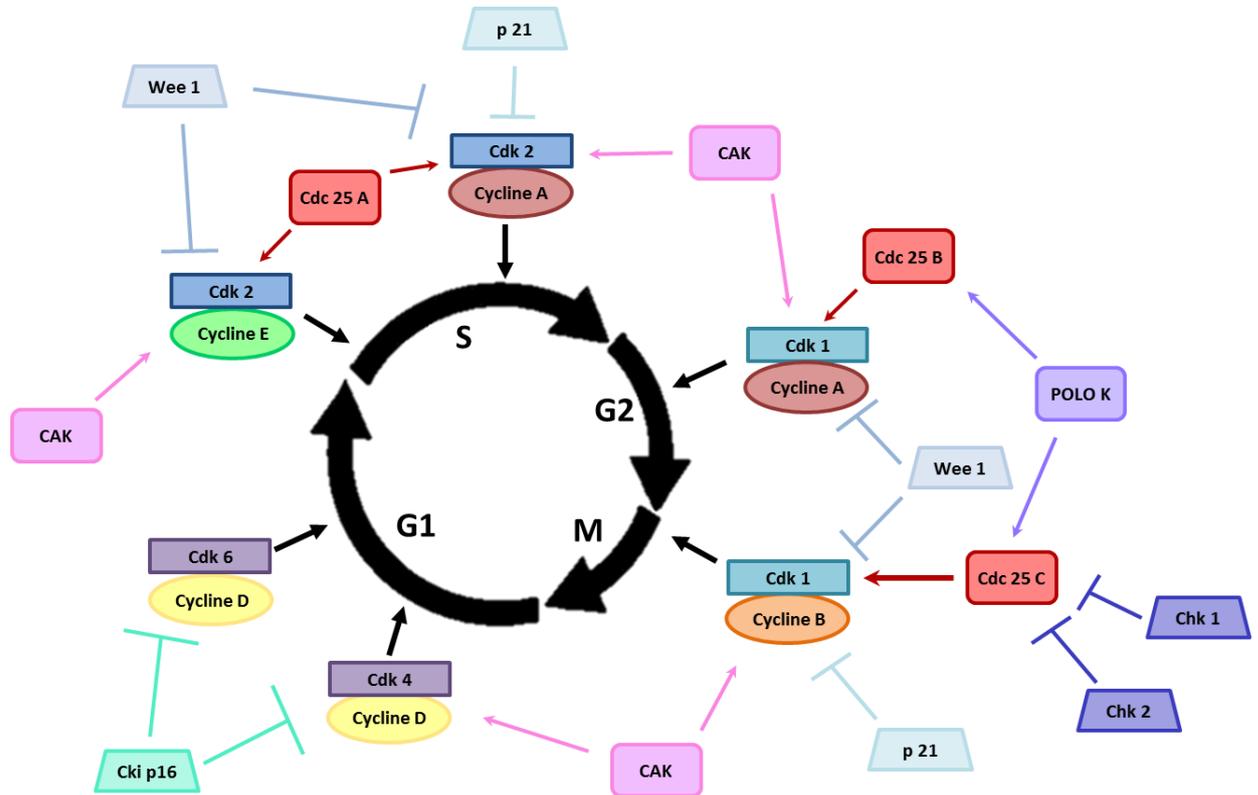


Figure 2 : Régulation du cycle cellulaire

I-1-3-1-2-a/ Transition G1/S

Sous l'action de facteurs de croissance, une cellule en G0 déclenche des cascades de signalisation de type MAPK stimulant la transcription des gènes de la cycline D et des cdk 4 et 6. Il y a formation du complexe cycline D-cdk 4 suivie de la formation du complexe cycline D-cdk 6 qui permet la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire. Ces deux complexes peuvent être inhibés par la protéine CKi p16 qui, en se liant à cdk 4 ou cdk 6, empêche la liaison de ces protéines à la cycline D. Le complexe cycline D-cdk 4 actif phosphoryle la protéine Rb qui se trouve initialement sous forme peu phosphorylée liée à E2F. Cette phosphorylation mène à un changement conformationnel de Rb qui libère ainsi E2F. Le facteur de transcription E2F induit l'expression de la

cycline E en fin de phase G1 ainsi que de cdk 2. Le complexe cycline E-cdk2 hyperphosphoryle Rb (4 sites de phosphorylation) induisant l'expression de la cycline A. Le complexe cycline A-cdk 2, inhibé par p27, p21 ou encore p57, joue un rôle dans l'activation de certains facteurs permettant la réplication de l'ADN d'où sa nécessité pour la progression dans la phase S du cycle cellulaire. Les inhibiteurs de ce complexe doivent être dégradés pour que puisse commencer la réplication de l'ADN en phase S. Les complexes cycline E-cdk2 et cycline A-cdk 2 sont activés par cdc 25 A qui, en déphosphorylant la thréonine 14 et la tyrosine 15, permettent l'accès de la poche ATP et donc l'activation de ces complexes [Cam et Dynlacht, 2003 ; Abukhdeir et Park, 2009].

Il existe un point de contrôle durant cette phase qui permet un arrêt du cycle en cas de lésions de l'ADN et ce *via* deux voies : une voie lente avec activation de p53 et une voie rapide avec inactivation de cdc 25 A. Lors de cette dernière, l'inactivation de cdc 25 A empêche la déphosphorylation activatrice de cdk 2 et les cellules sont bloquées en phase G1/S. Lors de la voie lente, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangiectasia-Related), phosphorylent p53 ce qui inhibe sa polyubiquitinylation par Mdm 2. La protéine p53 étant plus stable, elle induit la transcription de gènes tels que celui codant p21 qui inhibe les complexes cycline-cdk bloquant ainsi les cellules dans le cycle cellulaire [Bucher et Britten, 2008].

I-1-3-1-2-b/ Transition G2/M

Au début de la phase G2, le complexe cycline A-cdk1 se forme pour laisser place ensuite au complexe cycline B-cdk1. La protéine Wee-1 phosphoryle alors la tyrosine 15 de cdk 1 et ainsi inhibe l'entrée en mitose. Puis la kinase CAK phosphoryle cette fois la thréonine 161, étape indispensable pour l'entrée en mitose. Enfin, la phosphatase cdc 25 B ou C induit la déphosphorylation de la tyrosine 15 permettant ainsi l'entrée en mitose de la cellule. Les phosphatases cdc 25 B et C sont activées par une phosphorylation réalisée par une autre kinase, POLO K [Martin et Strebhardt, 2006].

Les points de contrôle existant durant cette phase sont également indispensables. Comme pour la transition G1/S, il y a un point de contrôle de lésions de l'ADN où p21 est capable d'inhiber le complexe cycline-cdk mitotique. Il existe également un point de contrôle de l'ADN non répliqué. Dans ce cas, ATR se fixe au niveau des fourches de réplication et restera active tant que les fourches de réplication subsisteront. Ceci induit une phosphorylation qui active Chk 1 et Chk 2. Ces deux kinases inhibent cdc 25 C ce qui bloque l'activation du complexe. Le complexe étant inactif, les cellules n'entrent pas en mitose [Downs, 2010].

Lorsque les cellules sont bloquées dans une phase du cycle cellulaire, deux solutions existent : soit le problème à l'origine de l'arrêt est résolu, et dans ce cas, la cellule entre de nouveau dans le cycle cellulaire, soit le problème est trop important et ne peut être résolu et dans ce second cas, la cellule induit son programme de mort cellulaire : l'apoptose. Dans le cas du développement tumoral, certaines protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ne jouent plus leur rôle. La cellule se divise indéfiniment et de façon anarchique sans être capable d'induire son apoptose jusqu'à former une tumeur. Pour leur développement au sein du tissu, ces cellules vont devoir synthétiser des protéases permettant de remanier la matrice extracellulaire.

I-1-3-2/ La protéolyse matricielle

La protéolyse matricielle est un processus physiologique nécessaire par exemple lors de la réparation tissulaire. Elle intervient également lors de processus pathologiques tels que l'invasion et l'angiogenèse tumorale. Les protéases libèrent, par protéolyse limitée, des facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire ainsi que des fragments de macromolécules la constituant et pouvant exercer une activité biologique, appelés matrikines.

Deux principaux systèmes protéolytiques sont responsables du remaniement de la matrice extracellulaire : le système plasminogène-plasmine et les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Il s'agit de systèmes enzymatiques agissant sous forme de cascades protéolytiques pouvant être régulées par des inhibiteurs.

I-1-3-2-1/ Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs, les TIMPs

I-1-3-2-1-a/ Les métalloprotéases matricielles (MMPs)

Les métalloprotéases matricielles sont des endopeptidases zinc-dépendantes capables de dégrader au moins un composant de la matrice extracellulaire. Plusieurs domaines protéiques constituent ces protéases.

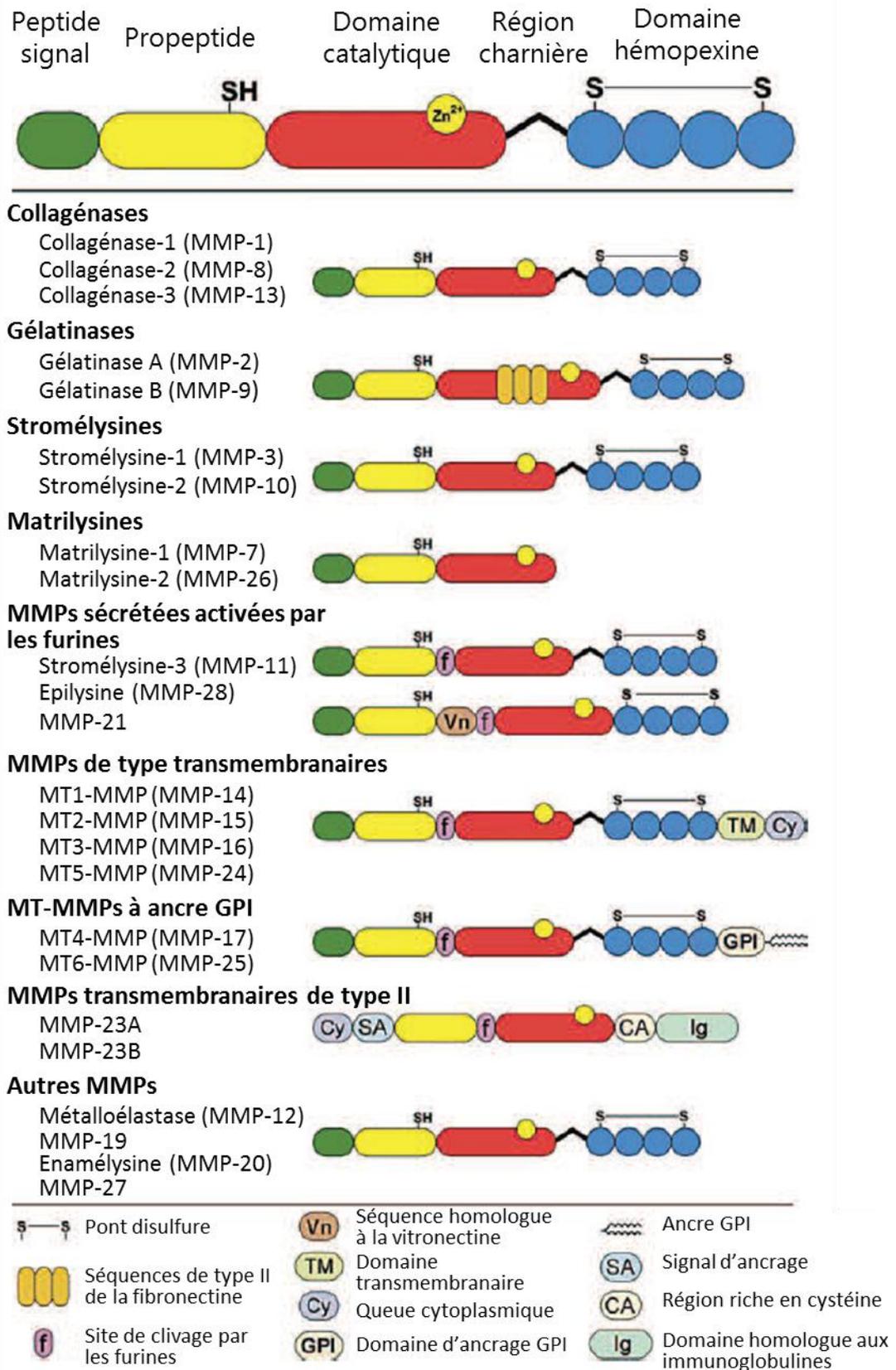


Figure 3 : Structure des MMPs

(D'après Ala-Aho et Kähäri 2005)

Les métalloprotéases sont sécrétées dans l'espace extracellulaire sous forme de zymogènes inactifs et sont activées par protéolyse de leur prodomaine grâce à des sérine-protéases ou d'autres MMPs déjà activées. Leur domaine catalytique contient des résidus histidine nécessaires à la liaison de l'atome de zinc et donc à leur activité. Enfin, la plupart des MMPs possèdent un domaine hémapexine au niveau C-terminal. Il s'agit du domaine impliqué dans l'interaction des MMPs avec leurs inhibiteurs spécifiques les TIMPs et ce domaine est relié au domaine catalytique par une région charnière. D'autres domaines sont retrouvés dans certaines MMPs tels que le domaine transmembranaire, le domaine homologue aux séquences répétées de type II de la fibronectine ou encore le domaine de reconnaissance de la furine [Ala-Aho et Kähäri, 2005].

En fonction de leurs caractéristiques structurales et de leur spécificité de substrat, les MMPs peuvent être classées en 6 groupes différents [Visse et Nagase, 2003] :

- Les collagénases, représentées par les MMP-1, MMP-8 et MMP-13, dégradent les collagènes fibrillaires en fragments $\frac{3}{4}$ N-terminal et $\frac{1}{4}$ C-terminal.
- Les stromélysines, comprenant les MMP-3, MMP-10 et MMP-11, ont une structure proche de celle des collagénases et possèdent un large spectre protéolytique incluant de nombreux protéoglycannes, les laminines ou encore l'élastine.
- Les matrilysines, MMP-7 et MMP-26, sont les seules à ne pas posséder le domaine hémapexine et de ce fait sont les MMPs les plus simples structuralement. Elles sont essentiellement exprimées par les cellules tumorales d'origine épithéliale et présente une activité protéolytique très étendue.
- Les gélatinases, MMP-2 et MMP-9, sont capables de dégrader le collagène de type IV de membrane basale et possèdent une activité gélatinolytique. En d'autres termes, elles peuvent également dégrader le collagène dénaturé, la gélatine, auxquels elles se lient grâce à 3 motifs répétés de type II de la fibronectine présents au niveau de leur domaine catalytique.

- Les MMPs transmembranaires, MT1-MMP à MT6-MMP, interviennent dans la dégradation de composants matriciels et jouent également un rôle essentiel dans l'activation d'autres MMPs. Elles sont caractérisées par leur ancrage à la membrane plasmique qui peut se faire de deux façons :
 - o soit *via* un domaine transmembranaire hydrophobe présent dans le domaine hémopexine : MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16) et MT5-MMP (MMP-24)
 - o soit *via* un groupement GPI (Glycosyl Phosphatidylinositol) : MT4-MMP (MMP-17) et MT6-MMP (MMP-25)
- La dernière catégorie regroupe les autres MMPs comme par exemple la MMP-12.

I-1-3-2-1-b/ Les Inhibiteurs Tissulaires des MétalloProtéinases : les TIMPs

L'activité de ces différentes MMPs est régulée par des inhibiteurs spécifiques endogènes, les TIMPs (Tissue Inhibitors of Metallo-Proteinases) qui forment des complexes stoechiométriques avec les MMPs. En régulant cette activité, les TIMPs permettent de maintenir un équilibre dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Ils ont un rôle essentiel dans l'invasion et l'angiogenèse tumorales, phénomènes pendant lesquels l'équilibre est modifié. A ce jour, quatre TIMPs sont connus : TIMP-1 (28,5 kDa), TIMP-2 (21 kDa), TIMP-3 (22 kDa) et TIMP-4 (22,5 kDa).

Bien que chaque TIMP soit capable d'inhiber une large proportion de MMPs actives, des spécificités ont été décrites. Ainsi, le TIMP-1 inhibe préférentiellement la proMMP-9 ainsi que les MMP-1, MMP-2 et MMP-3 alors que sa capacité à inhiber la MMP-19 et les MMPs transmembranaires (MMP-14, MMP-15, MMP-16 et MMP-24) est faible. Le TIMP-2 possède une grande affinité pour la proMMP-2 et est capable d'inhiber toutes les MMPs, en particulier les MMP-2, MMP-13 et MMP-7. Les TIMP-3 et TIMP-4 sont capables d'inhiber également toutes les MMPs et notamment les MMPs transmembranaires. Le TIMP-4, de par sa similarité avec le TIMP-2, est capable de se lier à la proMMP-2 et empêchant ainsi son activation par la MMP-14 [Brew et coll., 2000 ; Baker et coll., 2002].

I-1-3-2-1-c/ TIMPs et activation des MMPs

Le TIMP-2 a un rôle particulier dans la régulation de la MMP-2 puisqu'il inhibe cette MMP mais permet également son activation. La MMP-14, activée préalablement par une furine convertase,

se lie au TIMP-2. Celui-ci interagit ensuite via son domaine C-terminal avec le domaine hémopexine de la proMMP-2, formant ainsi un complexe ternaire. Pour activer la MMP-2, une seconde MMP-14 se lie au complexe ternaire et clive le prodomaine. L'activation de la MMP-2 est donc dépendante à la fois de la disponibilité de la MMP-14 mais également du TIMP-2. Ainsi, un excès de TIMP-2 inhibe la seconde MMP-14 et de ce fait inhibe l'activation de MMP-2, tout comme un déficit en TIMP-2 qui empêche la formation du complexe activateur [Visse et Nagase, 2003].

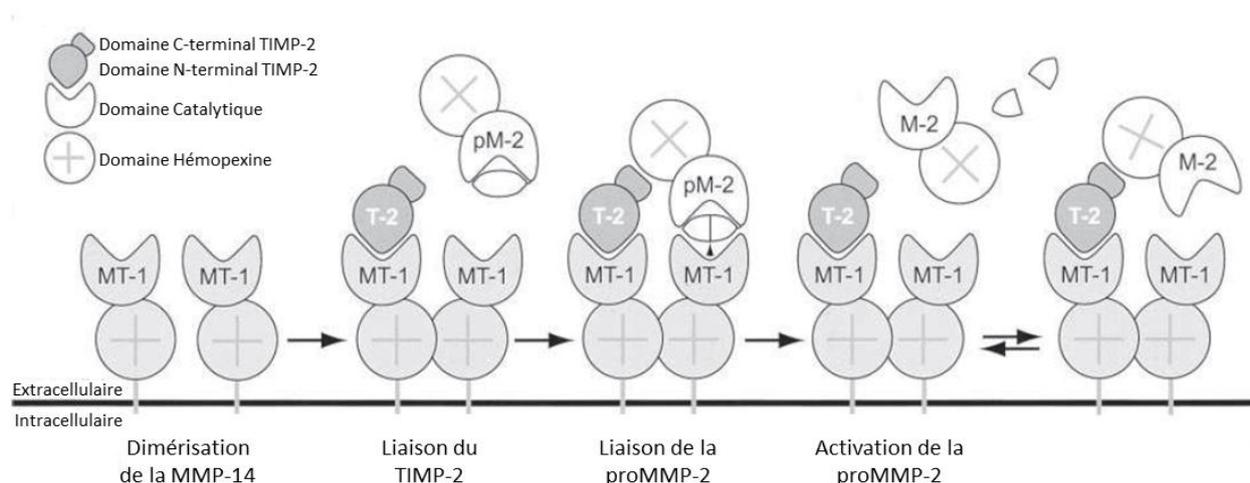


Figure 4 : Mécanisme d'activation de la MMP-2

(D'après Visse et Nagase, 2003)

I-1-3-2-1-d/ MMPs et mélanome

Dans le cas du mélanome humain, la MMP-2 est essentiellement présente dans les cellules très invasives alors que la MMP-9 est principalement retrouvée avant le passage de la tumeur en phase de croissance verticale, dans les cellules de mélanome en phase de croissance horizontale [MacDougall et coll., 1995 ; Kurschat et coll., 1999].

D'autres MMPs interviennent également dans la progression du mélanome. Par exemple, la MMP-1 est sécrétée par les fibroblastes proches des cellules tumorales à partir des stades III et IV de Clark. Il semble également que les MMP-3, MMP-15 et MMP-16 ont un rôle important dans l'invasion puisqu'elles sont retrouvées au niveau des mélanomes métastatiques [Hofmann et coll., 2000].

I-1-3-2-1-e/ Rôle de la MMP-14 dans la progression tumorale

La MMP-14 est localisée au niveau du front de migration de la tumeur tout comme la MMP-2 active. Cette protéase joue un rôle important dans la progression tumorale *via* différents modes d'action. Cette métalloprotéinase est capable de dégrader de nombreuses macromolécules de la matrice extracellulaire telles que les collagènes de type I, II et III mais également les laminine-111 et laminine-332, la fibronectine, la vitronectine, la fibrine et l'aggrécane. En activant d'autres MMPs, telles que les MMP-2 et MMP-13, la MMP-14 permet une amplification de la dégradation matricielle [Itoh, 2006]. Ainsi, par son interaction avec d'autres MMPs ou avec des intégrines, la MMP-14 permet la dégradation des collagènes de type I et de type IV et ainsi promeut l'invasion cellulaire [Seiki et coll., 2003]. La dégradation de macromolécules matricielles permet la libération de domaines ayant une activité biologique comme le domaine III des domaines « EGF-like » de la chaîne $\gamma 2$ de la laminine-332 [Itoh, 2006].

La MMP-14 possède également une activité « sheddase » (de relargage). Elle est en effet capable de cliver le récepteur du hyaluronane CD44 et permet ainsi le relargage de son ectodomaine, favorisant la migration cellulaire [Osenkowski et coll., 2004].

L'activité de la MMP-14 peut être régulée par les TIMPs, à l'exception du TIMP-1, et notamment par le TIMP-3. Par ailleurs, cette protéase peut être internalisée par endocytose soit par des vésicules recouvertes de clathrine, soit par des caveolae au niveau de radeaux lipidiques [Osenkowski et coll., 2004]. L'endocytose par les vésicules de clathrine est dépendante de la palmitoylation du résidu cystéine 574, ainsi l'activité de la MMP-14 peut être régulée par cette palmitoylation. L'endocytose dépendante des caveolae joue un rôle important dans la régulation de la MMP-14 et, de ce fait, dans la progression tumorale. En effet, après internalisation, la MMP-14 peut être soit acheminée jusqu'aux lysosomes où elle sera dégradée, soit recyclée à la membrane. Ce mécanisme est donc un autre moyen de réguler la disponibilité de la MMP-14 au niveau du front de migration et ainsi de réguler la progression tumorale [Itoh, 2006].

I-1-3-2-2 / Le système plasminogène-plasmine

Le système plasminogène-plasmine est l'autre système protéolytique majeur de la matrice extracellulaire. Il est composé également de cascades protéolytiques faisant intervenir activateurs et inhibiteurs.

Le plasminogène est la forme zymogène de la plasmine. Il s'agit d'une glycoprotéine présentant des domaines Kringle, produite essentiellement par les cellules hépatiques, et constituée de 791 acides aminés pour une masse moléculaire de 92 kDa. Pour son activation en plasmine, 2 clivages sont nécessaires. Le premier est réalisé entre l'arginine 561 et la valine 562 par les activateurs du plasminogène de type tissulaire (tPA) ou urokinase (uPA). Le second clivage se fait par autolyse entre les lysines 77 et 78 pour donner la plasmine active [Andreasen et coll., 1997].

La plasmine est une sérine-protéase jouant un rôle important dans la protéolyse matricielle. Elle est en effet capable de dégrader de nombreux substrats matriciels tels que la fibronectine, la vitronectine ou encore les collagènes. En activant directement de nombreuses MMPs, comme les proMMP-1, proMMP-2 et proMMP-9, elle accentue d'autant plus son rôle dans la protéolyse matricielle.

Ce système est régulé sur plusieurs niveaux. Comme décrit précédemment, le premier niveau dépend de la disponibilité des activateurs tPA ou uPA. L'activation du plasminogène en plasmine se fait au niveau péricellulaire. L'urokinase est liée à son récepteur uPAR sous forme inactive pro-uPA. La plasmine permet son activation. Le plasminogène se lie à la surface cellulaire grâce à ses domaines Kringle. L'urokinase, à proximité, active alors le plasminogène. D'autre part, ce système est régulé par des inhibiteurs soit de l'activation, PAI-1 et PAI-2 inhibant tPA et uPA, soit directement de la plasmine, l' α 2-anti-plasmine. D'autres inhibiteurs comme la protéase nexine ont également été identifiés [Vassali et coll, 1991].

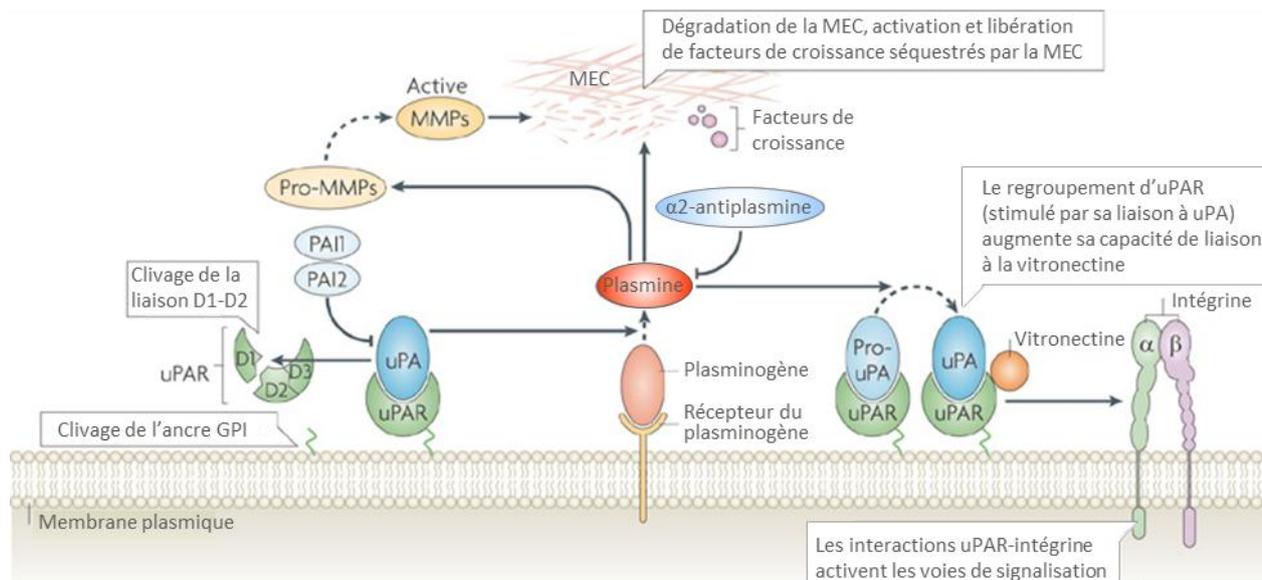


Figure 5 : Le système plasminogène-plasmine

(D'après Smith et Marshall, 2010)

Dans le cas du mélanome, tPA est retrouvé essentiellement durant les phases précoces de la progression tumorale alors qu'uPA intervient lors de la dissémination métastatique [De Vries et coll., 1996].

I-1-3-2-3/ Les adamalysines ADAMs et ADAMTSs

Les ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) et ADAMTSs sont des métalloprotéinases dépendantes du zinc formant, avec les métalloprotéinases de venin de serpent, la famille des adamalysines. A ce jour, 21 membres de la famille ADAMs ont été identifiés chez l'Homme. Ce sont des protéines complexes constituées de multiples domaines [Murphy, 2008 ; Duffy et coll., 2009].

Ces métalloprotéinases partagent une structure commune avec la présence, de la partie N-terminale vers la partie C-terminale, d'un propeptide, d'un domaine métalloprotéinase, d'un domaine desintégrine, d'une région riche en cystéines, d'un domaine EGF-like, d'une séquence transmembranaire, et d'un domaine intracytoplasmique. Les ADAMTSs possèdent également un domaine thrombospondine, absent chez les ADAMs. Elles peuvent être ancrées à la membrane ou sécrétées et sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs. Leur activation se fait après clivage du propeptide soit par une convertase de type furine, soit par autocatalyse. Seule la moitié des

membres de la famille ADAMs ont un potentiel protéolytique grâce à la séquence consensus HEXXHXXGXXHD retrouvée dans leur domaine métalloprotéinase [Keller et coll., 2009 ; Murphy, 2008].

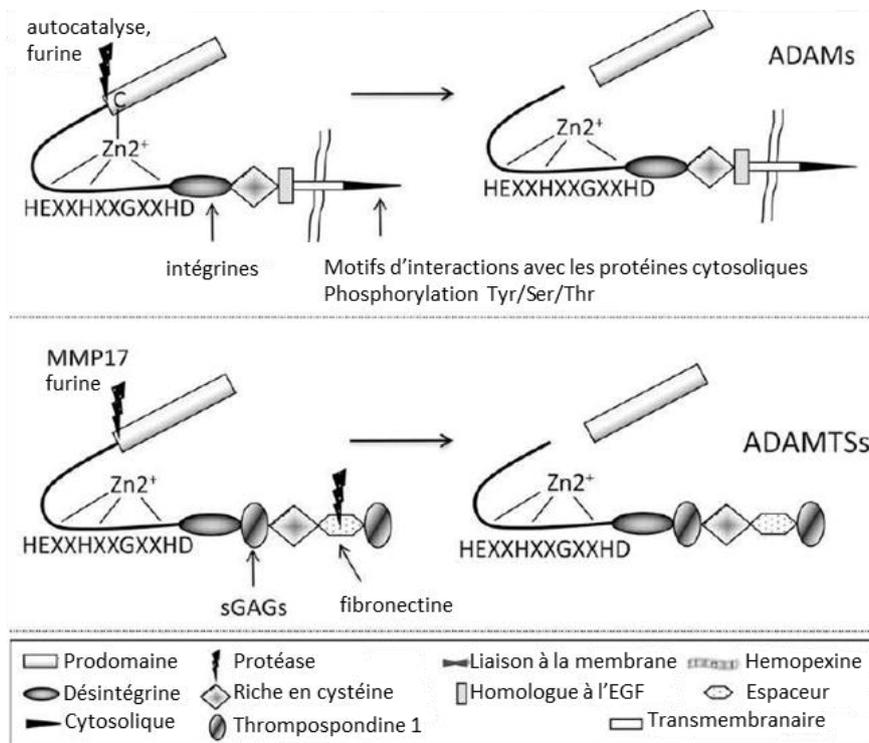


Figure 6 : Activation des ADAMs et ADAM-TSs

(D'après Keller et coll., 2009)

Les ADAMs ont de nombreux substrats, notamment des protéoglycannes, mais leur substrat privilégié est l'ectodomaine de protéines transmembranaires. Le domaine desintégrine, d'environ 90 résidus et commun à toutes les ADAMs, joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et en particulier dans la liaison des ADAMs aux intégrines, qui se fait généralement de façon indépendante de la séquence RGD. Une intégrine peut ainsi se lier à de multiples ADAMs et une ADAM peut se lier à plusieurs intégrines. La région riche en cystéine est également impliquée dans l'adhésion cellulaire avec notamment un rôle dans la reconnaissance du substrat [Duffy et coll., 2009].

Les ADAMs interagissent avec de nombreux acteurs et exercent ainsi divers effets biologiques *via* différents mécanismes d'action. Les ADAMs sont capables de cliver des protéines transmembranaires par leur activité « shedding » (ou de relargage) et notamment des facteurs de croissance, des cytokines, des récepteurs et des molécules d'adhésion. Une fois libérés, ces facteurs

régulent de nombreuses activités biologiques au sein du micro-environnement tumoral telles que l'inflammation, l'angiogenèse, la prolifération et la migration cellulaire.

La protéolyse intramembranaire régulée (« Regulated Intramembrane Proteolysis » ou RIP) est un autre mécanisme d'action des ADAMs. Il s'agit d'une cascade protéolytique séquentielle impliquant le clivage de l'ectodomaine d'une protéine transmembranaire suivi par un clivage du domaine transmembranaire permettant la libération du domaine cytoplasmique intact à l'intérieur de la cellule. Ce fragment peut ensuite soit être dégradé, soit être transporté vers d'autres sites où il module des événements intracellulaires. Par exemple, le clivage de la E-cadhérine entraîne la rupture de l'adhésion cellulaire modulée par son domaine extracellulaire et une redistribution de la β -caténine de la surface cellulaire au noyau afin d'activer des gènes cibles permettant la transition épithélio-mésenchymateuse [Edwards et coll, 2008 ; Murphy, 2008].

Les ADAMs sont ainsi capables de réguler de nombreux phénomènes impliqués lors de la progression tumorale. Diverses ADAMs ont ainsi été décrites pour jouer un rôle dans la progression tumorale ou l'angiogenèse comme les ADAM-9, ADAM-12 et ADAM-15 [Duffy et coll., 2009].

Les inhibiteurs endogènes des ADAMs semblent être majoritairement les TIMPs avec une certaine spécificité. Par exemple, TIMP-3 est capable d'inhiber ADAM-10, ADAM-12, ADAM-17, ADAM-28 et ADAM-33. TIMP-1 peut inhiber ADAM-10. TIMP-2 inhibe ADAM-12 ainsi que ADAM-33 et TIMP-4 inhibe ADAM-28 et ADAM-33 [Keller et coll., 2009 ; Murphy, 2009].

Ces systèmes de protéolyse matricielle sont donc cruciaux lors de l'invasion tumorale, en particulier du mélanome, notamment pour la migration des cellules lors de la dissémination métastatique.

I-1-3-3/ Adhésion et migration cellulaire

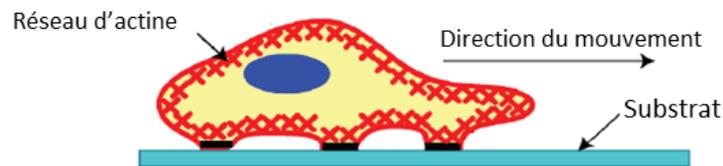
La migration cellulaire est un phénomène biologique conférant aux cellules une motilité essentielle lors de processus physiologiques, comme la cicatrisation, mais également pathologiques, tels que la dissémination métastatique. Il s'agit d'un processus en plusieurs étapes impliquant des phénomènes d'adhésion et de dé-adhésion ainsi que de contraction et de relâchement de la cellule.

I-1-3-3-1/Les différentes phases du phénomène migratoire

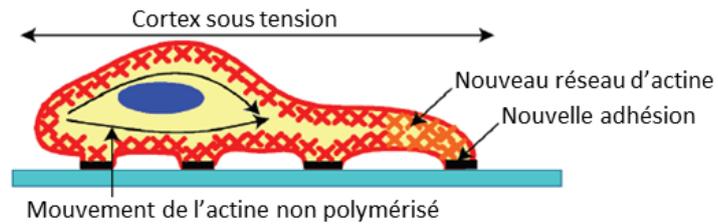
Sous l'action de différents stimuli provenant de l'environnement tumoral, une cellule cancéreuse peut s'engager dans la migration. La direction de la migration se fait selon le gradient de la molécule à l'origine du signal avec réorientation constante de la cellule en fonction de ce gradient tout au long du processus de migration [Ananthakrishnan et Ehrlicher, 2007]. La cellule tumorale subit ainsi une modification de son phénotype, notamment avec la disparition de ses caractéristiques épithéliales et l'apparition de marqueurs mésenchymateux, lui permettant de s'échapper de la tumeur primaire. Cette modification est appelée transition épithélio-mésenchymateuse [Bagnato et coll., 2004]. Le phénomène migratoire peut être divisé en cinq étapes [Ananthakrishnan et Ehrlicher, 2007 ; Friedl et Wolf, 2009]:

- Extension d'une protrusion cellulaire grâce à l'orientation et la réorganisation du réseau d'actine au niveau du front de migration
- Adhésion du pseudopode au substrat
- Protéolyse matricielle péricellulaire pour permettre l'avancée de la cellule
- Contraction du corps cellulaire vers le front de migration
- Désassemblage des complexes d'adhésion à l'arrière de la cellule

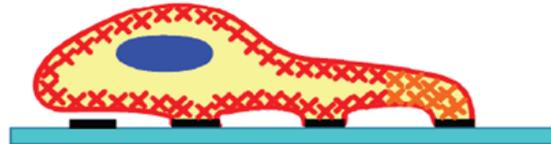
1) Protrusion cellulaire au front de migration



2) Adhésion du pseudopode au substrat



Désadhésion à l'arrière de la cellule



3) Mouvement du corps cellulaire

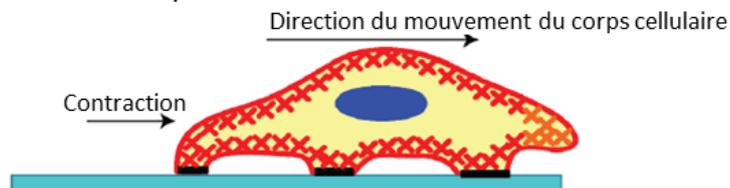


Figure 7 : Etapes de la migration

(D'après Ananthakrishnan et Ehrlicher, 2007)

Ces différentes étapes font intervenir principalement le cytosquelette d'actine et des molécules d'adhésion.

I-1-3-3-2/ Les acteurs de la migration

I-1-3-3-a/ Les molécules d'adhésion, le rôle des intégrines

Différents types de récepteurs à la surface cellulaire sont impliqués dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire et de ce fait dans la migration. Ces récepteurs peuvent être regroupés en trois grandes catégories : les intégrines, les protéoglycannes et les récepteurs tyrosine kinases.

Les protéoglycannes impliqués dans l'adhésion sont représentés par le CD44 et les syndécannes. Le CD44 se lie préférentiellement aux polymères glucidiques tels que les glycoprotéines, les glycosaminoglycannes ainsi que l'acide hyaluronique. Les syndécannes (1-4) sont des protéoglycannes à héparannes sulfates capables de se lier aux glycosaminoglycannes extracellulaires, notamment les héparannes sulfates et chondroïtines sulfates, mais également à d'autres molécules matricielles comme les collagènes de type I, III et IV, la fibronectine ou encore la vitronectine.

Les récepteurs tyrosine kinases à domaine discoïdine (« Discoïdin Domains Receptor » ou DDR) interviennent dans l'adhésion par leur liaison à tous les collagènes fibrillaires. Cette famille est composée de deux membres dans les cellules de mammifères : DDR-1, existant sous 5 isoformes (DDR-1a à DDR-1e) et DDR-2. Le récepteur DDR-1 est également capable de se lier aux collagènes de type IV, VI et VIII [Schmidt et Friedl, 2010].

Les intégrines sont les molécules impliquées de façon prédominante dans l'adhésion des cellules aux composants matriciels et dans la transduction du signal. Ce sont des protéines transmembranaires composées de deux sous-unités à domaines multiples, une sous-unité α et une sous-unité β , associées de façon non covalente. Il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui interagissent en différentes combinaisons (24 possibles) déterminant leur spécificité vis-à-vis de substrats matriciels, en particulier les collagènes, les laminines ou encore des glycoprotéines de structure telles que la fibronectine ou la vitronectine. De la partie N-terminale à la partie C-terminale, la sous-unité α se compose de la répétition de 7 domaines homologues contenant des sites de liaisons au Ca^{2+} , d'un domaine calf-1, d'un domaine calf-2 ainsi que d'un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Certaines sous-unités α possèdent également un domaine αI , situé entre les répétitions 2 et 3, qui intervient dans la liaison aux collagènes. La sous-unité β se compose quant à elle d'un domaine plexine-sémaphorine-intégrine, d'un domaine hybride, d'un domaine βI ,

de la répétition de 4 domaines EGF riches en cystéine, d'un domaine transmembranaire ainsi que d'un court domaine cytoplasmique [Barczyk et coll., 2010].

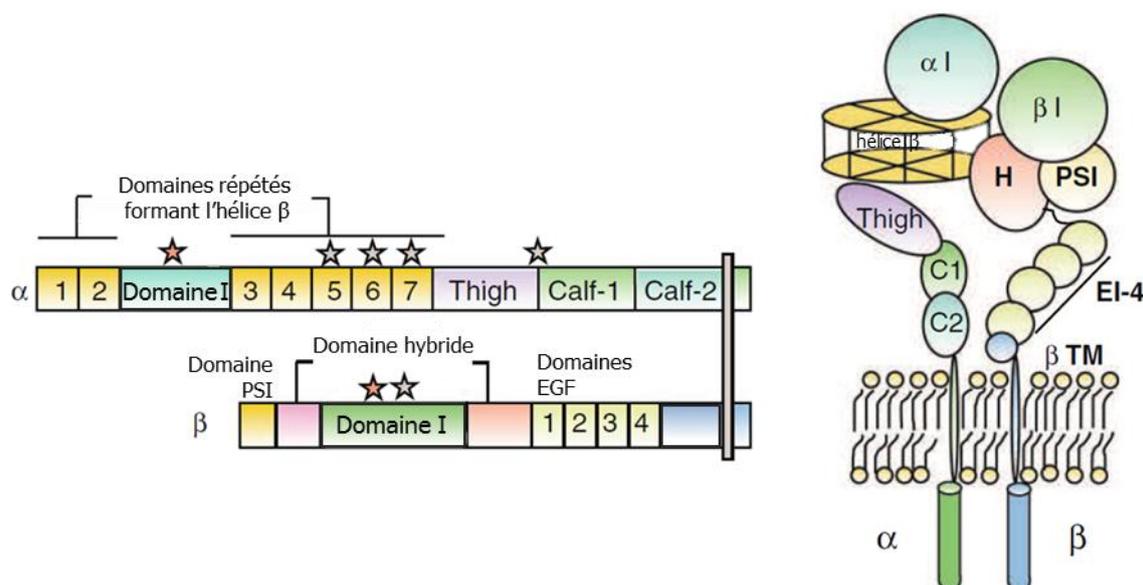


Figure 8 : Structure des intégrines

(D'après Barczyk et coll., 2010)

L'interaction des intégrines avec leurs ligands *via* des séquences de reconnaissance, comme par exemple la séquence consensus RGD, se fait de manière dépendante des cations divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} . La fixation de cations au niveau des motifs MIDAS (Metal-Ion Dependent Adhesion Site) présents dans le domaine I induit un changement conformationnel de l'intégrine permettant sa liaison au ligand et donc son activation. Cette activation se traduit par un regroupement d'intégrines (« clustering ») conduisant à la formation des contacts focaux [Barczyk et coll., 2010].

En fonction du type de cancer, les intégrines peuvent jouer un rôle pro- ou anti-tumorigénique. Dans le cas de l'invasion du mélanome, l'intégrine principalement impliquée est l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La sous-unité α_v est exprimée pendant tous les stades de progression du mélanome et peut s'associer à différentes sous-unités β telles que β_3 , β_5 , β_6 et β_8 tandis que la sous-unité β_3 est exprimée de façon prédominante lors de la phase verticale en association avec α_v . L'invasion induite par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ affecte les voies de signalisation Src et PKC dans les cellules de mélanome hautement métastatiques. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ semble jouer un rôle central dans la progression de la phase de croissance horizontale à la phase de croissance verticale du mélanome [Haas et coll., 2005 ; Kuphal et coll, 2005 ; Rathinam et Alahari, 2010]. Par ailleurs, cette intégrine est capable d'interagir

avec la MMP-2 à la surface de cellules de mélanome. Ainsi, l'invasion induite par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est potentialisée par la dégradation matricielle due à l'activité de la MMP-2 [Brooks et coll., 1996]. D'autres intégrines, telles que $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ jouent également un rôle important dans l'invasion du mélanome [Rathinam et Alahari, 2010].

I-1-3-3-b/ Les contacts focaux

Les contacts focaux sont des complexes protéiques permettant le phénomène d'adhésion indispensable dans la migration cellulaire. Ils assurent le lien entre la matrice extracellulaire qui sert de support à la cellule migrante et les phénomènes intracellulaires impliqués dans la migration. Ces contacts focaux sont constitués de nombreuses protéines. Les molécules d'adhésion, les intégrines, sont liées à une protéine de liaison, la taline, elle-même liée à la vinculine qui interagit avec les filaments d'actine [Ananthakrishnan et Ehrlicher, 2007]. Le regroupement des intégrines active la protéine kinase FAK, véritable carrefour des voies de signalisation régulant la migration cellulaire.

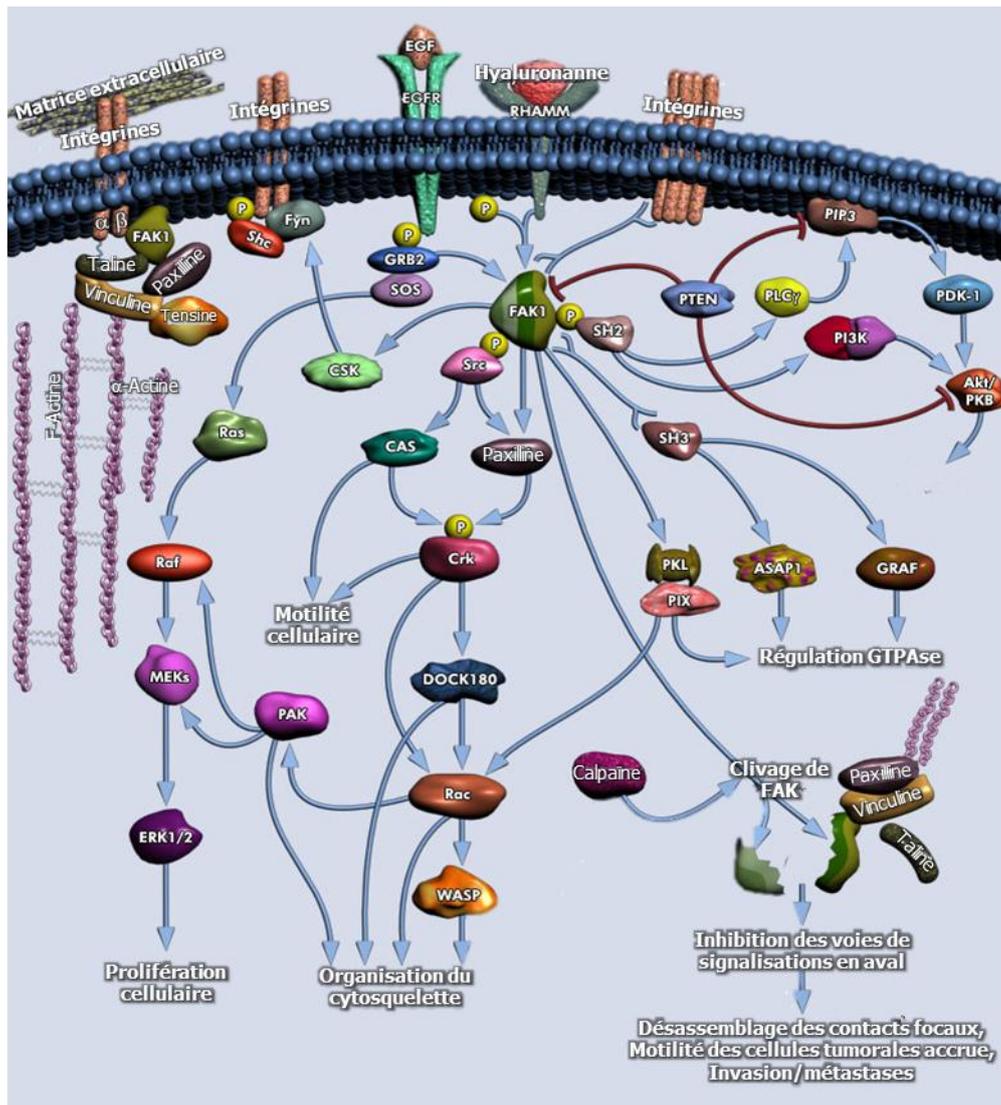


Figure 9 : L'adhésion focale et le rôle de FAK

(D'après <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=173>)

La protéine FAK est une tyrosine kinase de 125 kDa associée aux contacts focaux qui intervient au cours de nombreuses étapes de la migration cellulaire. Sous l'action de stimuli extérieurs tels que le regroupement d'intégrines ou EGF, la migration est initiée par la transphosphorylation de FAK sur différents résidus tyrosine, comme par exemple le résidu tyrosine 397, site de liaison pour Src et PI3K. Cette phosphorylation est nécessaire pour la fonction d'échafaudage de la protéine FAK. Celle-ci peut s'associer avec des protéines adaptatrices telles que p130^{Cas} pour former un complexe v-Src-Cas-Crk-Dock180 capable de promouvoir la migration *via* des voies de signalisation activant Rac-1 et JNK. Ces voies de signalisation entraînent une augmentation de l'expression de MMP-2 et MMP-9 nécessaires à la protéolyse matricielle péricellulaire [Kuphal et coll., 2005 ; Luo et Guan, 2009].

La protéine FAK joue également un rôle dans la régulation de la protéolyse matricielle péricellulaire exercée par la MMP-14. En effet, le complexe FAK/Src est capable de phosphoryler l'endophiline A2 sur le résidu tyrosine 315 de son domaine SH3. L'endophiline A2, associée à la dynamine, est impliquée dans le processus d'endocytose de la MMP-14. Cette phosphorylation réduit la capacité de l'endophiline A2 à interagir avec la dynamine ce qui conduit à une inhibition de l'endocytose de la MMP-14 et donc à une augmentation de l'expression de cette protéase à la surface cellulaire [Wu et coll., 2005].

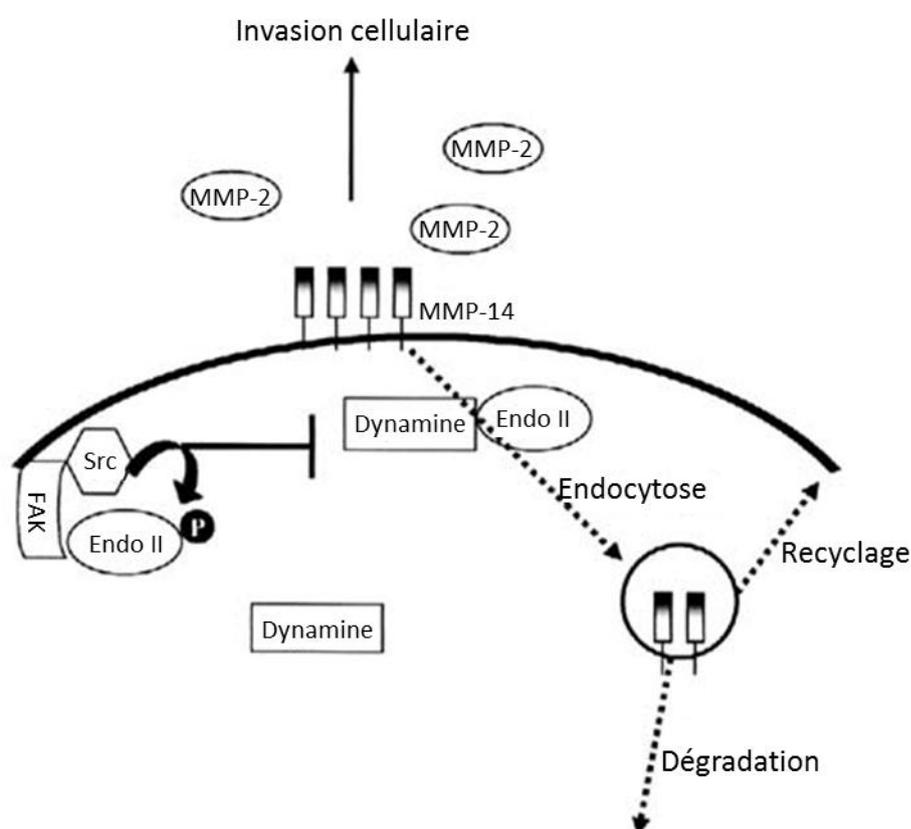


Figure 10 : Régulation de l'endocytose de la MMP-14 par le complexe FAK/Src

(D'après Wu, 2005)

Par ailleurs, en coopérant avec Src pour internaliser les molécules d'adhésion E-cadhérine, la protéine FAK facilite la transition épithélio-mésenchymateuse. Cette kinase phosphoryle la protéine adaptatrice Grb-7 et en modulant certaines protéines, comme N-WASP, Rho-GTPase et le complexe Arp2/3 directement impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine, elle induit la migration cellulaire. Enfin, la protéine FAK est également impliquée dans le turn-over des adhésions focales

par son association avec les protéines Src, Calpaïne-2 et Erk-2 [Kuphal et coll., 2005 ; Luo et Guan, 2009].

I-1-3-3-c/ Le rôle du cytosquelette

Les filaments d'actine représentent le moteur principal de l'initiation de la migration. Ils résultent de la polymérisation de monomères d'actine et sont naturellement polarisés avec une extrémité dite « plus » à polymérisation rapide et une extrémité dite « moins » à polymérisation plus lente. Chacune des extrémités des filaments d'actine a une concentration critique différente. La concentration critique est définie comme la concentration minimale d'actine permettant la polymérisation ; en-deçà, les filaments d'actine se dépolymérisent. Ainsi, si la concentration intracellulaire de monomères d'actine se situe entre les deux concentrations critiques, l'extrémité \oplus croît, dû à la polymérisation d'actine, alors que l'extrémité \ominus rétrécit *via* une dépolymérisation de l'actine. La polymérisation des filaments d'actine va projeter la membrane plasmique vers la direction de migration et ainsi initier le processus de migration [Ananthkrishnan et Ehrlicher, 2007 ; Le Clainche et Carlier, 2008].

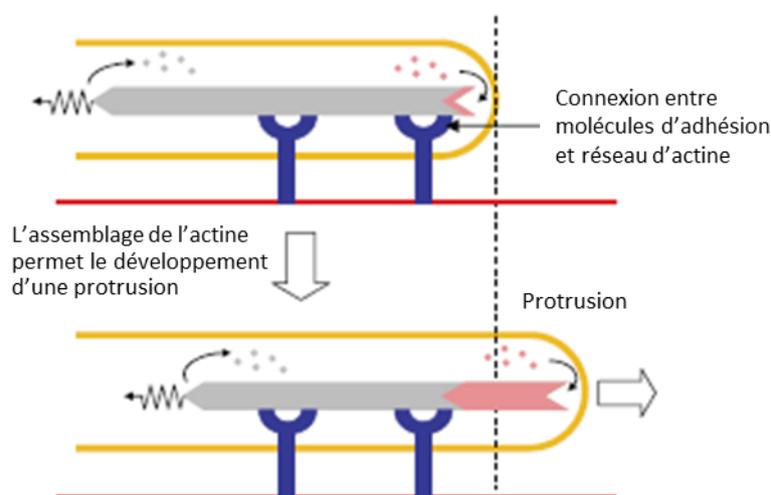


Figure 11 : Rôle de la polymérisation de l'actine dans l'initiation de la migration

(D'après Le Clainche et Carlier, 2008)

Au cours de la migration, des forces contractiles sont nécessaires à l'avancée de la cellule lors de l'étape de contraction du corps cellulaire. Ces forces contractiles sont principalement produites par des « moteurs » moléculaires représentés par la myosine. Ainsi, les « têtes » des protéines de

myosine se lie aux filaments d'actine. Un changement de conformation de la myosine permet ensuite le basculement de la « tête » de myosine le long du filament d'actine générant une force contractile. Enfin, la « tête » de myosine se détache du filament d'actine. La répétition de ces étapes impliquant la myosine est à l'origine du mouvement lors de la contraction du corps cellulaire [Ananthakrishnan et Ehrlicher, 2007].

Lors de la progression tumorale, la migration cellulaire joue un rôle essentiel dans la dissémination métastatique. Les cellules tumorales ne sont pas les seules affectées par ce phénomène, la migration cellulaire est également requise au niveau des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse.

I-1-3-4/ Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, en opposition à la vasculogenèse consistant en la mise en place de vaisseaux sanguins à partir de cellules précurseurs au cours du développement embryonnaire. L'angiogenèse participe à de nombreux phénomènes physiologiques, comme l'extension de l'arbre vasculaire, mais apparaît également essentielle lors de processus pathologiques comme le développement tumoral. La vascularisation, en assurant le transport passif des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique, contribue à la dissémination métastatique. Le degré de vascularisation est ainsi corrélé à la progression de la tumeur et apparaît comme un facteur pronostique important.

Lors du développement du mélanome, les mélanocytes transformés prolifèrent de manière incontrôlée ce qui provoque une augmentation considérable des besoins en oxygène et nutriments qui ne peuvent plus accéder au cœur de la tumeur par simple diffusion. Pour répondre à ces besoins, le développement d'un nouveau réseau vasculaire permettant l'acheminement des nutriments et de l'oxygène à la tumeur est nécessaire.

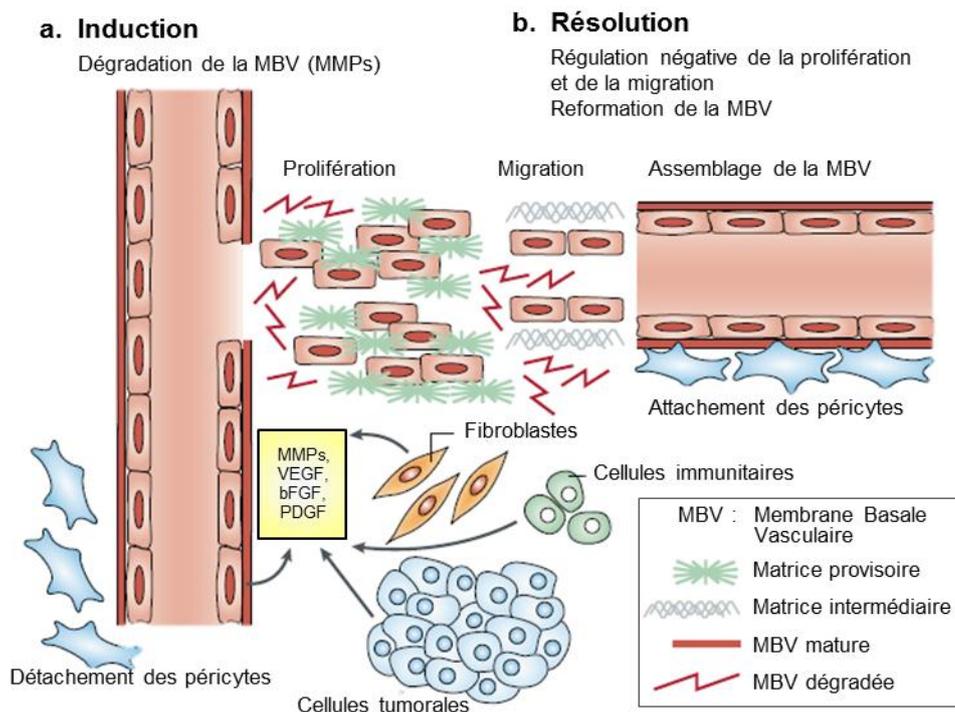


Figure 12 : L'angiogenèse tumorale

(D'après Kalluri, 2003)

En réponse à l'hypoxie et au manque de nutriments, les cellules de mélanome sécrètent alors des facteurs pro-angiogéniques notamment VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et TGF (Transforming Growth Factor) [Mahabeleshwar et Byzova, 2007]. En effet, lors de l'hypoxie, l'expression de HIF-1 α est augmentée ce qui conduit à une augmentation de l'expression du facteur de transcription HIF-1, formé de deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β . Ce facteur de transcription est capable d'induire l'expression du gène codant le VEGF grâce à une séquence HRE présente dans son promoteur [Clottes, 2005]. Les facteurs pro-angiogéniques diffusent jusqu'au réseau vasculaire pour se fixer aux récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales. Cette fixation active certaines cellules endothéliales (tip-cells) qui sécrètent des protéases permettant la dégradation de la membrane basale vasculaire puis la matrice extracellulaire environnante [Gerhardt et coll, 2003]. Les cellules endothéliales migrent et prolifèrent vers le site de la tumeur et forment ainsi une colonne de migration appelée bourgeon vasculaire. Ensuite, les cellules endothéliales s'organisent en tubes qui se raccordent les uns aux autres afin de former la lumière vasculaire. Par la suite, les signaux pro-angiogéniques s'atténuent progressivement grâce à la production de signaux anti-angiogéniques stimulés par l'oxygène apporté par le flux sanguin émergent. Enfin, la formation d'une nouvelle

membrane basale vasculaire et le recrutement de péricytes permettent la stabilisation des néo-capillaires [Karamysheva, 2008]. Les cellules endothéliales n'atteignant pas la maturation sont éliminées par élagage vasculaire (« vascular pruning ») [Dor et coll., 2001].

L'angiogenèse est un processus finement régulé sous le contrôle d'un équilibre entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Outre les systèmes de régulation « classiques », *via* l'activation ou l'inhibition des promoteurs de gènes ou encore la dégradation de protéines, ces facteurs pro-angiogéniques ou anti-angiogéniques peuvent aussi être régulés par des micro-ARN (miRNA). Les miRNA sont de petits ARN non codants capables de réguler l'expression de gènes en se liant à un ou plusieurs ARNm cible(s). Leur biogenèse requiert l'action successive de deux endonucléases RNase III : Drosha, dans le compartiment nucléaire, puis Dicer, dans le compartiment cytoplasmique. L'inactivation de ces endonucléases est corrélée à une diminution de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales ainsi que de la formation de pseudotubes *in vitro* et à une augmentation de l'expression de protéines pro-angiogéniques. Ceci témoigne d'une implication potentielle des miRNA dans la régulation de l'angiogenèse en ciblant des gènes clés intervenant dans le processus angiogénique [Kuehbach et coll, 2007 ; Heusschen et coll., 2009].

miRNA pro-angiogéniques	miRNA anti-angiogéniques
miR-126 ; miR-17-5p ; miR-18a	miR-221 ; miR-222
miR-19a ; miR-130a ; miR-21	miR-17 ; miR-20
miR-31 ; miR-27b ; let-7f	miR-92 ; miR-155

Figure 13 : Classement des principaux miRNA en fonction de leur implication dans l'angiogenèse tumorale

Lors de l'angiogenèse tumorale, ces facteurs sont principalement sécrétés par les cellules tumorales. Cependant, l'environnement matriciel joue également un rôle essentiel dans la régulation de l'angiogenèse avec la libération, au cours de la protéolyse matricielle, de facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire ainsi que de matrikines, fragments de la matrice extracellulaire possédant une activité biologique [Tandle et coll., 2004].

Ainsi, la matrice extracellulaire joue un rôle prépondérant dans la progression tumorale et la dissémination métastatique.

I-2/ La matrice extracellulaire

I-2-1/Généralités

La matrice extracellulaire est définie par l'ensemble des macromolécules extracellulaires. Elle est composée de protéoglycannes et d'acide hyaluronique, de glycoprotéines, et de fibres, principalement des fibres de collagènes et des fibres élastiques. Ces macromolécules interagissent entre elles pour former un assemblage complexe dont les propriétés dépendent de sa composition et de son arrangement. Les fibres de collagènes et les fibres élastiques permettent la formation d'un réseau dense résistant aux tensions alors que les protéoglycannes et glycoprotéines sont à l'origine d'un réseau plus lâche résistant aux forces de compression [Culav et coll., 1999].

La matrice extracellulaire assure ainsi de nombreux rôles comme le soutien des cellules. Par son interaction avec les cellules, elle peut réguler de nombreux phénomènes dont la prolifération, la migration et la survie cellulaire. De plus, sa protéolyse peut libérer des facteurs régulant également de nombreux processus biologiques.

Ces facteurs peuvent être [Tran et coll., 2005] :

- des facteurs de croissance et cytokines piégés dans la matrice extracellulaire
- des matrikines, peptides issus de macromolécules de la matrice possédant une activité biologique [Maquart et coll., 1999]
- des matricryptines, peptides matriciels uniquement actif après modification conformationnelle révélant le site cryptique possédant l'activité biologique [Davis et coll., 2000]

La matrice extracellulaire résulte d'un équilibre entre synthèse et dégradation de ses composants. Ceux-ci sont sécrétés par des cellules mésenchymateuses, notamment par les fibroblastes au niveau du derme, tandis que sa protéolyse résulte essentiellement de l'activité des MMPs et du système plasminogène-plasmine décrits précédemment.

Il existe des matrices extracellulaires spécialisées notamment les membranes basales.

I-2-2/ Les membranes basales

I-2-2-1/ Généralités

Les membranes basales sont des matrices extracellulaires hautement spécialisées qui représentent une zone frontière entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent. Elles sont constituées de protéoglycannes, de glycoprotéines de structure et de collagènes. Les membranes basales assurent différents rôles, notamment un rôle de soutien des cellules et de cohésion des tissus. La membrane basale glomérulaire joue un rôle particulier puisqu'elle intervient dans la fonction de filtration. Les facteurs de croissance et cytokines piégés dans les membranes basales permettent le contrôle de fonctions cellulaires. Par l'interaction de ses composants avec les cellules, les membranes basales régulent des activités biologiques telles que la migration, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire [Kruegel et Miosge, 2010].

I-2-2-2/ Structure des membranes basales

Les membranes basales forment un réseau de protéoglycannes, glycoprotéines et collagènes. Les protomères de collagènes et de laminines sont assemblés à l'intérieur de la cellule puis sécrétés dans le milieu extracellulaire. Les composants des membranes basales s'auto-assemblent pour former un maillage. Ce processus semble être initié par la polymérisation des laminines, ancrées à la surface cellulaire *via* des récepteurs comme les intégrines. Le réseau de collagène de type IV s'associe ensuite aux laminines et les protéoglycannes s'entremêlent aux réseaux de collagènes et de laminines. En microscopie électronique, la membrane basale est divisée en deux structures : la *lamina densa*, correspondant au réseau dense de collagène et la *lamina lucida*, correspondant aux glycoprotéines. Une troisième couche peut parfois être observée, la *lamina reticularis*, correspondant à des fibres d'ancrage.

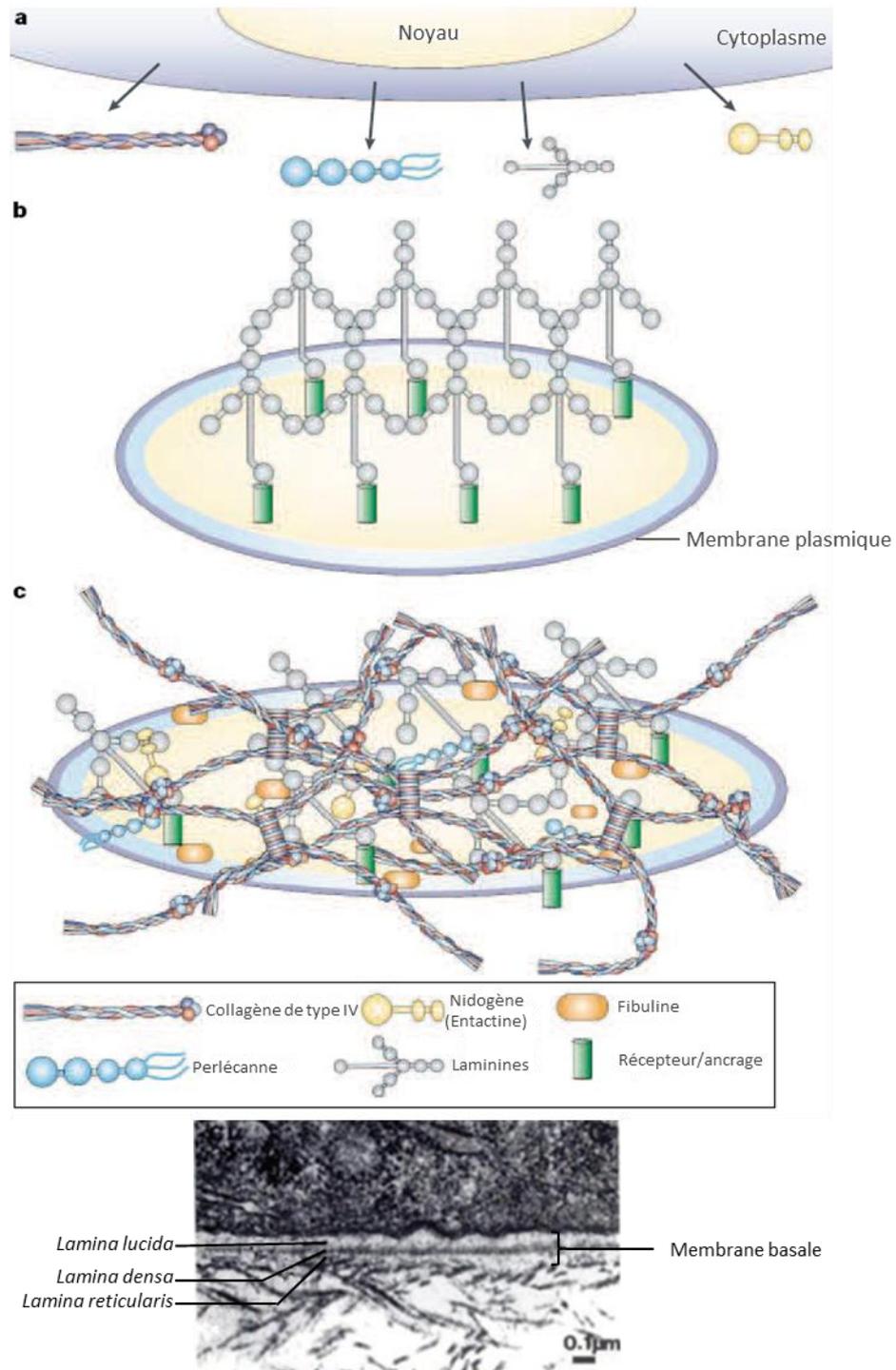


Figure 14 : Structure et assemblage de la membrane basale
(D'après Yurchenco et Schittny, 1990 ; Kalluri, 2003)

*I-2-2-3/ Les composants des membranes basales**I-2-2-3-1/ Protéoglycannes*

Les protéoglycannes sont caractérisés par une protéine cœur liée de façon covalente à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes sulfatés. Le cœur protéique est spécifique du type de protéoglycanne et peut être de taille variable. De même, les chaînes de glycosaminoglycannes, composées d'unités disaccharidiques répétées, peuvent varier, et ce sont à la fois le type et le nombre d'unités qui déterminent les propriétés du protéoglycanne. Ainsi, les protéoglycannes peuvent être à chondroïtine sulfates, kératane sulfates, dermatane sulfates ou encore héparane sulfates. Les protéoglycannes ont plusieurs fonctions comme l'hydratation de la matrice extracellulaire ou la stabilisation des réseaux de collagènes [Culav et coll., 1999].

Au niveau des membranes basales, le protéoglycanne majoritaire est le perlécane, un héparane sulfate dont la masse moléculaire du cœur protéique est d'environ 400 kDa. Ce protéoglycanne possède 5 domaines (domaines I à V) où le domaine I porte les 3 chaînes d'héparane sulfates. La protéine cœur contient de nombreux sites de liaisons à d'autres molécules constituant les membranes basales comme le nidogène, le collagène de type IV, les intégrines et l'héparine [LeBleu, 2007]. Le perlécane est également capable d'interagir avec divers facteurs de croissance, tels que FGF ou encore PDGF, et ainsi régule différentes fonctions cellulaires comme la migration ou la prolifération. De plus, le domaine V du perlécane, l'endorepelline, a des propriétés anti-angiogéniques [Kruegel et Miosge, 2010].

L'agrine est également présente dans les membranes basales. C'est un protéoglycanne à héparane sulfate avec une protéine cœur de plus de 400 kDa. Ce protéoglycane possède différents domaines lui permettant notamment de se lier avec des laminines ou encore des intégrines [Yurchenco et Patton, 2009].

I-2-2-3-2/ Glycoprotéines non collagéniques

Les glycoprotéines sont des protéines portant des groupements glucidiques. Elles possèdent de multiples domaines et donc diverses fonctions. Elles représentent une catégorie minoritaire par rapport aux autres composants matriciels mais jouent un rôle essentiel. Elles stabilisent la matrice extracellulaire et assurent les liens entre les cellules et les composants matriciels. Les glycoprotéines

ont également une fonction régulatrice de nombreux phénomènes biologiques et de nombreuses matrikines dérivent des glycoprotéines [Culav et coll., 1999 ; Maquart et coll., 2004].

Les laminines et les nidogènes sont retrouvés de façon ubiquitaire dans les membranes basales.

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques composées d'une chaîne α , d'une chaîne β et d'une chaîne γ , associées entre elles par des ponts disulfure. Il existe cinq chaînes α ($\alpha 1$ à $\alpha 5$), trois chaînes β ($\beta 1$ à $\beta 3$) et trois chaînes γ ($\gamma 1$ à $\gamma 3$) qui peuvent s'assembler en seize isoformes différentes au moins [Aumailley et coll., 2005]. Les laminines possèdent de nombreux domaines capables d'interagir avec les nidogènes, le collagène IV ou le perlécane. Elles jouent un rôle majeur dans l'assemblage des membranes basales [Durbeej, 2010 ; Kruegel et Miosge, 2010]. Diverses matrikines dérivent des laminines notamment la chaîne $\gamma 2$ de la laminine-332 (laminine-5) ainsi que la laminine-111 (laminine-1). Le clivage de la laminine-332 par la MMP-2 ou la MMP-14 libère un fragment protéolytique de la chaîne $\gamma 2$ capable d'induire la migration et l'invasion de cellules tumorales. Cette matrikine est notamment retrouvée au niveau du front d'invasion de nombreux cancers dont le mélanome, témoignant de son rôle pro-tumoral [Pupa et coll., 2002 ; Miyazaki, 2006]. La laminine-111 possède différentes séquences issues de ses trois chaînes capables de modifier le comportement cellulaire. La séquence YIGSR issue de la chaîne $\beta 1$, par exemple, inhibe la formation de métastases pulmonaires dans un modèle de mélanome murin [Malinda et Kleinman, 1996]. Les séquences NPWHSIYITRFG et TWYKIAFQRNRK dérivant de la chaîne $\alpha 1$ sont, quant à elles, capables de favoriser l'invasion du mélanome en se liant à l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ [Nakahara et coll., 1996]. Au niveau de la chaîne $\gamma 1$, la séquence KAFDITYVRLKF peut faciliter la formation de métastases pulmonaires de mélanome murin par une sécrétion accrue de MMP-9 soutenant le processus migratoire [Kuratomi et coll., 2002].

Les nidogènes sont également connus sous le nom d'entactine et existent sous deux isoformes, le nidogène-1 et le nidogène-2. Ce sont des glycoprotéines comprenant trois domaines globulaires, G1, G2 et G3, et un domaine R en bâtonnet. Ils assurent la liaison entre les composants de la membrane basale à savoir le collagène IV, les laminines et le perlécane [Yurchenco et Patton, 2009].

I-2-2-3-3/ Les collagènes

I-2-2-3-3-a/ Généralités et classification

La superfamille des collagènes regroupe les protéines de la matrice extracellulaire formées par l'association en triple hélice de trois chaînes polypeptidiques α , parmi 43 connues, reliées entre elles par des liaisons hydrogène interchaînes. La structure hélicoïdale caractéristique des collagènes résulte de la répétition des résidus $(\text{Gly-X-Y})_n$, X étant souvent une proline et Y, une 4-hydroxyproline. A ce jour, cette famille est composée de 28 membres, numérotés de I à XXVIII, bien qu'un nombre croissant d'autres molécules comportant une structure caractéristique en triple hélice soit décrit. En plus de leur domaine collagénique (COL), les collagènes possèdent également des domaines non collagéniques (NC) [Ricard-Blum et Ruggiero, 2005 ; Gordon et Hahn, 2010]. La plupart des collagènes sont capables de former des assemblages supramoléculaires. En fonction de leur particularité et de leur assemblage supramoléculaire, 9 sous-familles peuvent être définies [Gelse et coll., 2003 ; Myllyharju et Kivirikko, 2004] :

- Les collagènes fibrillaires : types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII
- Les collagènes FACITs (Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helix) : types IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII et XXVI
- Les collagènes à réseaux hexagonaux : types VIII et X
- Les collagènes de membranes basales : type IV
- Les collagènes à filaments perlés : type VI
- Les collagènes des fibrilles d'ancrage : type VII
- Les collagènes transmembranaires : types XIII, XVII, XXIII et XXV
- Les collagènes à domaines en triple hélice multiples ou multiplexines : types XV et XVIII
- Les autres collagènes : types XXVIII

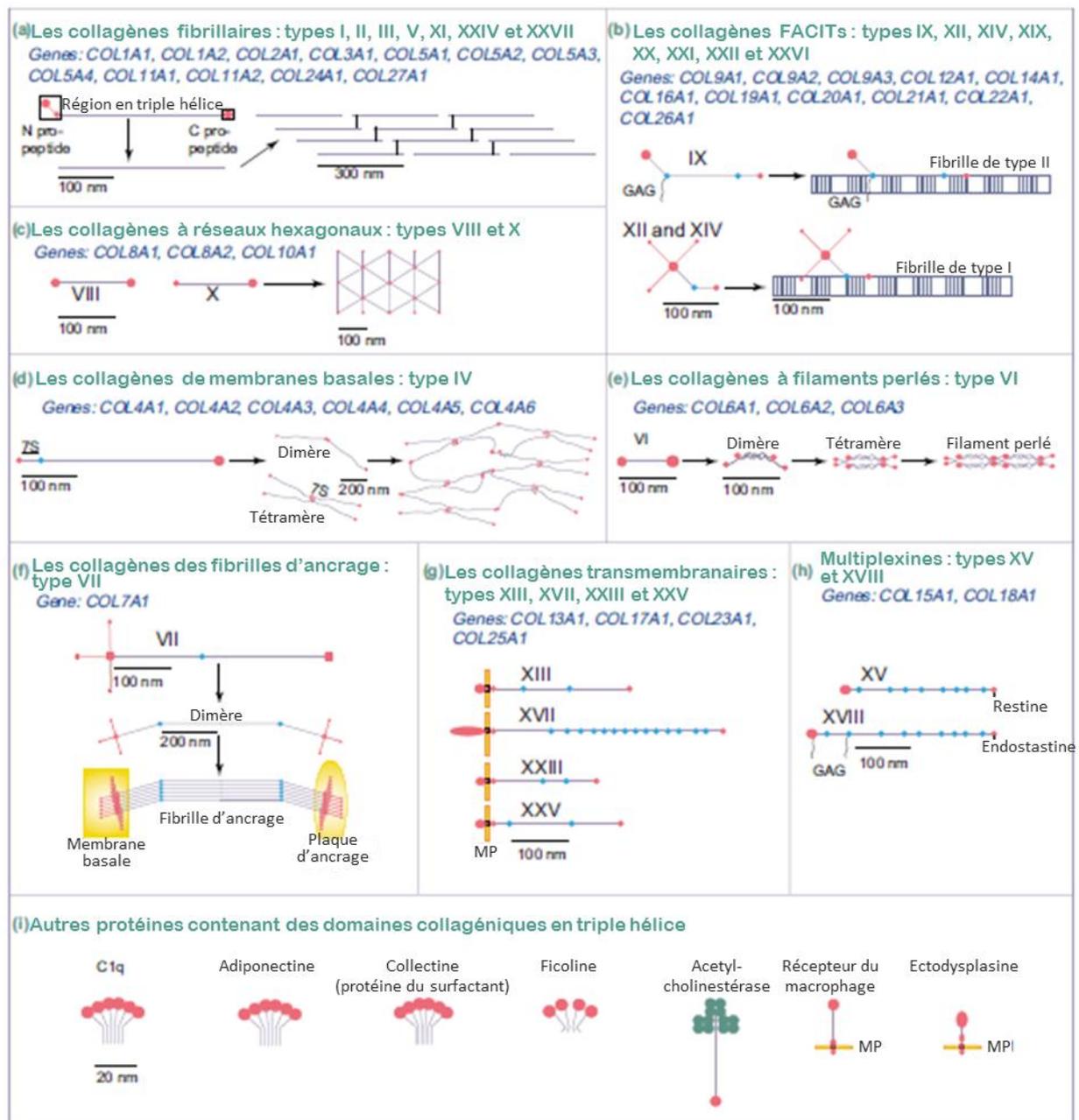


Figure 15 : Classification des collagènes

(D'après Myllyharju et Kivirikko, 2004)

Au niveau des membranes basales sont retrouvés les collagènes XV, XVIII, XIX et le collagène IV.

I-2-2-3-3-b/ Les collagènes associés aux membranes basales

I-2-2-3-3-b-i/ Le collagène XV

Le collagène XV est un collagène appartenant à la sous-famille des multiplexines, décrit comme étant la protéine cœur d'un protéoglycane à chondroïtine sulfate. Il s'agit d'un homotrimère constitué de 3 chaînes $\alpha 1(XV)$. Chaque chaîne $\alpha(XV)$ est une protéine de 1388 acides aminés, comprenant de la partie N-terminale à la partie C-terminale : un domaine non collagénique NC1 de 529 résidus d'acides aminés, une séquence collagénique de 579 résidus (COL1-9) avec 8 interruptions de 7 à 45 résidus (NC2-9), et un domaine non collagénique NC10 de 255 résidus [Hägg et coll., 1997].

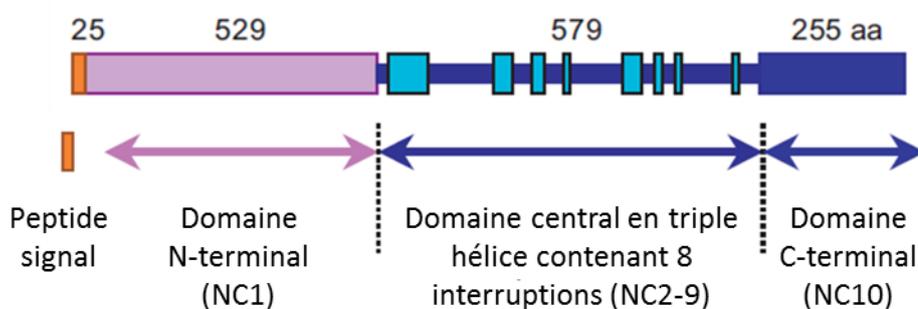


Figure 16 : Structure du collagène XV

(D'après Ortega et Werb, 2002)

Il est fortement exprimé au niveau du cœur, des muscles squelettiques, du placenta et modérément au niveau des reins, du pancréas et des glandes surrénales. Il présente essentiellement une localisation au niveau des membranes basales neuronales, mésenchymateuses, vasculaires et certaines membranes basales épithéliales [Ortega et Werb, 2002]. Le collagène XV assure l'intégrité structurale des muscles squelettiques et des capillaires en liant les fibres de collagène à la membrane basale. La protéolyse du domaine NC10 du collagène XV peut conduire à la libération d'une matricryptine appelée restine. Cette matricryptine est capable d'inhiber la migration de cellules endothéliales mais son effet sur leur prolifération reste controversé. La restine exerce un effet anti-tumoral qui semble reposer sur ses propriétés anti-angiogéniques [Sasaki et coll., 2002 ; Xu et coll., 2002].

I-2-2-3-3-b-ii/ Le collagène XVIII

Le collagène XVIII appartient également à la sous-famille des multiplexines et résulte de l'association homotrimérique de trois chaînes $\alpha 1(\text{XVIII})$. Il présente de nombreuses homologies avec le collagène XV et a été décrit comme un protéoglycane à héparane sulfate [Sasaki et coll., 2002]. Le gène COL18A1 est sous le contrôle de deux promoteurs alternatifs et code deux isoformes de la chaîne $\alpha 1(\text{XVIII})$, une isoforme courte et une isoforme longue. Cette dernière étant soumise à un épissage différentiel, il existe trois isoformes différant au niveau de leur domaine non collagénique N-terminal : une isoforme intermédiaire, une isoforme longue et une isoforme courte. Toutes ces isoformes partagent une structure commune. Ainsi, de la partie N-terminale vers la partie C-terminale, chaque chaîne $\alpha 1(\text{XVIII})$ est constituée d'un domaine non collagénique NC1 de 301 résidus, d'un domaine collagénique de 689 résidus (COL1-10) interrompue par 9 domaines non collagéniques (NC2-9) de 10 à 24 résidus, ainsi que d'un domaine non collagénique NC11 de 311 résidus.

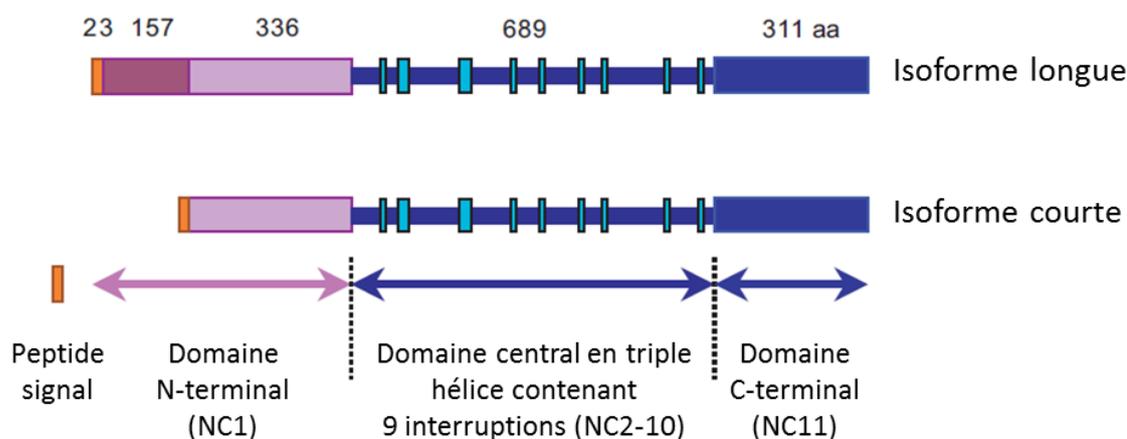


Figure 17 : Structure du collagène XVIII

(D'après Ortega et Werb, 2002)

Le collagène XVIII est retrouvé dans les membranes basales épithéliales et vasculaires au niveau des organes fortement vascularisés tels que le foie pour le variant d'épissage long, mais également les reins, les poumons ou encore le placenta pour le variant d'épissage court [Musso et coll., 1998 ; Saarela et coll., 1998]. Il joue un rôle important dans la fonction et le maintien de l'intégrité des membranes basales en particulier oculaires et donc dans la sensibilité visuelle. Ce collagène peut interagir avec de nombreuses molécules composant les membranes basales, tels que le perlécane ou encore les laminines, et peut moduler des effets biologiques par son interaction avec

d'autres héparane sulfates, comme les glypicannes [Marneros et Olsen, 2005]. La protéolyse de son domaine non collagénique C-terminal libère un fragment d'environ 20 kDa, l'endostatine. L'endostatine est capable d'inhiber la croissance tumorale et la formation de métastases *in vivo* notamment grâce à ses propriétés anti-angiogéniques. L'activité anti-angiogénique de l'endostatine réside dans l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales mais également dans l'inhibition de la prolifération induite par les facteurs de croissance bFGF et VEGF et de la migration des cellules endothéliales. L'endostatine exerce des effets sur les systèmes protéolytiques en particulier sur le système plasminogène, en réprimant la production d'uPA, ainsi que sur les MMPs, en inhibant l'activité catalytique de la MMP-14 et de la MMP-2 qui bloque alors l'activation de la proMMP-2. Par ces effets, l'endostatine inhibe l'invasion des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse tumorale [Wickström et coll., 2001 ; Ortega et Werb, 2002].

I-2-2-3-3-b-iii/ Le collagène XIX

Le collagène XIX est un collagène FACIT minoritaire des membranes basales. Il s'agit d'un homotrimère résultant de l'assemblage de trois chaînes $\alpha 1(\text{XIX})$ en triple hélice. Cette structure nécessite 14 résidus cystéine formant des ponts disulfure intrachaînes qui stabilisent la triple hélice. Chaque chaîne $\alpha 1(\text{XIX})$ présente :

- un domaine N-terminal non collagénique NC6 de 268 acides aminés
- un domaine collagénique discontinu de 832 résidus constitué de 5 régions collagéniques (COL1-COL5) interrompues par 4 régions non collagéniques de 20 à 40 acides aminés (NC5-NC2)
- un domaine non collagénique NC1 de 19 résidus à l'extrémité C-terminale.

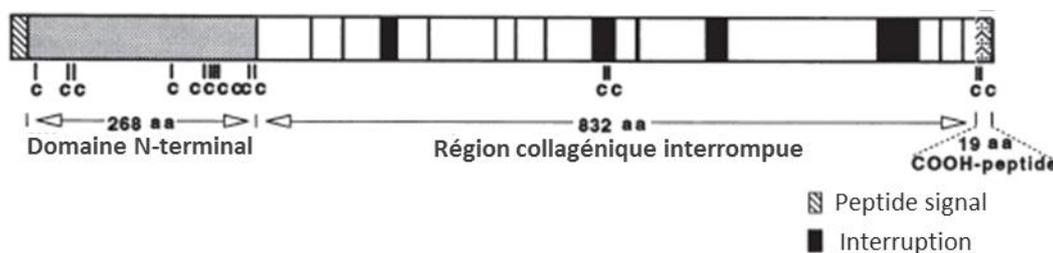


Figure 18 : Structure du collagène XIX

(D'après Myers et coll., 1997)

Ce collagène est retrouvé au niveau des zones de membranes basales vasculaires, neuronales et épithéliales. Il semble jouer un rôle important dans la différenciation musculaire ainsi que dans l'angiogenèse [Myers et coll., 2003 ; Sumiyoshi et coll., 2004]. Le collagène XIX disparaît dès les premiers stades invasifs du cancer du sein permettant le remodelage de la matrice extracellulaire et donc l'infiltration des cellules tumorales [Amenta et coll., 2003]. Le domaine NC1 du collagène XIX est capable d'inhiber *in vivo* la croissance tumorale dans un modèle de mélanome murin. *In vitro*, ce domaine est capable d'inhiber les propriétés invasives des cellules tumorales d'une part et exerce une activité anti-angiogénique d'autre part. Ces effets peuvent en partie s'expliquer par une inhibition de la migration des cellules tumorales et endothéliales associée à une inhibition de l'expression de la MMP-14 et du VEGF. Ces propriétés anti-migratoires ont également été mises en évidence dans un modèle de mélanome humain *in vitro* [Ramont et coll., 2007 ; Toubal et coll., 2010].

I-2-2-3-3-b-iv/ Le collagène IV

Le collagène de type IV est le composant majeur des membranes basales et représente le seul collagène capable de former un réseau en s'auto-assemblant. Ce collagène est un hétérotrimère formé de trois chaînes $\alpha(\text{IV})$ parmi 6 possibles, $\alpha 1(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$. Ces différentes chaînes sont codées par 6 gènes distincts présents sur 3 chromosomes différents. Ils sont situés par paire en position tête-bêche et sous le contrôle d'un promoteur commun. Ainsi, les gènes des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ se situent sur le chromosome 13, ceux des chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$ sur le chromosome 2 et enfin les gènes des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sur le chromosome X [Kalluri, 2003]. Chacune des chaînes $\alpha(\text{IV})$ comporte 3 régions :

- Un domaine 7S, riche en cystéine, situé dans la partie N-terminale et composé d'environ 15 acides aminés
- Un long domaine collagénique central d'environ 1400 acides aminés, caractérisé par une répétition Gly-X-Y, X étant préférentiellement un résidu de proline ou de lysine et Y, un résidu d'hydroxyproline ou d'hydroxylysine. Ce domaine est discontinu, interrompu par de courtes séquences non collagéniques responsables d'une certaine flexibilité du protomère
- Un domaine globulaire et non collagénique NC1 d'environ 230 acides aminés et situé dans la partie C-terminale, nécessaire lors de l'auto-assemblage des chaînes $\alpha(\text{IV})$



Figure 19 : Structure du collagène IV

(D'après Kalluri, 2003)

Trois protomères différents, résultant de l'association de 3 chaînes $\alpha(\text{IV})$, ont été décrits : $\alpha 1(\text{IV})\alpha 2(\text{IV})\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})\alpha 6(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$. Cette association en trimère requiert des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobes de surface entre les domaines NC1 des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ pour l'association $\alpha 1(\text{IV})\alpha 2(\text{IV})\alpha 1(\text{IV})$ tandis que le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(\text{IV})$ apparaît indispensable pour ces interactions lors de l'association $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$. La distribution tissulaire de ces chaînes est variable. Les protomères $\alpha 1(\text{IV})\alpha 2(\text{IV})\alpha 1(\text{IV})$ sont majoritaires et retrouvés de façon ubiquitaire au niveau des membranes basales. Les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$ sont uniquement retrouvées associées en protomères $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$ et sont exprimées au niveau de membranes basales spécifiques telles que celles des fibres musculaires synaptiques, de l'aorte, du poumon, de la cochlée, du glomérule rénal et de la capsule du cristallin. La chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est également retrouvée au niveau de ces membranes basales lors de son association avec $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$ mais également au niveau des membranes basales du rein, du poumon, de la capsule du cristallin, de l'œsophage et de la peau lors de son association avec $\alpha 6(\text{IV})$ [Lebleu et coll., 2010].

Les trimères s'auto-assemblent pour former trois types de réseaux : $\alpha 1\alpha 2\alpha 1/\alpha 1\alpha 2\alpha 1$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5/\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 1\alpha 2\alpha 1/\alpha 5\alpha 6\alpha 5$. L'assemblage en réseau nécessite des interactions intervenant au niveau des domaines 7S et NC1. En effet, les domaines NC1 interagissent entre eux pour établir des dimères, stabilisés par la formation de ponts disulfure entre 12 résidus cystéine présents au niveau des 6 chaînes $\alpha(\text{IV})$. L'interaction des domaines 7S de quatre protomères permet la formation de tétramères grâce à de nombreux ponts disulfure et des liaisons croisées dérivant des résidus lysine et hydroxylysine. L'assemblage en tétramères et dimères conduit à la formation du réseau de collagène IV, maillage fin et résistant, où s'entremêlent les glycoprotéines et protéoglycannes des membranes basales [Kalluri, 2003].

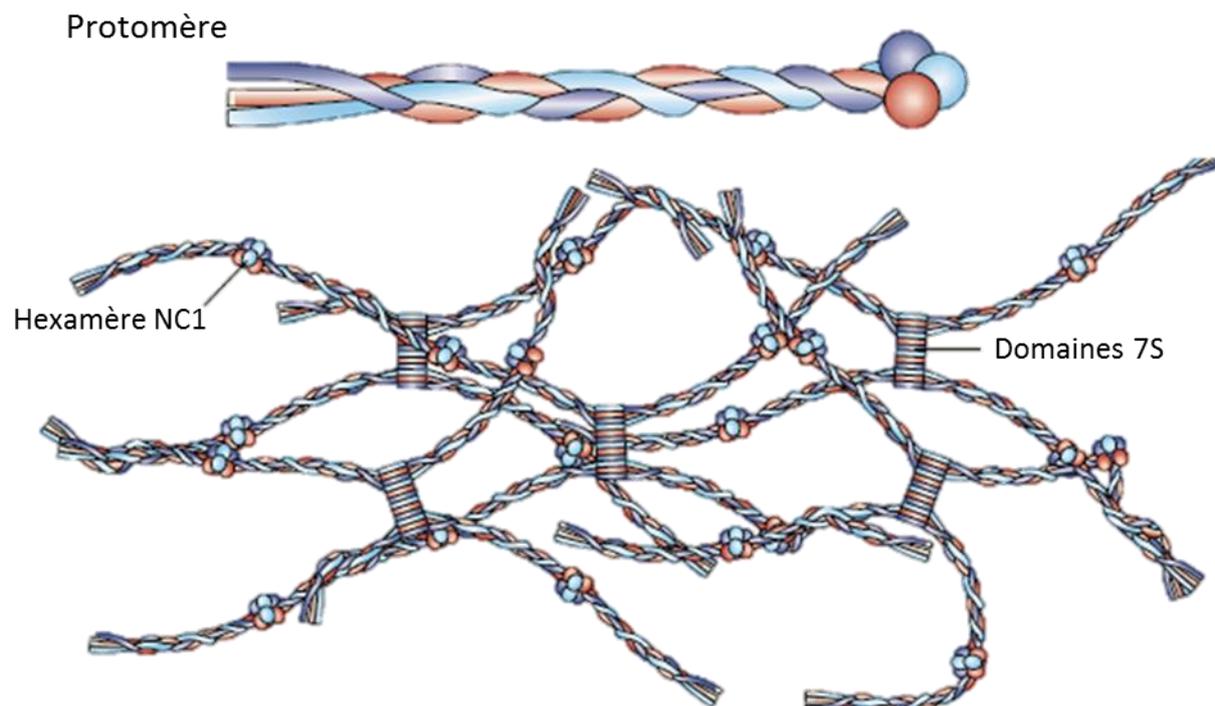


Figure 20 : Formation du réseau du collagène IV

(D'après Kalluri, 2003)

Des mutations au niveau des gènes codant les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ ou $\alpha 5(\text{IV})$ mènent à des perturbations dans la formation du réseau à l'origine du syndrome d'Alport. D'autres pathologies sont également décrites comme la léiomyomatose associée au syndrome d'Alport, suite à des délétions au niveau des gènes COL4A5 et COL4A6, ou encore le syndrome de Goodpasture, où des auto-anticorps dirigés contre le domaine NC1 $\alpha 3(\text{IV})$ se fixent au niveau des membranes basales [Kadler et coll., 2007 ; Atgmael et Bruckner-Tuderman, 2010].

De nombreuses matrikines dérivent du collagène IV en particulier des domaines NC1 des chaînes α du collagène IV.

1-3/ Les matrikines dérivées du collagène IV

1-3-1/ La triple hélice

Diverses séquences du domaine collagénique de la chaîne $\alpha 1$ du collagène IV, comme les séquences 531-543 ou encore 1263-1277, exercent des effets biologiques, notamment une augmentation de l'adhésion, de l'étalement et de la motilité de cellules de mélanome *via* leur interaction avec l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ et le récepteur CD44 respectivement [Miles et coll., 1994]. La

séquence 434-472 interagit avec l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ ce qui conduit à une augmentation de l'adhésion des cellules de fibrosarcome. Le fragment CB3(IV), obtenu par digestion au bromure de cyanogène de la triple hélice du collagène IV, peut interagir avec les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ et ainsi promouvoir l'adhésion de cellules endothéliales [Fields et coll., 1993]. La région en triple hélice du collagène IV générée par une digestion par la pepsine stimule l'adhésion de cellules de mélanome de manière partiellement dépendante aux séquences RGD présentes au sein de cette région [Fields et coll., 1993 ; Miles et coll., 1994 ; Pasco et coll., 2005].

I-3-2/ L'arrestène

L'arrestène correspond au domaine NC1 de la chaîne $\alpha 1$ du collagène IV libéré grâce à l'activité protéolytique de la MMP-9. Ce domaine de 26 kDa possède une activité anti-angiogénique et des propriétés anti-tumorales. Cette activité anti-angiogénique se traduit par une inhibition de la migration, de la prolifération et de la formation de pseudotubes *in vitro*. Elle résulte de l'interaction du domaine NC1 $\alpha 1$ (IV) avec l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ qui inhibe la phosphorylation de FAK. Cette inhibition de la phosphorylation de FAK induit une inactivation des voies Raf/MEK/ERK1/2/p38 MAPK et ainsi inhibe HIF-1 α , nécessaire à l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF [Sudhakar et coll., 2005]. *In vivo*, cette activité anti-angiogénique conduit à une inhibition de la croissance tumorale et de la formation de métastases [Colorado et coll., 2000]. L'arrestène est également capable de moduler l'activation de la MMP-2 [Boosani et coll., 2010] ou encore d'augmenter le phénomène d'apoptose des cellules endothéliales par l'inhibition des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. La séquence active de l'arrestène semble se trouver dans la partie C-terminale du domaine [Nyberg et coll., 2008].

I-3-3/ La canstatine

Le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 2$ (IV), nommé canstatine, est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse et de la croissance tumorale de 24 kDa. *In vitro*, la canstatine inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de pseudotubes [Kamphaus et coll., 2000]. Elle induit également l'apoptose de cellules endothéliales en inhibant la phosphorylation de FAK et Akt ce qui conduit à l'induction de l'apoptose dépendante de Fas avec l'inhibition du facteur anti-apoptotique FLIP [Panka et Mier, 2003]. Deux séquences semblent être responsables de cette activité anti-angiogénique : la séquence N-terminale de la canstatine nécessaire à l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales et la séquence C-terminale associée à l'inhibition de la prolifération de ces cellules [He et coll., 2003 ; He et coll., 2004]. La canstatine est également

capable d'inhiber la lymphangiogenèse [Hwang-Bo et coll., 2010] et d'augmenter l'adhésion de cellules tumorales. Les effets de la canstatine semblent résulter de son interaction avec plusieurs intégrines : l'intégrine $\alpha\beta_3$, l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ [Roth et coll., 2005] ou encore l'intégrine $\alpha\beta_5$ [Magnon et coll., 2005]. *In vivo*, les propriétés anti-angiogéniques et anti-lymphangiogéniques de la canstatine mènent à une inhibition de la croissance tumorale dans différents modèles de cancer [Kamphaus et coll., 2000 ; He et coll., 2004 ; Roth et coll., 2005 ; Hwang-Bo et coll., 2010]. De plus, l'utilisation de la canstatine en combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux semblent être prometteurs dans des modèles de xénogreffes [Magnon et coll., 2008 ; Wang et coll., 2008].

I-3-4/ La tumstatine

La tumstatine, domaine NC1 de la chaîne α_3 du collagène IV, est un peptide de 28 kDa issu de la protéolyse matricielle. Il est libéré par l'activité de diverses métalloprotéinases telles que la MMP-9, mais aussi les MMP-2, MMP-3 et MMP-13 [Ortega et Werb, 2002]. Deux séquences distinctes permettent à la tumstatine d'exercer à la fois une activité anti-angiogénique et anti-tumorale. L'activité anti-angiogénique réside essentiellement dans la séquence 54-132, nommée tum-5, plus précisément au niveau de la séquence 74-98, et son interaction RGD-indépendante avec l'intégrine $\alpha\beta_3$ [Maeshima et coll., 2001a]. *In vitro*, cette séquence exerce un effet inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales par un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 des cellules stimulées par VEGF et bFGF, et par une induction de l'apoptose *via* la stimulation de l'activité caspase 3 des cellules prolifératives. La tum-5 inhibe également la formation de pseudotubes *in vitro*. *In vivo*, la croissance tumorale est ralentie suite à l'injection de tum-5. Ce ralentissement est dû à l'activité anti-angiogénique du peptide qui induit l'apoptose des cellules endothéliales [Maeshima et coll., 2001a ; Maeshima et coll., 2001b ; Hamano et Kalluri, 2005].

Les séquences 185-203 et 179-208 ont aussi été décrites pour leur activité anti-angiogénique en inhibant la prolifération, la migration et en stimulant l'adhésion des cellules endothéliales. La tumstatine exerce également une activité anti-tumorale en inhibant la prolifération de diverses cellules cancéreuses telles que des cellules de mélanome, de fibrosarcome, de prostate ou de poumon. Cette activité anti-tumorale de la tumstatine réside dans la séquence 185-203 [Han et coll., 1997 ; Hamano et Kalluri, 2005]. Cette séquence, par son interaction avec l'intégrine $\alpha\beta_3$, augmente l'adhésion des cellules de mélanome et inhibe la prolifération et la migration de ces cellules. Cette région de la tumstatine module également l'activité protéolytique des cellules tumorales en inhibant notamment l'activation de la MMP-2, corrélée à une inhibition de l'expression de la MMP-14 et de l'intégrine $\alpha\beta_3$. Le système plasminogène-plasmine est

également touché puisque cette séquence de la tumstatine inhibe l'activité de l'activateur tPA et stimule l'expression de l'inhibiteur PAI-1 [Pasco et coll, 2000a ; Pasco et coll, 2000b ; Sudhakar et Boosani, 2008]. Au sein de cette séquence, les résidus CNYYSNS sont indispensables à l'activité biologique en particulier les résidus YSNS impliqués dans la formation d'un coude β [Floquet et coll., 2004]. La séquence 185-203 de la tumstatine, via le triplet SNS, empêche également l'activation de polynucléaires neutrophiles [Monboisse et coll., 1994].

I-3-5/ La pentastatine-1

Différents fragments dérivés du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 5(IV)$ ont été décrits comme potentiellement anti-angiogéniques, nommés pentastatine-1, pentastatine-2 et pentastatine-3 [Karagiannis et Popel, 2007]. La pentastatine-1, comprenant les résidus 1516-1535 de la chaîne $\alpha 5(IV)$, a été étudié plus précisément. En effet, cette séquence inhibe la prolifération de cellules tumorales et endothéliales par son interaction avec la sous-unité d'intégrine $\beta 1$. La pentastatine-1 possède une activité anti-angiogénique et anti-tumorale *in vivo* dans plusieurs modèles de xénogreffes [Koskimaki et coll., 2009 ; Koskimaki et coll., 2010].

I-3-6/ L'hexastatine

L'hexastatine correspond au domaine NC1 de la chaîne $\alpha 6$ du collagène IV de 25 kDa. Ce domaine est capable d'inhiber la prolifération de cellules endothéliales *in vitro* ainsi que la croissance tumorale *in vivo* dans deux modèles de cancers murins grâce à son activité anti-angiogénique [Mundel et coll., 2008].

I-3-7/ Le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4(IV)$

Bien que diverses régions de ce domaine ont été décrites comme potentiellement anti-angiogéniques, aucune activité anti-tumorale ou anti-angiogénique du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ n'a été démontrée jusqu'à aujourd'hui [Petitclerc et coll., 2000 ; Karagiannis et Popel, 2007]. En effet, dans un modèle de membrane chorioallantoïdienne, l'injection du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ est incapable d'inhiber l'angiogenèse induite par le bFGF. De même, aucune inhibition de la croissance tumorale *in vivo* n'a été montrée après l'injection du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ dans un modèle de mélanome de hamster [Petitclerc et coll., 2000]. Trois peptides dérivés du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$, la tétrastatine-1, la tétrastatine-2 et la tétrastatine-3, ont cependant été décrits pour leur capacité à inhiber la prolifération de cellules HUVECs ainsi que leur migration induite par le VEGF *in vitro* [Karagiannis

et Popel, 2007]. Par ailleurs, *in vitro*, des études préliminaires menées au sein de notre laboratoire ont montré une inhibition de la prolifération et de l'invasion des cellules de mélanome UACC 903 lors de la surexpression du domaine NC1 α 4(IV) complet ou du domaine NC1 α 4(IV) [180-229]. De surcroît, une inhibition de la croissance tumorale a été observée *in vivo*, dans un modèle de mélanome murin, après électrotransfert d'un plasmide permettant la surexpression du domaine NC1 α 4(IV) dans le muscle ischio-jambier des souris [Thevenard, 2007].

De nombreuses matrikines dérivées des collagènes de membrane basale, notamment des domaines NC1 du collagène de type IV, sont ainsi capables de réguler la croissance tumorale, et leurs analogues structuraux, susceptibles d'être utilisés comme agents anti-cancéreux.

But de l'étude

But de l'étude

Le mélanome est un cancer cutané à fort pouvoir invasif et dont l'incidence ne cesse d'augmenter. Il dérive de la prolifération anarchique d'un mélanocyte. La principale cause de cette prolifération est une dérégulation du cycle cellulaire. Au cours de la progression tumorale, outre ce phénomène, de nombreux processus interviennent tels que la néoangiogenèse tumorale qui permet la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants afin d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à la croissance tumorale. Ainsi, les cellules tumorales poursuivent leur prolifération non contrôlée. Au cours de l'invasion, les cellules tumorales, *via* diverses cascades protéolytiques, dégradent la matrice extracellulaire, ensemble complexe de macromolécules, afin de migrer au sein des tissus environnants ou de passer dans la circulation sanguine et développer ainsi des métastases. Par ailleurs, la protéolyse matricielle libère des fragments de macromolécules. Ces fragments peuvent posséder une activité biologique et ainsi réguler les processus impliqués dans la progression tumorale ; ces fragments sont alors qualifiés de matrikines ou matricryptines.

Parmi les matrikines, les domaines NC1 des différentes chaînes α du collagène IV ont été décrits pour leurs propriétés anti-tumorale et/ou anti-angiogénique. Cependant, aucune activité anti-tumorale n'a été décrite jusqu'à présent pour le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4(\text{IV})$ complet, bien que certains fragments issus de ce domaine possèdent une activité anti-angiogénique. Or, des études préliminaires menées au sein de notre laboratoire ont montré que ce domaine inhibe la prolifération et l'invasion de cellules de mélanome.

C'est pourquoi, l'objectif de ce travail est de caractériser les propriétés anti-tumorales du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ à la fois *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, deux stratégies ont été utilisées : d'une part, la surexpression de ce domaine par des cellules de mélanome humain UACC 903 et d'autre part, l'utilisation du domaine recombinant. La surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ nous a permis d'étudier l'effet anti-tumoral de ce domaine à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'effet du domaine recombinant a été étudié uniquement *in vitro*. L'utilisation de ce domaine recombinant nous a permis d'étudier un récepteur potentiel, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Enfin, nous avons identifié une séquence active du domaine de 50 acides aminés. L'identification d'une séquence minimale active permettrait à plus long terme de concevoir et de développer des analogues structuraux capables d'être utilisés comme agents anti-cancéreux.

II - Matériels Et Méthodes

II/ Matériels et Méthodes

II-1/ Matériels et réactifs utilisés

Matériel	Utilisation	Fournisseurs
Aiguilles	Injection souris	Sherwood
Appareil d'analyse d'images	Acquisition d'images	Vilber Lourmat
Appareil photo	Acquisition d'images	Canon
Capillaires LightCycler®	PCR en temps réel	Roche
Cellulose DE52 - papier absorbant	Western-blot (transfert)	Whatman
Centrifugeuse 5810 R	Centrifugation	Eppendorf
Centrifugeuse 5415 R	Centrifugation	Eppendorf
Centrifugeuse	Centrifugation	Beckman
Chambre de Boyden modifiée -Thincert™	Culture cellulaire	Greiner Bio-one
Compteur de cellules Countess	Culture cellulaire	Invitrogen
Concentrateurs de milieux - vivaspin	Concentration protéique	Sartorius
Concentrateurs de milieux - nanosep	Concentration protéique	Pall
Cuve Mini-PROTEAN II	Electrophorèse	Bio rad
FACS Calibur	Cytométrie en flux	BD Biosciences
Filtre à usage unique 0,2 µm	Filtration	D. Dutscher
Hotte à flux laminaire MS12	Culture cellulaire	Jouan
Hyperfilm ECL	Western-blot (révélation)	Amersham
Incubateur IGO 150	Culture cellulaire	Jouan
Lamelles de verre rondes - Ø 12 mm	Culture cellulaire	VWR
Lames de verre Superfrost®	Culture cellulaire	VWR
Lecteur de microplaques UVM 340	Spectrophotométrie	Asys
Logiciel d'analyse Bio1D	Traitement des données	Vilber Lourmat
Logiciel d'analyse Image J	Traitement des données	Wayne Rasband
Logiciel d'analyse Metamorph	Traitement des données	Molecular Devices
Logiciel d'analyse Mikrowin	Traitement des données	Mikrotek
Logiciel d'analyse RelQuant	Traitement des données	Roche
Membrane Immobilon-P™	Western-blot (transfert)	Millipore
Microscope inversé à fluorescence	Microscopie	Zeiss
Microscope confocal	Microscopie	Leica
Milieu de montage	Microscopie	Citifluor
pH-mètre	Préparations de solutions	Radiometer
Plaques de culture Nunclon delta	Culture cellulaire	D. Dutscher
Thermocycleur	PCR	Eppendorf
Thermocycleur LightCycler®	PCR en temps réel	Roche
Transblot	Western-blot (transfert)	Bio rad

Réactifs	Fournisseurs
Acétone	Prolabo
Acide acétique	Prolabo
Acide chlorhydrique	Prolabo
Acide Trichloracétique	Prolabo
Acrylamide	Euromedex
Agarose	Euromedex
APS (persulfate d'ammonium)	Euromedex
BET (bromure d'ethidium)	Euromedex
Béta-mercaptoéthanol	Sigma-Aldrich
Bleu de Coomassie G250 et R250	Sigma-Aldrich
Bleu Trypan	Sigma-Aldrich
Biorad Protein Assay Kit	Biorad
Colorant violet cristal	Sigma-Aldrich
DEPC	Sigma-Aldrich
Désoxyribonucléotides triphosphates	Roche
DTT (dithiothréitol)	Merck
DMSO	Sigma-Aldrich
Matrigel®	BD Biosciences
EDTA (Acide éthylène-diamino-tétraacétique)	Sigma-Aldrich
EGTA (Ethylène glycol-bis(béta-aminoéthyl éther)-tétraacétate) acid)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Prolabo
Gélatine	Sigma-Aldrich
Généticine (G-418)	Invitrogen
Glycérol	Sigma-Aldrich
Glycine	Euromedex
Glutaraldéhyde	Sigma-Aldrich
HEPES	Euromedex
Hemalun de Mayer	Merck
Hexanucléotides	Invitrogen
Hydroxyurée	Sigma-Aldrich
Iodure de propidium	Sigma-Aldrich

Réactifs	Fournisseurs
Isopropanol	Prolabo
KCl	Merck
Kit ECL +	Amersham
Blotto	Bio rad
Méthanol	Prolabo
MgCl ₂	Merck
NaCl	Euromedex
NaOH	Prolabo
Na ₃ VO ₄ (orthovanadate de sodium)	Sigma-Aldrich
NEM (N-Ethyl-Maléimide)	Sigma-Aldrich
Nonidet NP40	Euromedex
Plasmide p3XFlag-CMV TM -9	Sigma-Aldrich
Milieus de culture: DMEM-F12	Invitrogen
Plasminogène	Calbiochem
PMSF (Phenylméthylsulfonylfluorure)	Sigma-Aldrich
Pro MMP-2 (activité spécifique > 600 mU/mg)	Calbiochem
Pro MMP-9 (activité spécifique > 1000 mU/mg)	Calbiochem
Résine Ni-NTA	QiAgen
SAB (sérum albumine bovine)	Euromedex
SDS (Sodium Dodécyl sulfate)	Euromedex
SVF (sérum de veau fœtal)	Invitrogen
Souris athymiques	Harlan
Standard de masse moléculaire d'ADN	Sigma-Aldrich
Standard de masse moléculaire de protéines	Invitrogen
SYBR® Premix Ex Taq TM	Takara Bio Inc.
Taq Polymérase	Invitrogen
TEMED (tétraméthyl-éthylène-diamine)	Sigma- Aldrich
Transcriptase inverse	Invitrogen
Tri-reagent	Euromedex
Tris (tris-(hydroxyméthyl))-aminométhane	Euromedex
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsine-EDTA	Invitrogen
Tween-20	Sigma-Aldrich
W-1	Invitrogen

Réactifs	Fournisseurs
Anticorps primaires	
Ac anti- α v intégrine	Cell signaling
Ac anti- β 3 intégrine	Santa Cruz Biotechnology
Ac anti- α v β 3 (23C6)	Santa Cruz Biotechnology
Ac anti- α v β 3 (23C6) couplé à l'Alexa Fluor 647	Santa Cruz Biotechnology
Ac anti-actine (i-19)	Santa Cruz Biotechnology
Ac anti- β 1 (6S6)	Chemicon (Millipore)
Ac anti-Flag SIG1-25	Sigma-Aldrich
Ac anti-Flag M2	Sigma-Aldrich
Ac anti-Ki67	Epitomics
Ac anti-MMP-14	Chemicon (Millipore)
Ac anti-cavéoline-1	Cell signaling
Ac anti-phospho-pRb	Calbiochem
Ac anti-pRb	Calbiochem
Ac anti-cycline D1	Santa Cruz Biotechnology
Ac anti-Von Willibrand Factor	Chemicon (Millipore)
Ac anti-NC1 α 4(IV)	Covalab
Ac anti-collagène I (L-19)	Santa Cruz Biotechnology
Ac anti-6His	Genescript
Anticorps secondaires	
Ac anti-IgG de chèvre/mouton lié à la peroxydase	Sigma-Aldrich
Ac anti-IgG de lapin lié à la peroxydase	Amersham
Ac anti-IgG de souris lié à la peroxydase	Amersham
Ac anti-IgG de souris Alexa 488	Molecular Probes (Invitrogen)
Ac anti-IgG de lapin Alexa 488	Molecular Probes (Invitrogen)

II-2/ Culture cellulaire

II-2-1/ Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées durant cette étude.

Les cellules A 375 (ATCC CRL-1619) sont des cellules de mélanome humain hautement métastatique, adhérentes, à morphologie épithéliale.

Les cellules HT-144 (ATCC HTB-63) sont des cellules de mélanome humain hautement métastatique, adhérentes, à morphologie fibroblastique.

Les cellules SK-Mel-28 (ATCC HTB-72) sont des cellules de mélanome humain hautement métastatique, adhérentes, à morphologie polygonale.

Les cellules UACC 903 (Dr. J. Trent, Phoenix, Arizona) sont des cellules de mélanome humain hautement métastatique, adhérentes, à morphologie polygonale.

II-2-2/ Conditions de culture

Les cellules A375 sont cultivées en milieu DMEM contenant 4,5 g/L de glucose supplémenté par 10 % de SVF. Les cellules UACC 903 sont cultivées en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose supplémenté par 5% de SVF et, lors de transfection par le plasmide p3x-FLAG-CMV-9, de 700 µg/mL de l'agent de sélection, la généticine G418. Les cellules HT-144 et SK-Mel-28 sont cultivées en milieu DMEM/F-12 supplémenté par 10 % de SVF.

Les cellules sont conservées dans l'azote liquide dans leur milieu respectif contenant 20 % de SVF et 10 % de DMSO. Lors de la mise en culture des cellules, celles-ci sont décongelées rapidement à 37°C pendant 1 minute et ajoutées en flacon de culture de 25 cm² goutte à goutte dans 5 mL de milieu correspondant contenant deux fois plus de SVF que lors du maintien en culture. Les cellules sont incubées à 37°C sous atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Après 24 h d'incubation, le milieu de décongélation est remplacé par leur milieu respectif. Lorsque les cellules atteignent l'état de sub-confluence, elles subissent un passage : elles sont rincées avec de la PBS puis la trypsine-EDTA (0,5%) permet de détacher les cellules qui sont ensuite réensemencées. Les cellules subissent deux passages par semaine.

II-2-3/ Etude de la viabilité cellulaire – test au bleu trypan

Le bleu trypan est un colorant de haute masse moléculaire capable d'entrer rapidement dans les cellules lorsque l'intégrité de leur membrane est altérée. Le test au bleu trypan repose ainsi sur la capacité des cellules vivantes à exclure ce colorant contrairement aux cellules mortes. Ainsi, après comptage des cellules, le pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules mortes représente la viabilité cellulaire.

Pour estimer la viabilité cellulaire, les suspensions cellulaires sont incubées 5 minutes en présence d' ½ volume de bleu trypan 0,4 % (m/v). Les cellules vivantes et les cellules mortes sont comptées sur une cellule de comptage de Neubauer afin de calculer le pourcentage de viabilité.

II-3/ Peptides synthétiques utilisés

Différents peptides synthétiques ont été utilisés au cours de cette étude : les peptides AR-50 et CS-50, synthétisés par la société Proteogenix.

Le peptide AR-50 est un peptide de 50 résidus d'acides aminés, correspondant à la séquence 1628-1677 de la chaîne $\alpha 4(\text{IV})$ ou 167-216 du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$:

AAPFLECQGRQGTCHFFANKYSFWLTTVKADLQFSSAPAPDTLKESQAQR.

Ce peptide contient la séquence de la tétrastatine-3 [Karagiannis et Popel, 2007], soit la séquence 1628-1646 de la chaîne $\alpha 4(\text{IV})$ ou 167-185 du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$. Il s'agit d'un peptide de 19 acides aminés de séquence suivante : AAPFLECQGRQGTCHFFAN.

Le peptide CS-50 est un peptide de 50 acides aminés correspondant à la partie C-terminale 180-229 du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ ou 1641-1690 de la chaîne $\alpha 4(\text{IV})$:

CHFFANKYSFWLTTVKADLQFSSAPAPDTLKESQAQRQKISRCQVCVKYS.

II-4/ Production du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(\text{IV})$

II-4-1/ Production en système procaryote

La production du domaine recombinant 6His-NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ dans un système procaryote a été réalisée au sein du laboratoire. La séquence codant le domaine complet NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ humain a été amplifiée par PCR grâce au couple d'amorces suivant : 5'-TTTGGCCCTGGATACCTCGGT-3' et 5'-CGCATTCTCTAGCTATACTTC-3'. Une fois amplifiée, la séquence est insérée dans le plasmide pQE-31 puis l'orientation et la séquence de l'insert sont vérifiées par séquençage. Après transformation des bactéries *E. Coli* JM 109 et sélection par 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline, la production du domaine recombinant 6His-NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ est induite pendant 4 heures par l'ajout de 0,4 mM d'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation pendant 15 minutes à 4 000 g et le culot est resuspendu dans 5 mL de tampon contenant du NaH_2PO_4 50 mM, du NaCl 300 mM et de l'imidazole 10 mM, pH 8. Après un cycle de congélation et décongélation, la suspension est soumise à une sonication pendant 10 secondes à amplitude 12 puis à une centrifugation à 10 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Le surnageant (4 mL) est alors incubé pendant 1h avec 1 mL de résine Ni-NTA sous agitation douce. Le mélange résine-surnageant est soumis à une colonne de chromatographie d'affinité, puis, après lavage avec 4 mL de tampon de lavage (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM et imidazole 20 mM, pH 8), la protéine est éluée par l'ajout successif de 3 fois 0,5 mL de solution d'éluion contenant du NaH_2PO_4 50 mM, du NaCl

300 mM et de l'imidazole 250 mM, pH 8. Après dialyse, la pureté de la protéine est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide – SDS (SDS-PAGE) et western-blot.

II-4-2/ Surexpression de la protéine recombinante 3xFLAG-NC1 α 4(IV) par les cellules UACC 903

Les cellules UACC 903 ont été transfectées au sein de notre laboratoire grâce à la lipofectamine avec le plasmide p3x-FLAG-CMV-9 contenant ou non la séquence codant le domaine complet NC1 α 4(IV) [1-229] ou le domaine NC1 α 4(IV) [180-229]. La séquence codant la partie C-terminale du domaine NC1 α 4(IV) a été amplifiée grâce au couple d'amorces suivant : 5'-CAGGGAAGCTTGCCACTTT-3' et 5'-CGCATTCTCTAGCTATACTTC-3' et clonée dans le plasmide p3x-FLAG-CMV-9 comme décrit précédemment. Les clones ont été sélectionnés en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5 % de SVF et 700 μ g/mL de généticine G418. La surexpression ou non de la protéine recombinante 3xFLAG-NC1 α 4(IV) [1-229] ou 3xFLAG-NC1 α 4(IV) [180-229] est vérifiée pour chaque clone par RT-PCR et sa sécrétion dans le milieu de culture, par électrophorèse SDS-PAGE et western-blot.

II-5/ Etude de l'effet anti-tumoral de la surexpression du domaine NC1 α 4(IV) *in vivo*

II-5-1/ Modèle expérimental

Pour étudier l'effet du domaine NC1 α 4(IV) *in vivo*, nous avons réalisé un modèle de xéno greffe de mélanome humain chez la souris athymique. Les souris athymiques utilisées sont des souris femelles âgées de 6 semaines dont le poids corporel moyen est compris entre 18 et 20 g. Les souris sont élevées dans l'animalerie de l'IFR 53 de Reims, en cage individuelle, dans une pièce à température et humidité constante, et alimentées en nourriture et en eau *ad libitum*. Avant de commencer l'étude, toutes les souris sont acclimatées durant une semaine.

Pour réaliser ce modèle de xéno greffes, les cellules UACC 903 transfectées par le plasmide p3x-FLAG-CMV-9 surexprimant ou non le domaine NC1 α 4(IV) sont multipliées en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5% de SVF jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont rincées avec de la PBS et détachées par l'ajout de trypsine-EDTA. Les cellules sont lavées avec de la PBS et reprises dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose avant d'être injectées en sous-cutané dans le flanc gauche de l'animal. Le volume injecté par souris athymique est de 150 μ L d'une suspension

cellulaire de 5.10^6 cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine recombinant 3xFLAG-NC1 $\alpha 4(IV)$.

II-5-2/ Mesure des tumeurs

Une dizaine de jours après l'injection, une tumeur apparait. L'évolution de la taille des tumeurs est suivie jusqu'à 26 jours après l'injection des cellules. Elles sont mesurées à J 10, J 14, J 19 et J 26. Le volume tumoral est calculé grâce à la formule suivante : $(L/2) \times l^2$, où L représente la plus grande longueur de la tumeur et l représente la longueur la plus petite.

II-6/ Prolifération cellulaire

Après culture jusqu'à 80 % de confluence, les cellules UACC 903 sont lavées par de la PBS puis sont décollées par l'ajout de trypsine-EDTA. Le culot cellulaire est ensuite repris par du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 10 % de SVF. Après comptage, les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits à hauteur de 6500 cellules par puits. Les cellules sont incubées une heure à 37°C afin de permettre l'adhésion. Les cellules sont incubées en présence des effecteurs pendant 24 h, 48 h et 72 h. Les cellules sont alors lavées avec de la PBS, puis fixées avec de la glutaraldéhyde 1,1 % (v/v) pendant 20 minutes. Une fois fixées, les cellules sont rincées abondamment avec de l'eau distillée et colorées avec une solution de cristal violet 0,1% (m/v) en tampon Hepes 0,2 M, pH 6, pendant 20 minutes. Après lavages à l'eau distillée, l'élution du cristal violet se fait par ajout de 100 μ L d'acide acétique 10 %. L'absorbance est mesurée à 560 nm à l'aide du lecteur de plaque Asys HiTech UVM-340 et du logiciel Mikrowin 2000 (version 4.02).

II-7/ Etude du cycle cellulaire

L'étude du cycle cellulaire a été réalisée en collaboration avec le Dr Marie-Lise Jourdan de l'unité INSERM U921 à la Faculté de Médecine de Tours.

II-7-1/ Synchronisation des cellules

Pour des conditions optimales d'analyse, les cellules doivent être synchronisées, c'est-à-dire qu'elles doivent toutes se trouver dans la même phase du cycle cellulaire au début de l'expérience.

Les cellules UACC 903 sont cultivées en flacon de culture de 75 cm² jusqu'à 80 % de confluence en milieu DMEM 4,5 g/L glucose contenant 5 % de SVF. Elles sont ensuite rincées avec de la PBS et privées de SVF pendant 36 h conduisant à un ralentissement de leur croissance. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 h en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5 % de SVF et de l'hydroxyurée 2 mM permettant ainsi aux cellules de reprendre leur cycle cellulaire et de stopper en phase G1. Les cellules s'accumulent ainsi en phase G1.

II-7-2/ Cinétique du cycle cellulaire

Après synchronisation, les cellules sont rincées deux fois avec de la PBS avant d'être détachées par l'ajout de trypsine-EDTA. Les cellules sont alorsensemencées en flacons de culture de 75 cm² à raison de 20 000 cellules / cm² dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5 % de SVF avec ou sans protéine recombinante 3xFLAG-NC1 α 4(IV) (15 μ g/mL). Les cellules sont ensuite récupérées à différents temps pour réaliser une cinétique. Ainsi, après le temps d'incubation voulu, les cellules sont rincées avec de la PBS et détachées par l'ajout de trypsine-EDTA. Après trois lavages avec de la PBS contenant de l'EDTA 5 mM afin de bien séparer les cellules les unes des autres, les cellules sont comptées et resuspendues à raison de 1.10⁶ cellules dans 300 μ L de PBS contenant de l'EDTA 5 mM. Elles sont fixées par l'ajout sous vortex de 700 μ L d'éthanol 100 % goutte à goutte.

II-7-3/ Marquage à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques, il est utilisé afin de marquer l'ADN mais peut également se lier à l'ARN. En marquant l'ADN présent dans les cellules, il est possible de déterminer le pourcentage de cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire après une analyse par cytométrie de flux. En effet, la phase S permet la duplication de l'ADN et de ce fait, les cellules en phase G2 ont deux fois plus de molécules d'ADN que les cellules en phase G1 tandis que les cellules en phase S auront une quantité d'ADN intermédiaire.

Pour réaliser ce marquage, une fois les cellules fixées, elles sont centrifugées à 800 g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 500 μ L de PBS contenant de l'EDTA 5

mM. 5 μ L de RNase A (1 mg/mL) sont ajoutés à la suspension cellulaire et l'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes afin d'éviter tout marquage aspécifique de l'ARN. Afin de marquer les cellules, 500 μ L d'une solution de PBS contenant 50 μ g/mL d'iodure de propidium sont ajoutés. Le marquage des cellules est analysé en cytométrie en flux.

II-8/ Migration cellulaire

Pour étudier la migration cellulaire, les inserts ThinCert™ (membrane de PolyEthylene Terephthalate, pores de 8 μ m) sont utilisés. Les cellules, placées dans le compartiment supérieur avec ou sans effecteurs, sont soumises à un gradient de SAB agissant comme chimio-attractant. Les cellules ayant une capacité migratoire seront donc capables de migrer vers le compartiment inférieur en passant à travers les pores de 0,8 μ m présents dans la membrane des inserts ThinCert™.

Après culture jusqu'à 80 % de confluence, les cellules sont lavées avec de la PBS puis sont décollées par ajout de trypsine-EDTA. Le culot cellulaire est repris par du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 0,2 % de SAB puis 50 000 cellules sontensemencées dans le compartiment supérieur de l'insert. Après incubation des cellules pendant 30 minutes pour permettre l'adhésion des cellules, les effecteurs sont ajoutés dans du milieu DMEM 4,5 g/L glucose contenant 0,2 % de SAB dans le compartiment supérieur. Du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 2 % de BSA et 10 % de SVF est ajouté dans le compartiment inférieur. Les cellules sont alors incubées pendant 24 h afin de permettre l'invasion des cellules à travers les pores de la membrane des inserts Thincert™. Après 24 h, le milieu est éliminé, les deux compartiments sont rincés 2 fois avec de la PBS et les cellules sont fixées par incubation pendant 20 minutes avec 800 μ L de méthanol ajouté dans le compartiment inférieur et 200 μ L de méthanol ajouté dans le compartiment supérieur. Le méthanol est éliminé et les inserts sont rincés abondamment avec de l'eau distillée. Puis une coloration des cellules au cristal violet est effectuée. Après lavage, les cellules présentes dans le compartiment supérieur sont éliminées par grattage à l'aide d'un coton-tige et les cellules ayant migré sont comptées à raison de quatre champs par insert.

II-9/ Invasion cellulaire

Pour étudier l'invasion cellulaire, les inserts Thincert™ sont également utilisés. Le compartiment supérieur est recouvert de Matrigel® après deux dépôts successifs de 100 μ L d'une solution de Matrigel® à 50 μ g/mL. Le Matrigel®, mélange de protéines sécrétées par les cellules murines de tumeur EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), permet de mimer la matrice extracellulaire. Les

cellules invasives seront donc capables de dégrader le Matrigel[®] et de migrer à travers les pores de la membrane.

Avant ensemencement des cellules, le Matrigel[®] est réhydraté par ajout de 100 μ L de milieu pendant 30 minutes avant d'être éliminé. Les conditions de culture pour l'étude de l'invasion sont identiques à celles décrites précédemment lors de l'étude de la migration, mis à part le temps d'incubation qui est de 72 h au lieu de 24 h. Après l'ajout des effecteurs, les cellules sont ainsi incubées pendant 72 h afin de permettre l'invasion des cellules à travers le Matrigel[®] et des pores de 0,8 μ m de la membrane des inserts Thincert[™]. Après 72h, le milieu est éliminé et deux lavages avec de la PBS sont effectués. Les cellules sont fixées comme décrit précédemment par incubation pendant 20 minutes avec du méthanol. Une coloration des cellules au cristal violet est effectuée, les cellules présentes dans le compartiment supérieur sont éliminées à l'aide d'un coton-tige et les cellules invasives sont comptées à raison de quatre champs par insert.

II-10/ Etude biochimique

II-10-1/ Préparation des échantillons

II-10-1-1/ Préparation d'extraits protéiques totaux

Les cellules sont cultivées en flacon de culture de 25 cm² dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5 % de SVF jusqu'à 70 % de confluence avant d'être privées de SVF pendant 48 h. Les cellules sont rincées 3 fois avec de la PBS puis sont récupérées par grattage dans 200 μ L de tampon de lyse. La composition du tampon de lyse est la suivante : Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, PMSF 5 mM, Triton X-100 1 % (v/v) et glycérol 10 % (v/v), pH 7,6. Pour permettre une lyse efficace des cellules, celles-ci sont incubées dans le tampon de lyse pendant 30 minutes à 4°C en les vortexant toutes les 5 minutes. Une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C permet d'éliminer la fraction insoluble. Le surnageant est récupéré et du NEM 6 mM et du SDS 2 % sont ajoutés.

II-10-1-2/ Préparation d'extraits protéiques nucléaires

Les cellules sont cultivées en flacon de culture de 75 cm² jusqu'à 70 % de confluence dans du milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5% de SVF puis sont privées de SVF pendant 36h. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 h en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5 % de

SVF et d'hydroxyurée 2 mM. Elles sont alors décollées par ajout de trypsine-EDTA et réensemencées dans des flacons de culture de 75 cm² à raison de 20 000 cellules / cm² en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5 % de SVF avec ou sans protéine recombinante 6His-NC1 α 4(IV) (15 μ g/mL). Après 20 h d'incubation, les cellules sont rincées 3 fois avec de la PBS et 400 μ L de tampon de lyse A (Hepes 10 mM, pH 7,8, KCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,1 mM, Na₃VO₄ 0,2 mM, NaF 0,2 mM, PMSF 0,4 mM) sont ajoutés sur la couche cellulaire. Le lysat cellulaire est récupéré par grattage et incubé 15 minutes à 4°C. 25 μ L de tampon B (Nonidet-P40 10% (v/v)) sont ajoutés et le lysat est mélangé pendant 15 secondes. Il est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 30 secondes à 4 °C. Le surnageant est récupéré et correspond à la fraction cytosolique. Le culot est repris par 50 μ L de tampon de lyse C (Hepes 50 mM, pH 7,8, NaCl 300mM, KCl 50 mM, EDTA 0,4mM, Na₃VO₄ 0,2 mM, NaF 0,2 mM, PMSF 0,8 mM, Glycérol 10 % (v/v)) et incubé 20 minutes à 4°C en agitant toutes les 5 minutes. Il est ensuite centrifugé à 14 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants, correspondant à la fraction nucléaire, sont récupérés et conservés à -80°C avant d'être analysés.

II-10-1-3/ Préparation d'extraits protéiques à partir des tumeurs

Après sacrifice des souris, les tumeurs sont prélevées et conservées à -80°C. Les tumeurs congelées sont ensuite découper en petits fragments à l'aide d'un scalpel et transférer dans un potter avec 500 μ L de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, SDS 0,1 %, NaN₃ 0,02 %, PMSF 1 mM, EDTA 5 mM, Iodoacétamine 1 mM). Le tissu est ensuite écrasé à l'aide du piston. Le piston est rincé avec 250 μ L de tampon afin de récupérer un maximum de tissu. L'extrait est vortexé et transféré dans un microtube. Le potter est rincé avec 250 μ L de tampon qui sont transférés dans le microtube. L'extrait est soumis à une sonication pendant environ 10 secondes à amplitude 12 puis incubé à 4 °C sous agitation douce pendant une nuit. Le lendemain, les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant est récupéré et conservé à -20°C.

II-10-2/ Zymographie

La technique de zymographie est une technique d'électrophorèse permettant la mise en évidence de l'activité des gélatinases en incorporant leur substrat, la gélatine, dans le gel de polyacrylamide avant polymérisation. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide – SDS permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Les gélatinases dégradent la gélatine localement et après coloration au bleu de coomassie G250, les plages de dégradation apparaissent

comme des bandes blanches sur fond bleu. La surface de ces plages est proportionnelle à l'intensité de dégradation et donc à la quantité de gélatinases.

Les échantillons sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 10 % contenant du SDS 0,1 % et de la gélatine 0,1 %. Après migration à ampérage constant de 10 mA et à 4°C, le gel subit 2 lavages de 30 minutes avec une solution de Triton X-100 à 2,5% (m/v) afin d'éliminer le SDS. Le SDS étant un agent dénaturant, les gélatinases ne peuvent exercer leur activité s'il n'est pas éliminé. Le gel est ensuite incubé à 37°C pendant 24 h dans un tampon d'incubation (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, Brij-35 0,02 % (m/v), pH 7,6) permettant l'activité optimale des gélatinases. Le gel est alors coloré avec une solution de bleu de coomassie G250 0,1% contenant 10% d'acide acétique et 40% de méthanol pendant 30 minutes, puis il est décoloré par une solution de décoloration contenant 10% d'acide acétique et 20% de méthanol. Le gel est ensuite photographié et analysé grâce au logiciel de quantification Bio1D (Vilbert-Lourmat).

II-10-3/ Zymographie reverse

La technique de zymographie reverse dérive de la zymographie. Lors de la zymographie reverse, le gel de polyacrylamide contient de la gélatine mais également de la proMMP-2 capable de dégrader la gélatine. Lors de l'incubation, la proMMP-2 va dégrader la gélatine contenue dans le gel et les inhibiteurs des MMPs, les TIMPs, vont empêcher localement cette dégradation. Après coloration, seules les plages non digérées apparaîtront colorées en bleu sur un fond blanc, reflétant ainsi la quantité de TIMPs.

Lors d'une zymographie reverse, les conditions sont les mêmes que lors de la zymographie exceptée l'électrophorèse qui s'effectue en gel de polyacrylamide 15 % contenant du SDS 0,1 %, de la gélatine 0,1% et 200 ng de proMMP-2.

II-10-4/ Zymographie plasminogène

La technique de zymographie plasminogène permet d'étudier l'activité des activateurs du plasminogène tPA et uPA. Le principe est le même que lors de la zymographie. Cependant, du plasminogène est incorporé au gel de polyacrylamide contenant de la gélatine.

Ainsi, lors de la zymographie-plasminogène, l'électrophorèse s'effectue en gel de polyacrylamide 10 % contenant du SDS 0,1%, de la gélatine 0,1% et 0,25 U de plasminogène. De plus, le tampon d'incubation optimal pour l'activité des activateurs du plasminogène est un tampon contenant de la glycine 100 mM et de l'EDTA 5 mM, pH 8.

II-10-5/ Western-blot

II-10-5-1/ Electrophorèse en conditions dénaturantes

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Un pourcentage de polyacrylamide élevé sera ainsi utilisé pour séparer les protéines de faibles masses moléculaires alors qu'un pourcentage de polyacrylamide faible sera utilisé pour séparer les protéines de plus grandes masses moléculaires.

Les échantillons sont repris dans du tampon échantillon contenant 3 % de β -mercaptoéthanol permettant ainsi leur dénaturation après chauffage à 90°C pendant 3 minutes. Ils sont ensuite soumis à une migration en gel de polyacrylamide-SDS à 100 V dans du tampon de migration (Tris 25 mM pH 8,3, SDS 0,1 % (m/v), glycine 192 mM).

II-10-5-2/ Transfert

Les protéines ayant migré après l'électrophorèse sont ensuite transférées sur une membrane PVDF.

Après migration, le gel est équilibré 15 minutes dans du tampon de transfert et la membrane PVDF est activée par incubation 15 secondes dans du méthanol puis équilibrée également dans du tampon de transfert. Les protéines, chargées négativement, sont alors transférées du gel vers la membrane grâce à l'application d'un champ électrique lors du transfert humide où la membrane et le gel sont totalement immergés dans du tampon de transfert (Tris 48 mM pH 8,2, glycine 39 mM, méthanol 20 % (v/v)). L'électrotransfert s'effectue dans une cuve de transfert à 100 V pendant 1 h. Après transfert, la membrane est rincée avec de l'eau distillée avant de subir l'étape de saturation.

II-10-5-3/ Immunodétection

La membrane est ensuite saturée par incubation pendant 2h à température ambiante avec une solution de TBS-T (Tris HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM – 0,1 % de Tween-20) contenant du Blotto 5% sous agitation douce. Puis la solution de saturation est éliminée et la membrane est rincée avec du TBS-T avant d'être incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T contenant du Blotto 1% sous agitation douce. La membrane subit une série de lavages sous agitation de 2 fois 10 minutes et 2 fois 5 minutes avec du TBS-T puis est incubée pendant 1h avec l'anticorps secondaire dilué au 1/10 000^{ème} dans du TBS-T contenant du Blotto 1% sous agitation douce. Une

seconde série de lavages permettant d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire est réalisée comme suit : 3 fois 10 minutes puis 2 fois 5 minutes avec du TBS-T suivis par 2 lavages de 5 minutes avec du TBS. L'immunorévélation des protéines d'intérêt se fait grâce au kit de chimioluminescence ECL+. Le temps d'exposition varie en fonction des anticorps et de la quantité de protéines déposées.

II-11/ Immunocytochimie

II-11-1/ Conditions de culture

Des lamelles de verre stériles sont déposées dans les puits d'une plaque 24 puits. Les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ sont cultivées jusqu'à 80 % de confluence avant d'être détachées par ajout de trypsine-EDTA. Elles sont réensemencées sur les lamelles de verre à raison de 20 000 cellules par puits en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 10 % de SVF et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules sont rincées trois fois avec de la PBS et fixées par incubation pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde 4 %.

II-11-2/ Immunomarquages

Les lamelles sont rincées 2 fois avec de la PBS puis saturées par incubation pendant 30 minutes avec une solution de PBS contenant 2 % de SAB. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire anti-MMP-14 et/ou anti-cavéoline-1 dilué au 1/100^{ème} dans la PBS contenant 2 % de SAB une nuit à 4°C. Les cellules sont lavées 5 fois avec de la PBS puis incubées pendant 1h avec l'anticorps secondaire couplé soit à l'Alexa Fluor 488 ou à l'Alexa Fluor 568 et dilué au 1/1 000^{ème} dans de la PBS contenant 2 % de SAB. Les cellules sont ensuite lavées 5 fois avec de la PBS et les noyaux sont contre-colorés avec du DAPI contenu dans le milieu de montage. Des lamelles ont été préparées sans l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire comme témoins négatifs.

II-12/ Immunohistochimie

II-12-1/ Réalisation des coupes des tumeurs

Après sacrifice des souris, les tumeurs sont prélevées et disposées sur un support à l'aide de gomme adragante. Elles sont ensuite plongées dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide

afin de les cryofixer. Les tumeurs cryofixées sont récupérées et conservées à -80°C . Des coupes de $0,5\ \mu\text{m}$ sont réalisées à l'aide d'un cryostat et déposées sur lames superfrost.

II-12-2/ Immunomarquages

La zone de marquage est délimitée autour des coupes à l'aide d'un marqueur gras. Les coupes sont rincées 2 fois avec de la PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde 4 % incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Lorsque le marquage est intracellulaire, une perméabilisation des cellules est nécessaire et réalisée par incubation pendant 5 minutes avec une solution de Triton X-100 0,1 % après 2 lavages de 5 minutes avec de la PBS. Puis les coupes fixées, et le cas échéant, perméabilisées, sont lavées par deux lavages de 5 minutes avec de la PBS, avant de saturer les sites aspécifiques avec une solution de PBS contenant 3 % de SAB pendant 30 minutes à température ambiante. Les anticorps primaires sont dilués au $1/100^{\text{ème}}$ dans une solution PBS contenant 2 % SAB, avant d'être ajoutés sur les coupes et incubés en chambre humide une nuit à 4°C . Le lendemain, les lames sont rincées avec de la PBS puis 4 lavages de 5 minutes avec de la PBS sont réalisés. L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa fluor 488 est dilué au $1/200^{\text{ème}}$ dans de la PBS et incubé 2 h à température ambiante. Les coupes subissent alors 5 lavages de 5 minutes avec de la PBS afin d'éliminer l'excès d'anticorps. En parallèle, des coupes ont été traitées de la même façon en omettant l'étape d'incubation avec l'anticorps primaire afin de constituer un témoin négatif.

Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'hémalum de Mayer. Pour cela, une goutte de colorant est répartie sur la coupe pendant une dizaine de secondes puis la coupe est rincée plusieurs fois avec de la PBS. Le montage entre lame et lamelle se fait avec une goutte de citifluor, milieu de montage permettant de préserver la fluorescence, déposée sur les coupes de tumeur. Les coupes sont observées à l'aide du microscope inversé Axiovert 200 (Zeiss, Obercohen, Germany) et les images acquises avec le logiciel Métamorph puis analysées par quantification du nombre de pixels correspondant au marquage par rapport au nombre de pixels total de l'image à l'aide du logiciel Image J.

II-13/ Analyse en PCR quantitative

II-13-1/ Extraction d'ARN

Les cellules UACC 903 sont cultivées en flacons de culture de $25\ \text{cm}^2$ jusqu'à 70 % de confluence puis privées de SVF pendant 48 h. Les cellules sont alors rincées 2 fois avec de la PBS.

L'extraction d'ARN a été réalisée à l'aide du kit Qiagen RNeasy de la façon suivante. 350 µL de tampon RLT+ contenant du β-mercaptoéthanol (10 µL de β-mercaptoéthanol pour 1 mL de tampon RLT+) sont ajoutés sur le tapis cellulaire. Les cellules sont récupérées par grattage et le lysat est ajouté sur une colonne gDNA eliminator et centrifugé 1 minute à 10 621 g afin d'éliminer l'ADN. L'éluat est collecté et additionné de 350 µL d'éthanol 70 % dans l'eau DEPC. Le tout est homogénéisé, déposé sur colonne RNeasy puis centrifugée 1 minute à 10 621 g. L'éluat est éliminé et 700 µL de tampon RW1 sont ajoutés sur la colonne puis centrifugés 1 minute à 10 621 g. L'éluat est une nouvelle fois éliminé et 500 µL de tampon RPE contenant de l'éthanol sont ajoutés sur la colonne et centrifugés 1 minute à 10 621 g. L'éluat est éliminé et 500 µL de tampon RPE sont de nouveau ajoutés sur la colonne et centrifugés 3 minutes à 10 621 g. La colonne est ensuite transférée sur un tube « RNase free » et les ARN sont élués par ajout de 50 µL d'H₂O DEPC puis centrifugation 2 minutes à 10 621 g à 4°C. L'éluat est repris et placé de nouveau sur la colonne puis centrifugé 3 minutes à 10 621 g à 4°C afin de récupérer tous les ARN. Les ARN sont quantifiés et leur intégrité est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose avant de réaliser la transcription inverse.

II-13-2/ Transcription inverse

2 µg d'ARN sont préparés dans un volume total de 8 µL d'H₂O DEPC afin de les dénaturer par incubation 15 minutes à 65°C. Les ARN dénaturés sont ensuite conservés sur glace avant leur utilisation afin d'éviter toute renaturation. Dans un tube, sont successivement ajoutés :

- Tampon 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,3) : 4 µL
- MgCl₂ (50 mM) : 2 µL
- 4 dNTPs (2,5 mM) : 16 µL
- RNase Out (10 U) : 2 µL
- DTT (0,1 M) : 4 µL
- Random Hexamer : 2 µL
- Transcriptase inverse : 2 µL

Le mélange est homogénéisé et les 8 µL d'ARN dénaturés y sont ajoutés et homogénéisés. Le mélange est ensuite incubé 45 minutes à 42°C dans un thermocycleur et les ADNc résultant de la transcription inverse sont conservés à -20°C.

II-13-3/ PCR quantitative

Les ADNc obtenus sont ensuite soumis à une amplification spécifique du gène étudié grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Ainsi les amorces utilisées pour étudier la MMP-14 sont les suivantes : 5'-CGGGTGAGGAATAACCAAGT-3' et 3'-CCAGAAGAGAGCAGCATCAA-5'. Parallèlement, l'amplification d'un gène de contrôle d'expression constante dans les cellules, tel que le gène codant la β -actine, est effectuée afin de pouvoir comparer les échantillons. Les amorces utilisées pour la β -actine sont les suivantes : 5'-ATTCCTATGTGGGCGACGAG-3' and 3'-ATGGCTGGGGTGTGAAG-5'.

Pour réaliser l'amplification, sont ajoutés successivement dans un capillaire en verre :

- SyBrGreen master mix: 10 μ L
- Amorce sens (10 μ M) : 0,4 μ L
- Amorce anti-sens (10 μ M): 0,4 μ L
- H₂O DEPC : 5,2 μ L
- Milieu contenant les ADNc : 4 μ L

Les capillaires sont centrifugés et placés dans le thermocycleur Lightcycler (Roche) pour une amplification de 50 cycles. Chaque cycle est composé de différentes étapes : une première étape de 10 secondes pour le premier cycle puis de 3 secondes pour les cycles suivants à 95°C permettant la dénaturation de l'ADN, puis une étape d'hybridation de 15 secondes à 60°C permettant l'hybridation des amorces, et enfin, une étape d'élongation de 9 secondes à 72 °C. A chaque cycle, la fluorescence émise est mesurée à la fin de l'étape d'élongation. En parallèle, un calibrateur correspondant à différentes dilutions des milieux contenant l'ADNc est mis au point ainsi qu'un témoin négatif dans lequel l'ADNc est remplacé par de l'eau.

II-14/ Etude du récepteur

II-14-1/ Adhésion dépendante des cations divalents

Dans les puits d'une plaque 96 puits, 2 μ g de protéine recombinante solubilisée dans 100 μ L d'acide acétique 50 mM sont déposés et séchés une nuit stérilement. Avant ensemencement, 100 μ L de PBS par puits sont ajoutés afin de réhydrater la protéine. Les cellules UACC 903 sont cultivées en milieu DMEM 4,5 g/L glucose contenant 5 % SVF jusqu'à 80 % confluence. Les cellules sont alors rincées 3 fois par de la PBS puis décollées par ajout de PBS contenant de l'EDTA 1mM afin d'éviter

toute dégradation du récepteur potentiel. Après centrifugation à 800 g pendant 3 minutes, les cellules sont lavées 3 fois avec de la PBS puis incubées 20 minutes sous agitation douce avec de la PBS seule ou de la PBS contenant de l'EDTA 5 mM afin de chélater les cations divalents. Après centrifugation, les cellules sont reprises en milieu HBSS puis sont comptées et leur viabilité est vérifiée par un test au bleu trypan. Les cellules issues de l'incubation avec de la PBS seule et reprises en milieu HBSS sontensemencées à raison de 30 000 cellules par puits recouverts de protéine recombinante et incubées dans du milieu HBSS seul ou contenant du calcium 1,3 mM et/ou du magnésium 0,5 mM, tandis que les cellules issues de l'incubation avec l'EDTA sont incubées dans du milieu HBSS contenant de l'EDTA 5 mM. Après 30 minutes ou 1h d'incubation, les cellules sont rincées deux fois avec de la PBS et fixées par une solution de glutaraldéhyde 1,1% (v/v). Les cellules sont ensuite colorées au cristal violet, comme décrit précédemment, puis le cristal violet est élué par ajout de 100 µL d'acide acétique 10 % (v/v). La mesure de l'absorbance se fait à 560 nm.

II-14-2/ Adhésion en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou la sous-unité d'intégrine β_1

Les puits d'une plaque 96 puits sont recouverts avec 100 µL d'une solution d'acide acétique 50 mM contenant 2 µg de protéine recombinante. Avant ensemencement, la protéine est réhydratée avec de la PBS et les sites aspécifiques de la plaque sont bloqués par 100 µL d'une solution de SAB 1 % pendant une heure. Les cellules UACC 903 sont cultivées en milieu DMEM 4,5 g/L de glucose contenant 5 % SVF jusqu'à 80 % de confluence. Les cellules sont alors rincées 3 fois par de la PBS puis décollées par ajout de PBS contenant de l'EDTA 1mM. Après centrifugation à 800 g pendant 3 minutes, les cellules sont lavées 3 fois avec de la PBS puis reprises en milieu HBSS contenant du calcium 1,3 mM et du magnésium 0,5 mM. Les cellules sont incubées en présence ou non de 25 µg/mL d'anticorps anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ (clone 23C6, Santacruz Biotechnology) ou d'anticorps anti-intégrine β_1 (clone 6S6, Millipore) pendant 30 minutes à 37°C sous agitation douce. 30 000 cellules par puits sontensemencées et incubées pendant 1h avant d'être rincées et fixées avec de la glutaraldéhyde 1,1 % (v/v). Les cellules sont ensuite colorées au cristal violet et, après élution avec de l'acide acétique 10 % (v/v), la mesure de l'absorbance se fait à 560 nm.

II-14-3/ Interaction de la protéine recombinante avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou l'intégrine $\alpha_5\beta_1$

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Pr Sylvie Ricard-Blum de l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086, Université Lyon 1. L'interaction de la protéine recombinante 6His-NC1 α_4 (IV) avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est étudiée par résonance plasmonique de surface grâce au BIAcore T 100 de l'UMS 344 (Lyon). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, de même que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, est immobilisée par ses groupements amines primaires sur une puce sensor chip CM5 selon le protocole mis au point par Faye et coll., 2009. Le niveau d'immobilisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est compris entre 1341 et 2655 unités de résonance et est de 15 450 unités de résonance pour l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. Les tests de liaison sont réalisés à 25°C dans un tampon de course Hepes 10 mM, pH 7,4, contenant du NaCl 150 mM, du MgCl₂ 1 mM, du MnCl₂ 2 mM et du β -octyl-D-glucopyranoside 50 mM. La protéine recombinante 6His-NC1 α_4 (IV) est injectée à différentes concentrations (0,36 μ M, 0,45 μ M, 0,9 μ M, 1,8 μ M et 3,6 μ M) et différents débits sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_5\beta_1$ immobilisée. La surface est régénérée par l'ajout rapide (60 secondes) d'EDTA 10 mM. Les constantes d'association et de dissociation sont analysées simultanément grâce au logiciel d'évaluation Biacore T100 version 2.0.3.

II-14-4/ Marquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules

Les cellules sont détachées par l'ajout de PBS contenant de l'EDTA 1 mM, centrifugées à 800 g pendant 5 minutes puis 3 lavages avec du milieu DMEM sont réalisés. Les cellules sont reprises en milieu DMEM, comptées et 500 000 cellules par conditions sont transférées dans 500 μ L de milieu DMEM en tubes « low binding ». La suspension cellulaire est centrifugée 3 fois 5 secondes à 6 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire, repris soit par 100 μ L de PBS, soit par 0,5 μ g/100 μ L d'anticorps anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 647, est incubé pendant 30 minutes sur glace. 500 μ L de PBS sont ajoutés et la suspension est centrifugée 3 fois 5 secondes à 6 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par 500 μ L de paraformaldéhyde (PFA) 1%. En parallèle, le culot cellulaire, issu d'une incubation de 30 minutes avec de la PBS, est repris par 350 μ L de PFA 1% puis, avant l'analyse par cytométrie en flux, 140 μ L de PBS et 10 μ L d'iodure de propidium à 50 μ g/mL sont ajoutés afin de vérifier la viabilité des cellules. Le marquage des cellules est analysé par cytométrie en flux sur FACS Calibur (BD Biosciences), en collaboration avec le Dr Richard Le Naour de l'IFR 53 de Reims.

II-15/ Analyses statistiques

Toutes les expériences fonctionnelles réalisées *in vitro* ont été effectuées en triplicate. Les données reflètent la moyenne de trois expériences différentes. L'analyse statistique pour ces études utilise un test t de Student. Les données sont considérées comme statistiquement significatives pour un $p < 0,05$.

Les données des études de résonance plasmonique représentent la moyenne de deux expériences et ont été analysées selon le paramètre du χ^2 . Les données sont considérés comme statistiquement significatives pour un χ^2 inférieur à 10.

Concernant l'étude *in vivo*, chaque condition comprend 10 souris et les expériences sont réalisées trois fois. Les volumes des tumeurs ont été analysés par le test non paramétrique *u*-test de Mann et Withney. Les données sont considérées comme statistiquement significatives pour un $p < 0,05$.

III - Résultats

III/ Résultats

L'effet anti-tumoral du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, que nous nommons tétrastatine, a été étudié à la fois *in vitro* et *in vivo*. Pour cette étude, nous avons utilisé deux approches : d'une part, la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ dans des cellules de mélanome et d'autre part, l'utilisation de la protéine recombinante 6His-NC1 $\alpha 4(\text{IV})$. L'effet de la surexpression de la tétrastatine a été étudié à la fois *in vitro* et *in vivo* tandis que la tétrastatine recombinante a été utilisée uniquement pour les expériences *in vitro*.

III-1/ Effet de la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ par les cellules de mélanome UACC 903 *in vitro*

III-1-1/ Mise en évidence de la sécrétion de la protéine 3xFLAG NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ par les cellules de mélanome

Afin d'étudier l'effet du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 4$ du collagène IV sur la croissance tumorale, les cellules UACC 903 ont été transfectées au sein de notre laboratoire. Après sélection clonale, les clones ont été caractérisés par RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques du plasmide p3xFLAG-CMV-9 de part et d'autre du multi-site de clonage. La caractérisation des clones par RT-PCR a été effectuée par le Dr Jessica Thevenard. Une bande de 195 pb apparaît dans les cellules Mock et correspond à l'amplification du plasmide sans l'insert. Dans les cellules surexprimant NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, une bande de 882 pb apparaît correspondant à l'amplification du plasmide contenant l'insert (Figure 21).

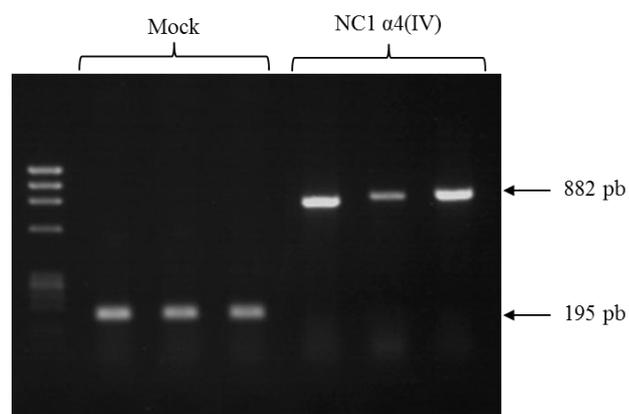


Figure 21: Caractérisation par PCR des clones UACC 903 transfectés par le plasmide p3xFLAG-CMV-9 contenant ou non la séquence codant le domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$

Après 48h de culture sans SVF, les milieux conditionnés de trois clones de cellules UACC 903, surexprimant ou non le domaine recombinant 3xFLAG-NC1 α 4(IV) de 28 kDa, sont précipités à l'aide d'acide trichloracétique 12 %. Les échantillons sont analysés par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-FLAG d'une part et d'un anticorps anti-NC1 α 4(IV) d'autre part. Après révélation, une bande d'environ 28 kDa apparaît dans les pistes correspondant aux milieux conditionnés des cellules surexprimant le domaine NC1 α 4(IV). La protéine est donc bien surexprimée par les cellules de mélanome et sécrétée dans les milieux de culture (Figure 22).

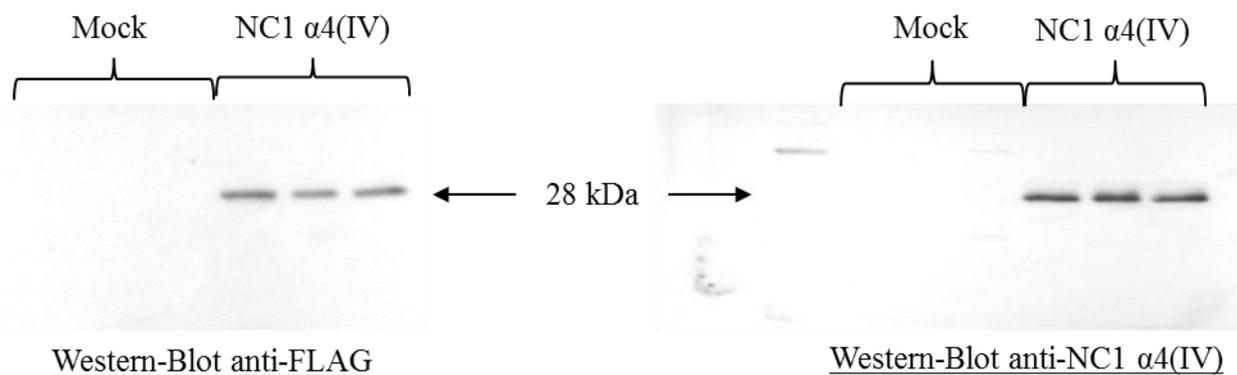


Figure 22 : Mise en évidence de la sécrétion du domaine NC1 α 4(IV) par les cellules de mélanome UACC 903

III-1-2/ Inhibition de la prolifération cellulaire

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la surexpression du domaine NC1 α 4(IV) sur la prolifération des cellules de mélanome UACC 903. La prolifération est étudiée sur les 3 clones sélectionnés transfectés par le plasmide p3xFLAG vide (ou Mock) et les 3 clones sélectionnés surexprimant le domaine NC1 α 4(IV) pendant 48h de culture en présence de 5% de SVF. Après 24h de culture, la prolifération des cellules UACC 903 surexprimant le domaine NC1 α 4(IV) est inhibée de 11% à 25% selon les clones puis, après 48h de culture, de 24% à 34% par rapport aux cellules Mock (Figure 23).

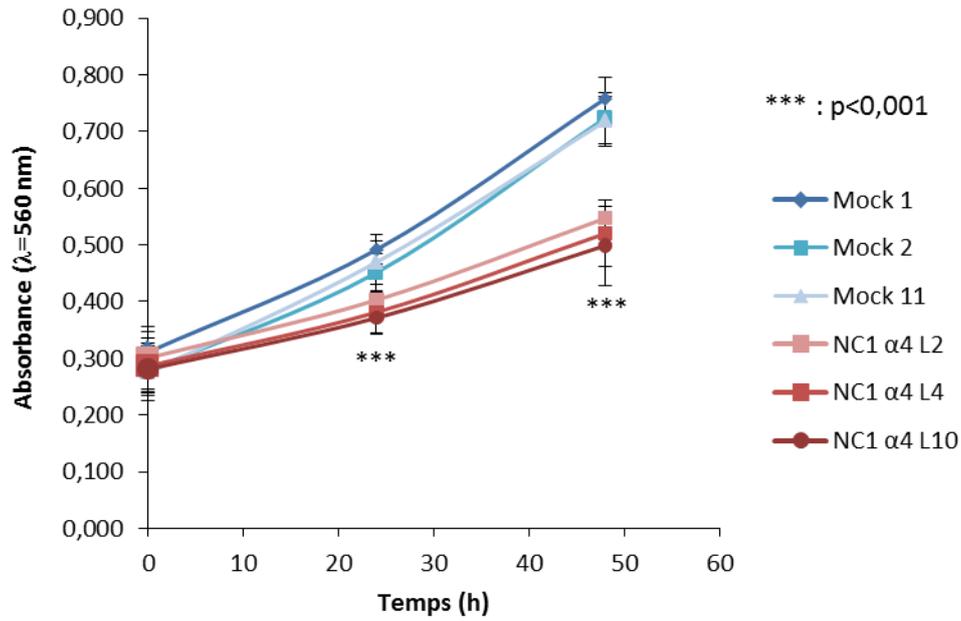


Figure 23 : Prolifération des clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ pendant 48h

En moyenne, la surexpression de la protéine recombinante entraîne une inhibition de la prolifération des cellules de mélanome UACC 903 de 18% et 30% après 24h et 48h de culture respectivement (Figure 24).

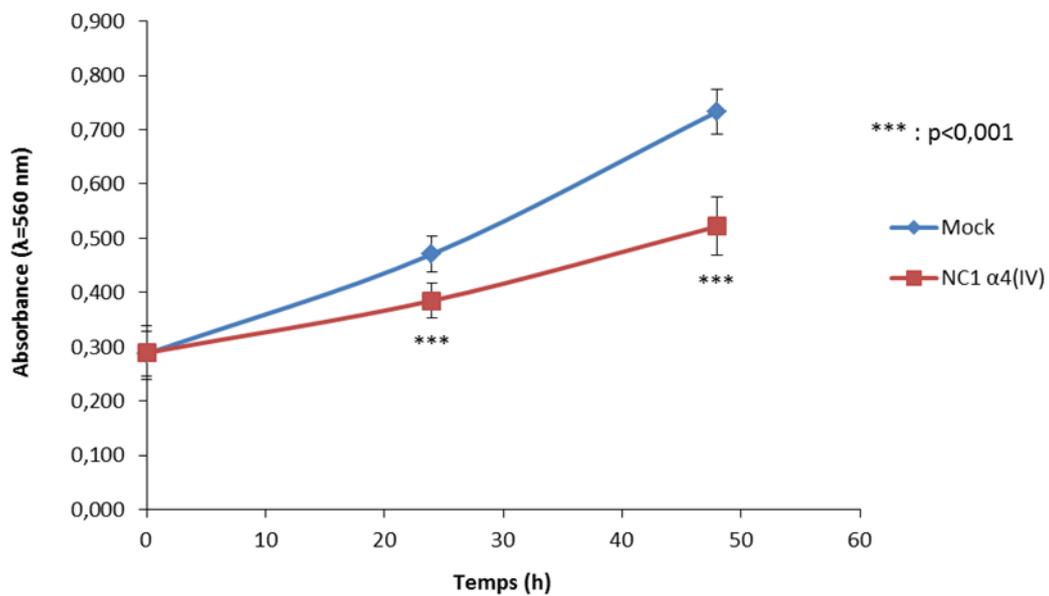


Figure 24 : Prolifération moyenne des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ pendant 48h

III-1-3/ Inhibition de la migration cellulaire

Pour étudier l'effet de la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ sur la migration des cellules UACC 903, les cellules sont incubées 24h en chambre de Boyden modifiée. La surexpression de la protéine NC1 $\alpha 4(IV)$ induit une inhibition de la migration des cellules UACC 903 de 21% à 70% selon les clones (Figure 25).

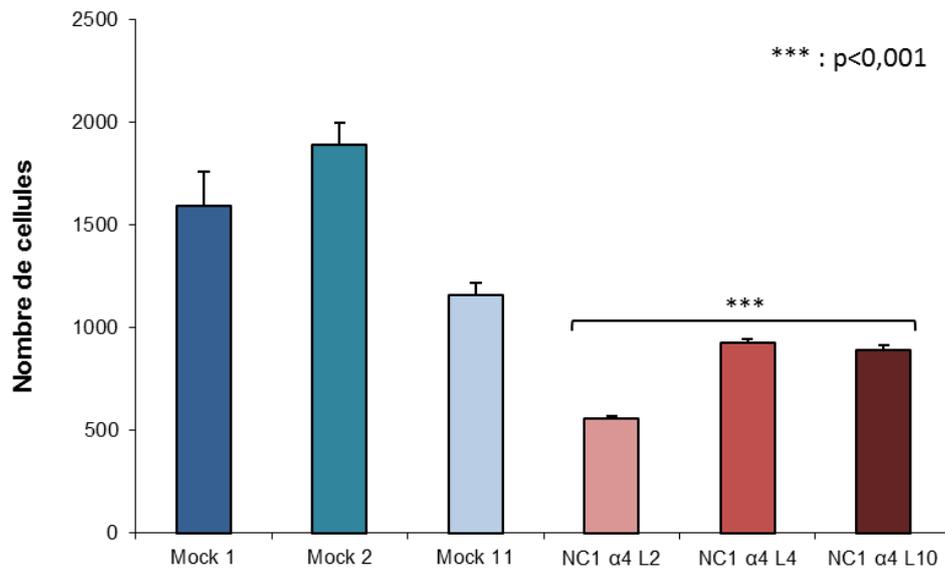


Figure 25 : Migration des clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 24h

Lors de la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$, la migration est inhibée en moyenne de 49% par rapport aux cellules Mock (Figure 26).

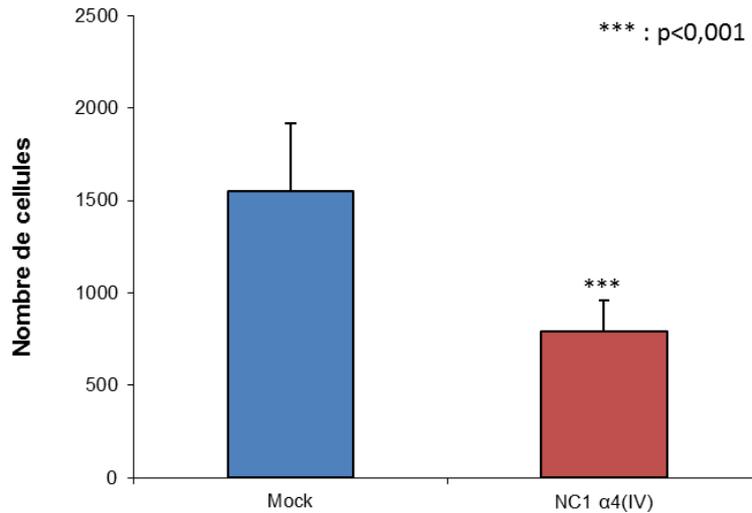


Figure 26 : Migration moyenne des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 α4(IV) étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 24h

III-1-4/ Inhibition de l'invasion cellulaire

L'étude des propriétés invasives des cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 α4(IV) a été effectuée en chambre de Boyden modifiée, tapissée de Matrigel[®], sur chacun des 3 clones Mock et des 3 clones surexprimant le domaine NC1 α4(IV) par le Dr Jessica Thevenard. Nous avons vérifié les propriétés anti-invasives de ce domaine sur les deux clones utilisés lors des expériences de xénogreffes qui seront développées dans le paragraphe III-2 : les clones Mock 1 et NC1 α4L2. La surexpression du domaine recombinant 3xFLAG-NC1 α4(IV) induit une inhibition de l'invasion des cellules de mélanome de 58% (Figure 27).

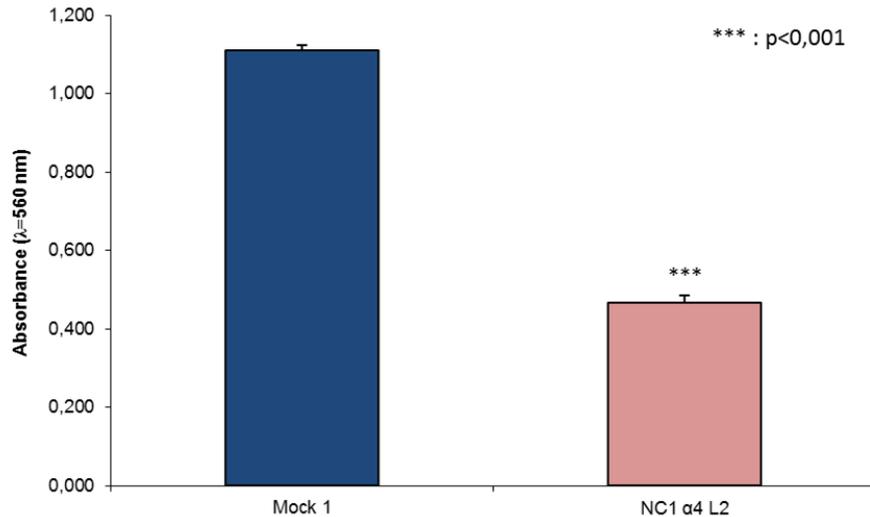


Figure 27 : Invasion des clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 72h

III-1-5/ Effet sur le système protéolytique

III-1-5-a/ Effet sur la production de MMP-2 et MMP-9

Afin d'expliquer l'inhibition de l'invasion, nous nous sommes intéressés à l'effet du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ sur la sécrétion de MMPs et notamment des gélatinases (MMP-2 et MMP-9).

Après 48h de culture en absence de SVF, les surnageants de culture des cellules UACC 903 surexprimant ou non la tétrastatine ont été soumis à une zymographie en gel de gélatine. Les cellules UACC 903 sécrètent de la proMMP-2 mais pas de proMMP-9. Aucune forme active de ces MMPs n'a été détectée (Figure 28A). La surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ n'induit aucune modification significative de la sécrétion de proMMP-2 (Figure 28B).

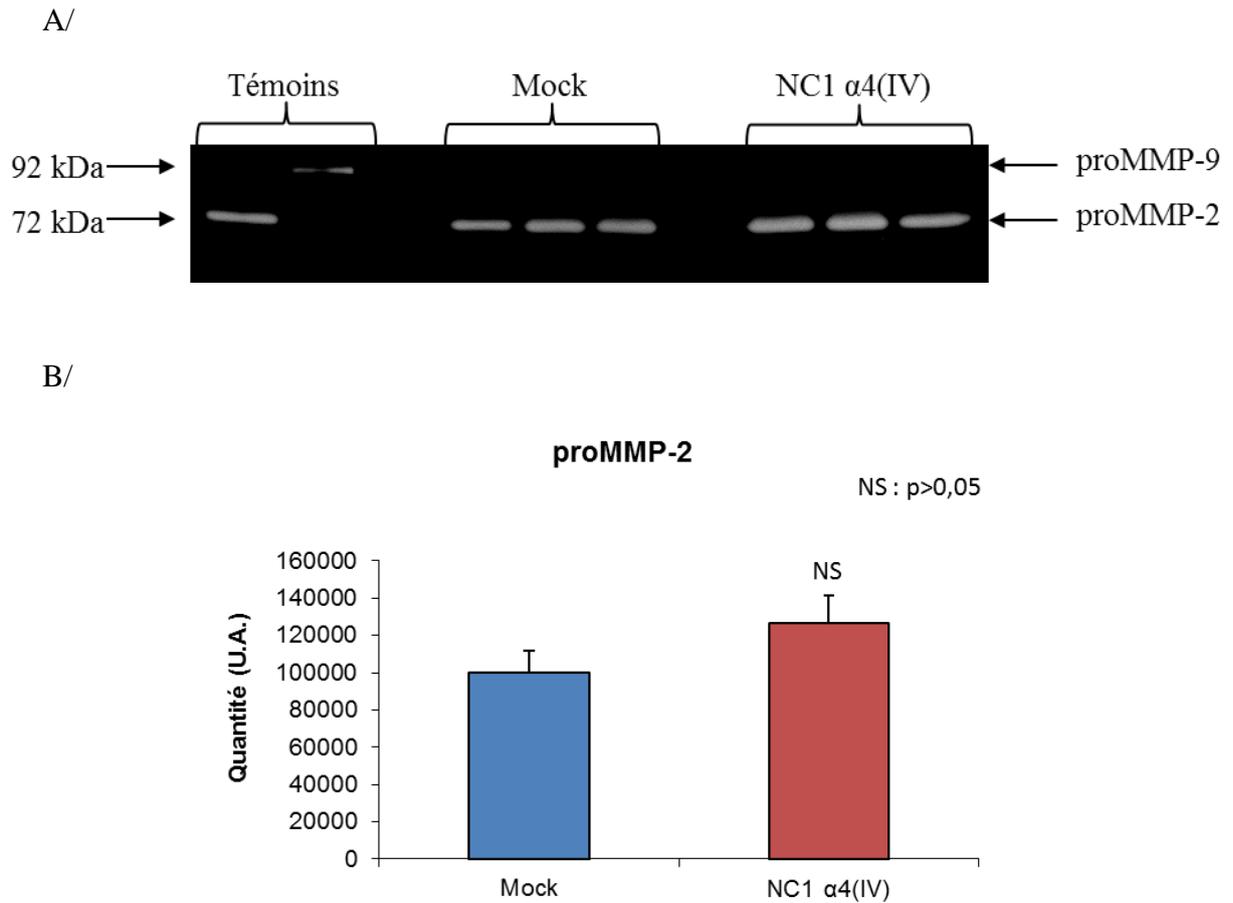
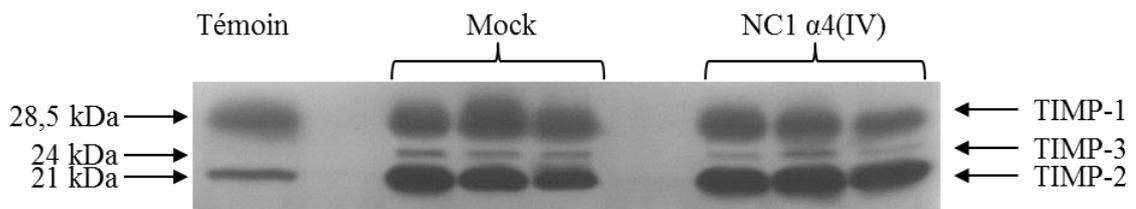


Figure 28 : Etude de la sécrétion des MMP-2 et MMP-9 dans les surnageants de culture des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par zymographie (A) et quantification (B)

III-1-5-b/ Effets sur les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs)

Les surnageants de culture sont également soumis à une zymographie inverse afin d'étudier la sécrétion d'inhibiteurs de MMPs. Les cellules UACC 903 sécrètent les inhibiteurs TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3 mais aucune différence significative n'est observée lors de la surexpression de NC1 $\alpha 4(IV)$ (Figure 29). L'expression du TIMP-3 a été confirmée par western-blot par le Dr J Thevenard.

A/



B/

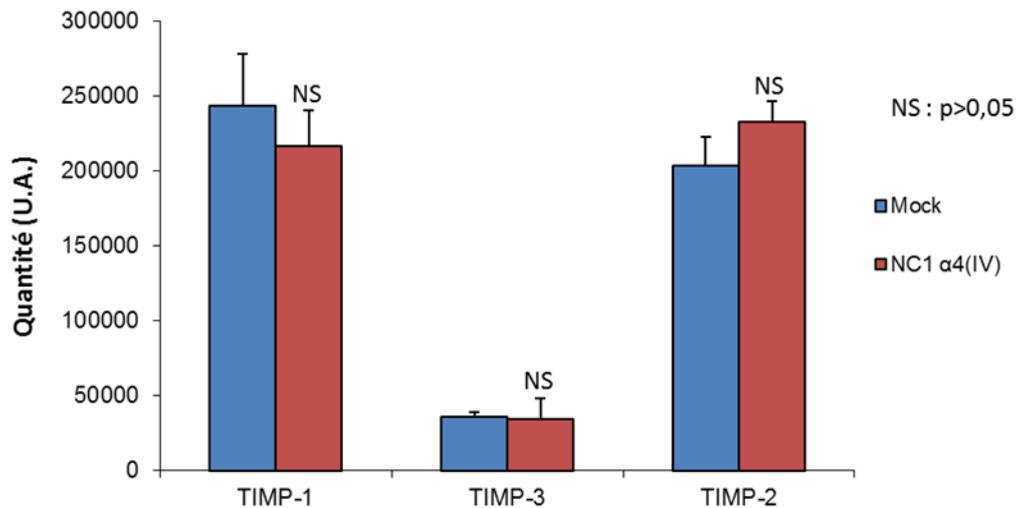
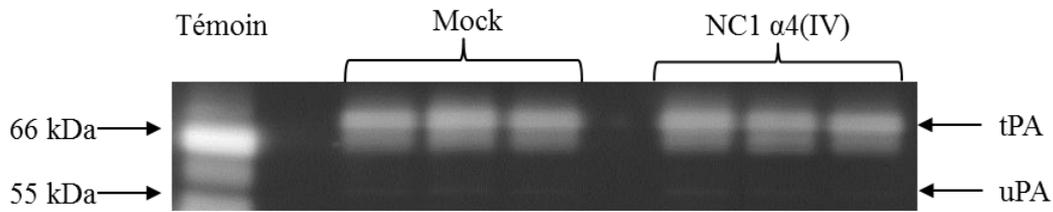


Figure 29 : Etude de la sécrétion des TIMP dans les surnageants de culture des différents clones UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 α4(IV) par zymographie reverse (A) et quantification (B)

III-1-5-c/ Etude du système plasminogène

La deuxième cascade protéolytique impliquée dans la progression tumorale est l'activation du plasminogène en plasmine par des activateurs, tPA et uPA, sous le contrôle d'inhibiteurs spécifiques, les PAIs. Les surnageants de culture des différents clones sont soumis à une zymographie en gel de gélatine-plasminogène. Les clones expriment de façon importante du tPA et dans une moindre mesure de l'uPA. Aucune différence significative de sécrétion de tPA ou uPA n'est observée entre les clones transfectés par le plasmide vide et les clones surexprimant le domaine NC1 α4(IV) (Figure 30).

A/



B/

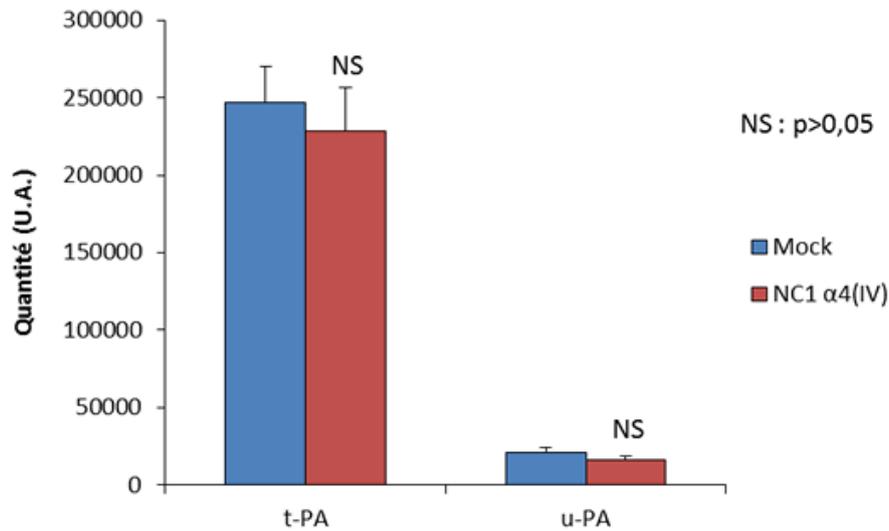


Figure 30 : Etude de la sécrétion des activateurs du plasminogène t-PA et u-PA dans les surnageants de culture des différents clones UACC 903 par zymographie en gel de gélatine-plasminogène (A) et quantification (B)

III-1-5-d/ Effets du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ sur la MMP-14

La MMP-14 (ou MT1-MMP) est une métalloprotéase membranaire impliquée dans de nombreux processus tumoraux. Nous avons étudié son expression, son activation ainsi que sa localisation au sein des cellules UACC 903 surexprimant ou non la tétrastatine.

L'analyse par RT-PCR quantitative ne montre aucune variation d'expression de la MMP-14 entre les cellules Mock et les cellules surexprimant la tétrastatine (Figure 31).

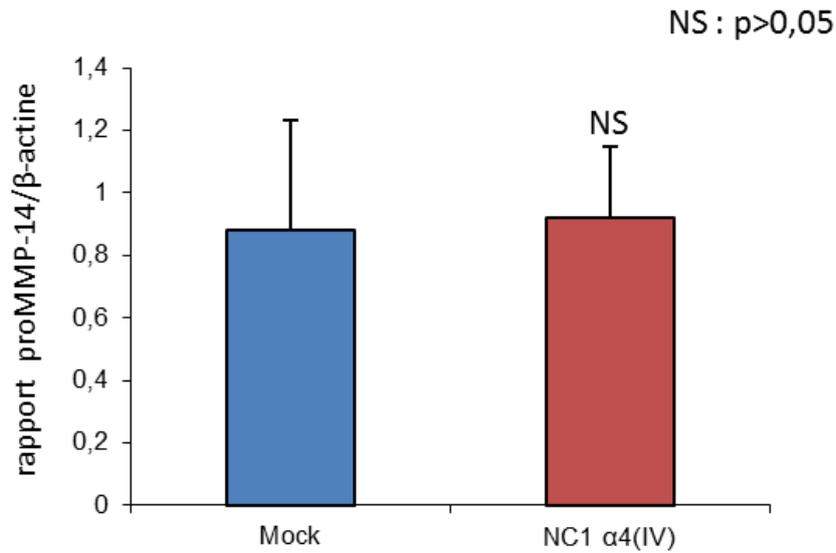
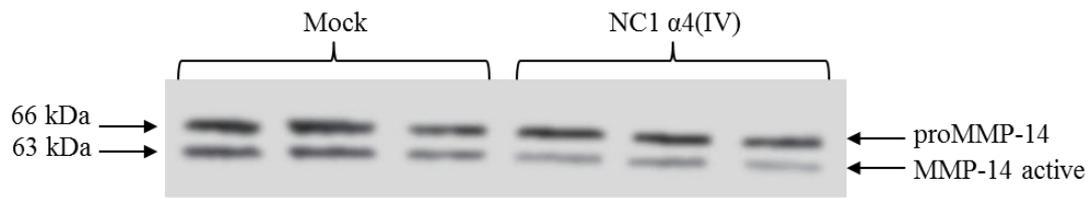


Figure 31 : Expression relative de l'ARNm de la MMP-14 dans les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 α4(IV) analysée par RT-PCR quantitative

Nous avons étudié l'expression de la MMP-14 au niveau protéique, par western-blot, dans les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 α4(IV). Nous observons deux bandes de 66 kDa et 63 kDa correspondant respectivement à la forme proMMP-14 et MMP-14 active (Figure 32A).

A/



B/

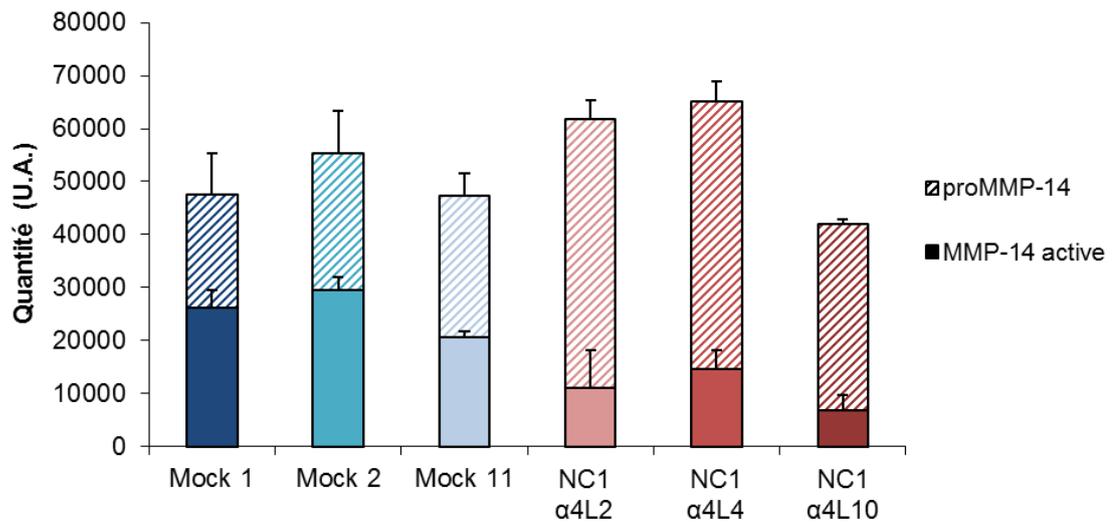


Figure 32 : Etude de l'expression et de l'activation de la MMP-14 dans les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ analysée par western-blot (A) et quantification (B)

Après quantification (Figure 32), nous montrons qu'au niveau protéique, la surexpression du domaine d'intérêt induit une inhibition de l'activation de la MMP-14 de 72 % mais n'affecte pas son expression totale (Figure 33).

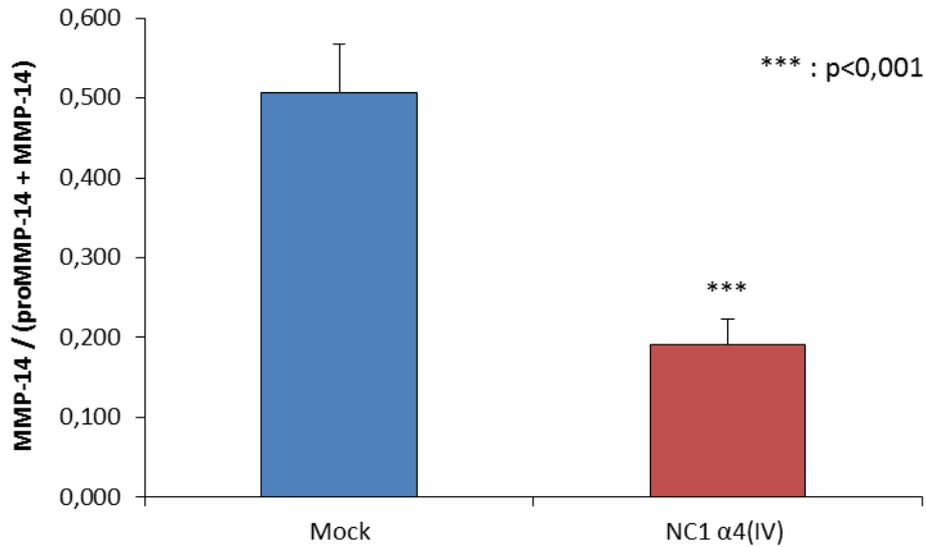


Figure 33: Etude de la quantité moyenne de MMP-14 active par rapport à la quantité de MMP-14 totale dans les cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 α4(IV)

Afin d'étudier la localisation de la MMP-14 à la surface des cellules UACC-903, nous avons réalisé des immunomarquages dirigés contre la MMP-14 ainsi que la cavéoline-1 (Figure 34). Dans les cellules Mock, la MMP-14 est retrouvée au niveau du front de migration où elle colocalise avec la cavéoline-1. En revanche, dans les cellules surexprimant le domaine NC1 α4(IV), cet aspect disparaît, comme visualisé dans l'encart de la figure 34, témoignant d'une perte du phénotype migratoire.

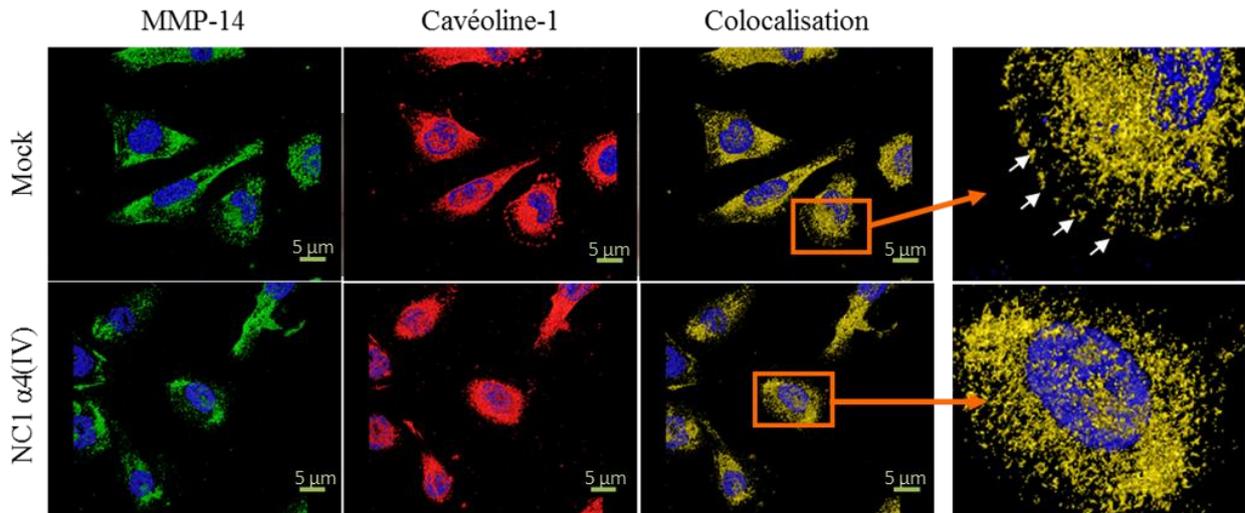


Figure 34 : Etude de la localisation de la MMP-14 à la surface des cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par microscopie confocale après immunomarquages à l'aide d'anticorps dirigés contre la MMP-14 et la cavéoline-1

III-2/ Effet de la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ par les cellules de mélanome UACC 903 *in vivo*

III-2-1/ Evolution du volume tumoral

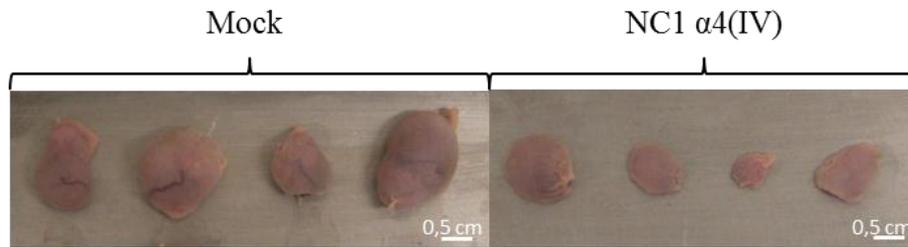
In vitro, la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ dans les cellules de mélanome UACC 903 induit des effets anti-tumoraux avec notamment une inhibition de la prolifération et de l'invasion de ces cellules. L'étude des effets inhibiteurs potentiels de la tétrastatine *in vivo* a été réalisée dans un modèle de xénogreffes, dans lequel 5.10^6 cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ ont été injectées en sous-cutané dans le flanc gauche de souris athymiques. Les souris ayant reçu les cellules UACC 903 Mock et les souris ayant reçu les cellules UACC 903 surexprimant la tétrastatine sont nommées souris Mock et souris NC1 $\alpha 4(IV)$ respectivement.

Deux clones ont été sélectionnés pour la mise en place du modèle : les clones Mock 1 et NC1 $\alpha 4L2$. L'évolution tumorale est suivie pendant 26 jours après l'injection des cellules. Les tumeurs apparaissent une dizaine de jours après l'injection.

Les tumeurs obtenues chez les souris NC1 $\alpha 4(IV)$ ont une croissance plus lente et semblent majoritairement croître horizontalement (Figure 35A). L'inhibition de la croissance tumorale

26 jours après induction de la tumeur est de 80% par rapport aux tumeurs obtenues chez les souris Mock (Figure 35B).

A/



B/

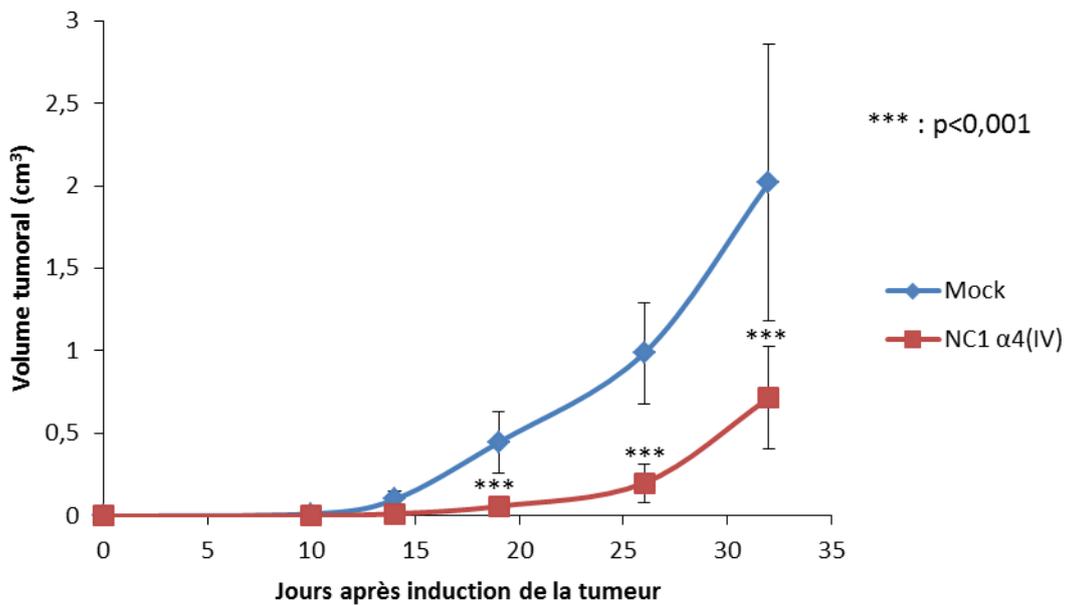


Figure 35 : Morphologie finale (A) et évolution du volume tumoral (B) de xénogreffes de mélanome humain après injection de cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 α4(IV) en sous-cutané chez la souris athymique

III-2-2/ Observation histologique des tumeurs

Après sacrifice des souris à J16, des coupes de tumeurs résultant de l'injection des cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ ont été colorées au Trichrome de Masson (Figure 36).

Les tumeurs des souris NC1 $\alpha 4(IV)$ sont plus petites avec un stroma plus abondant que celles des souris Mock et le centre de la tumeur semble se nécroser contrairement aux tumeurs des souris Mock. Les tumeurs induites par l'injection des cellules Mock sont plus invasives avec une infiltration des cellules tumorales dans les tissus environnants par rapport aux tumeurs induites par les cellules surexprimant NC1 $\alpha 4(IV)$ (Figure 36C).

En ce qui concerne la vascularisation des tumeurs, les vaisseaux sont à paroi fine et plus nombreux au centre des tumeurs. La paroi des vaisseaux est soulignée par une bande fibreuse dans les tumeurs induites par les cellules surexprimant NC1 $\alpha 4(IV)$, ce qui rendrait ces vaisseaux moins perméables (Figure 36D).

Un amas de fibres conjonctives, beaucoup plus épais dans les tumeurs induites par les cellules surexprimant NC1 $\alpha 4(IV)$, entoure la tumeur (Figure 36B). Cet amas pourrait avoir un rôle protecteur en contenant la tumeur et l'empêchant ainsi de se développer.

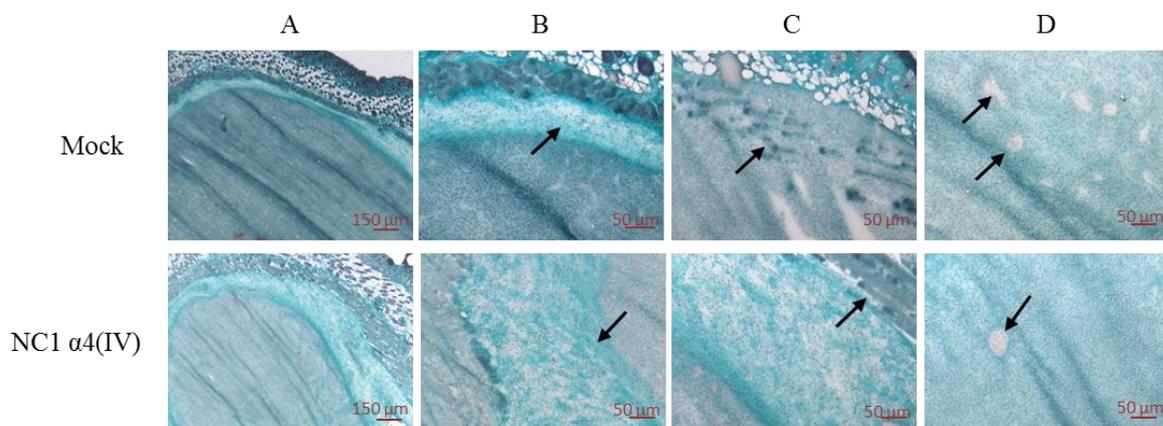


Figure 36 : Histologie des tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$

(A) Morphologie générale, grossissement $\times 2$

(B) Amas de fibres conjonctives entourant la tumeur, grossissement $\times 10$

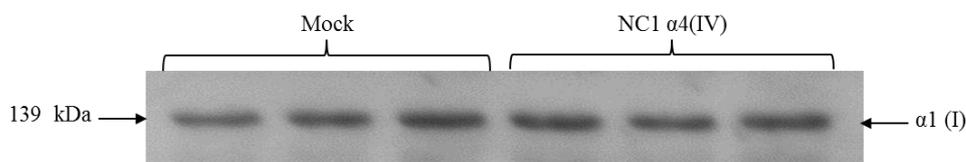
(C) Invasion des tissus environnants, grossissement $\times 10$

(D) Vaisseaux, grossissement $\times 10$

III-2-3/ Effet de la tétrastatine sur la sécrétion du collagène I

Afin de mieux comprendre l'accumulation de fibres conjonctives autour de la tumeur, nous avons étudié par western-blot l'effet de la tétrastatine sur la sécrétion de collagène de type I par les cellules UACC 903 Mock ou surexprimant la tétrastatine après 48h de culture sans SVF. Aucune variation de sécrétion de ce collagène n'a été observée lors de la surexpression de la tétrastatine. De même, l'incubation de fibroblastes dermiques humains en présence de tétrastatine recombinante (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 48h sans SVF, n'a montré aucune modification de sécrétion du collagène de type I. La tétrastatine n'a donc pas d'effet direct sur la sécrétion de ce collagène. Cependant, il est possible que la surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ induise l'expression d'un facteur stimulant la sécrétion de collagène I par les fibroblastes présents dans le stroma. Afin de vérifier cette hypothèse, les milieux conditionnés des cellules UACC 903 surexprimant ou non la tétrastatine sont récoltés après 48h de culture en absence de SVF puis des fibroblastes dermiques humains sont incubés en présence de ces milieux pendant 48h. De la même façon, aucune modification de sécrétion du collagène de type I n'a été observée (Figure 37).

A/



B/

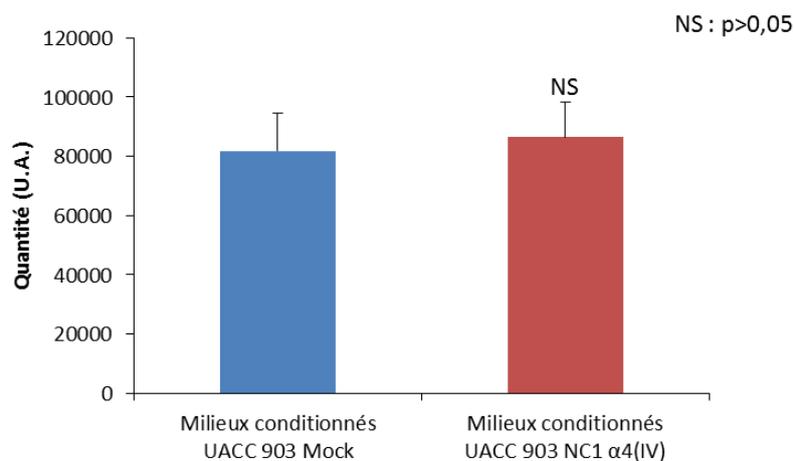


Figure 37 : Expression de la chaîne $\alpha 1(\text{I})$ par les fibroblastes dermiques humains après incubation pendant 48h en présence de milieux conditionnés de cellules UACC 903 surexprimant ou non la tétrastatine, analysée par western-blot (A) et quantification (B)

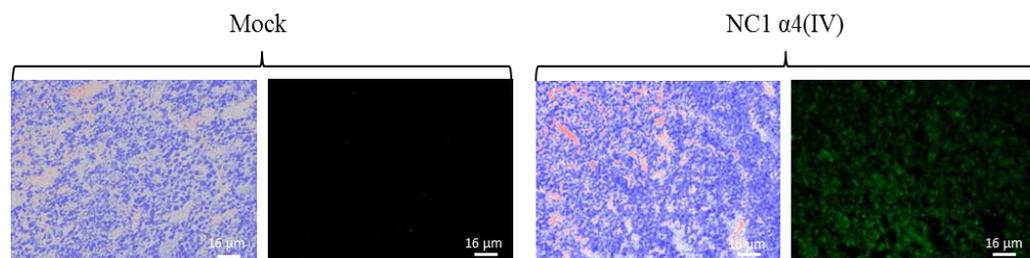
III-2-4/ Immunohistochimie sur les coupes de xénogreffes

Afin de comprendre le mécanisme d'inhibition de la croissance tumorale *in vivo*, différents immunomarquages ont été réalisés sur les coupes de tumeurs des souris Mock ou NC1 $\alpha 4(IV)$. Les coupes ont été contre-colorées à l'Hemalun de Mayer.

III-2-4-1/ Production de la tétrastatine

Afin de vérifier l'expression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$, les marquages à l'aide d'un anticorps anti-FLAG et d'un anticorps anti-NC1 $\alpha 4(IV)$ ont été réalisés. Les tumeurs sont toutes marquées avec l'anticorps anti-FLAG (Figure 38B) mais ne sont marquées que dans les tumeurs des souris NC1 $\alpha 4(IV)$ lors du marquage avec l'anticorps anti-NC1 $\alpha 4(IV)$ (Figure 38A). Ceci prouve que les cellules à l'origine des tumeurs avaient bien reçu le plasmide p3xFLAG Mock, dans le cas des tumeurs des souris Mock, et le plasmide contenant la séquence NC1 $\alpha 4(IV)$ dans le cas des tumeurs des souris NC1 $\alpha 4(IV)$. De plus, la surexpression du domaine est bien effective dans ce modèle *in vivo*.

A/



B/

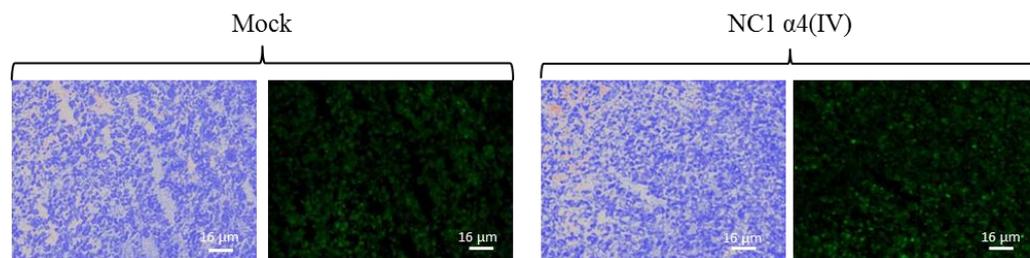
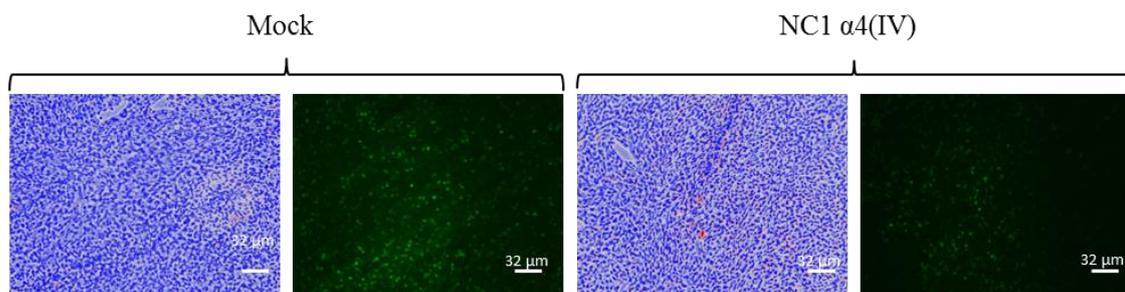


Figure 38 : Immunomarquages anti-NC1 $\alpha 4(IV)$ (A) et anti-FLAG (B) sur les coupes de tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$

III-2-4-2/ Effet sur la prolifération

La prolifération étant affectée *in vitro*, nous avons réalisé un marquage anti-Ki-67 sur les coupes de tumeurs. Le nombre de cellules marquées est moins important dans les tumeurs des souris NC1 $\alpha 4$ (IV) (Figure 39A). La quantification du marquage montre une inhibition de 33 % lorsque les cellules à l'origine de la tumeur surexpriment le domaine NC1 $\alpha 4$ (IV) (Figure 39B).

A/



B/

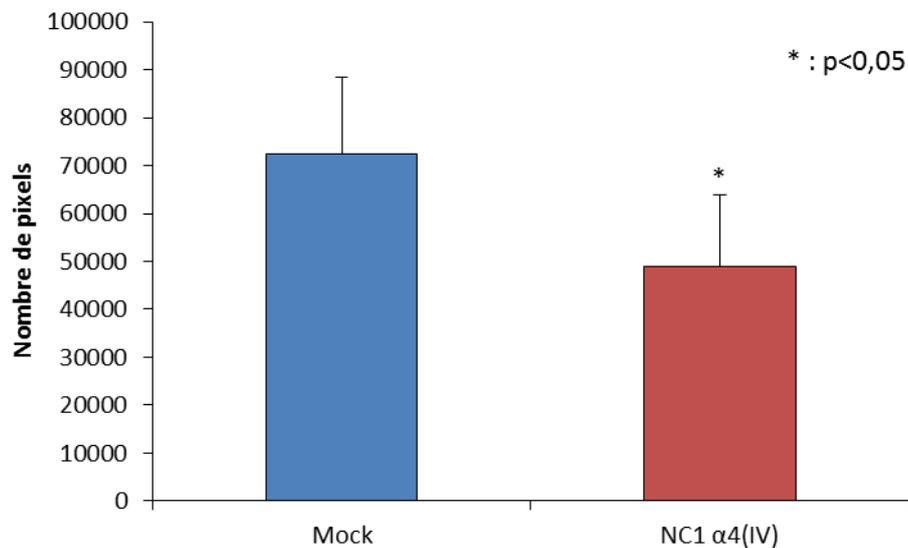
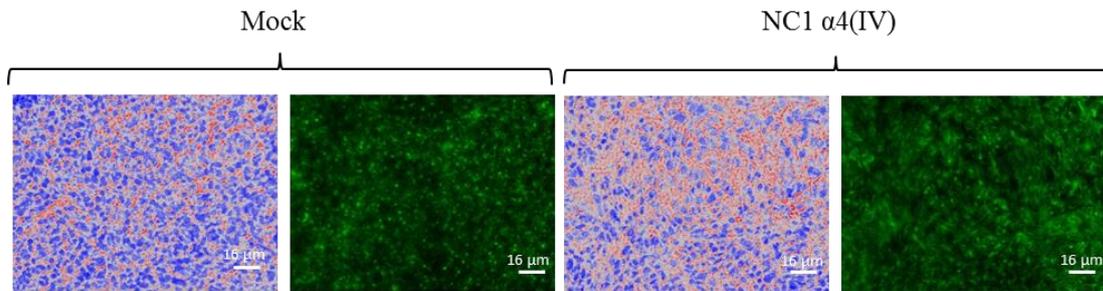


Figure 39 : Immunomarquage anti-Ki-67 et contre-coloration sur les coupes de tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4$ (IV) (A) et quantification du marquage (B)

III-2-4-3/ Effet sur la MMP-14

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de la MMP-14. Celle-ci est bien exprimée dans les deux types de tumeurs (Figure 40A) mais la quantification du marquage ne montre aucune différence significative entre les deux types de tumeurs (Figure 40B).

A/



B/

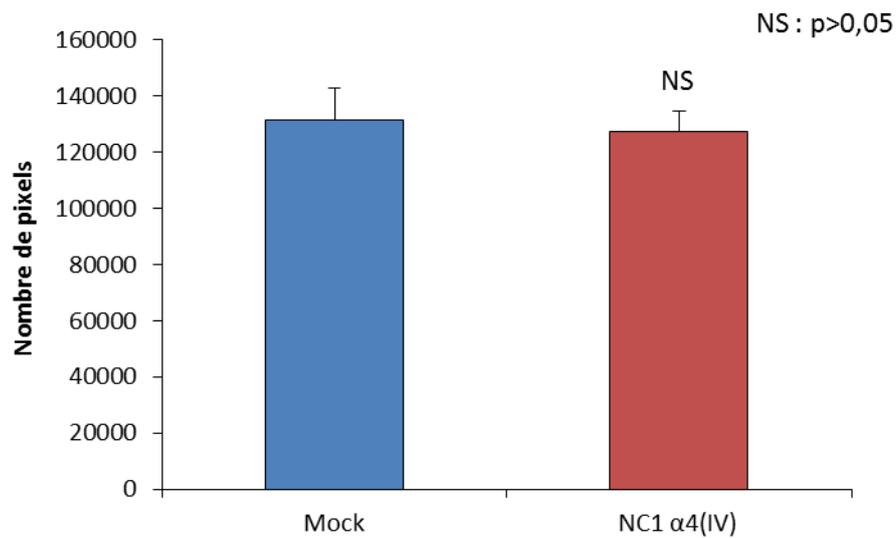


Figure 40 : Immunomarquage anti-MMP-14 et contre-coloration sur les coupes de tumeurs induites par l'injection de cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ (A) et quantification du marquage (B)

III-2-4-4/ Effet sur la néo-angiogenèse

Afin d'étudier un effet potentiel sur l'angiogenèse, un marquage des vaisseaux a été réalisé à l'aide d'un anticorps anti-vWF. Le nombre de vaisseaux ainsi que leur périmètre ont été étudiés et quantifiés. Le nombre de vaisseaux tend à diminuer dans les tumeurs des souris NC1 $\alpha 4(IV)$ mais les différences obtenues ne sont pas significatives (Figure 41).

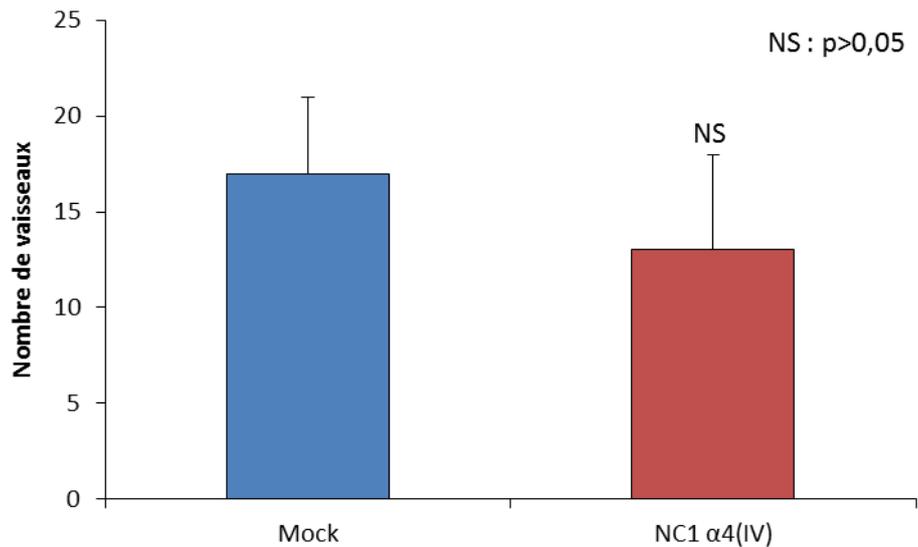


Figure 41 : Quantification du nombre de vaisseaux par champ sur les coupes de tumeurs résultant de l'injection des cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$

En revanche, la mesure du périmètre des vaisseaux montre une augmentation de leur taille. Toutefois, les variations observées entre les deux types de tumeurs rendent cette augmentation statistiquement non significative (Figure 42).

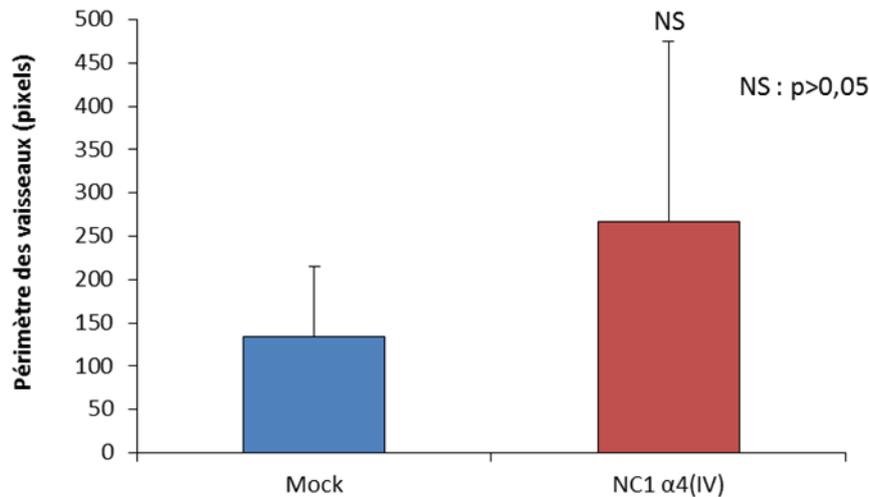


Figure 42 : Quantification du périmètre des vaisseaux (en pixels) sur les coupes de tumeurs résultant de l'injection des cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 α 4(IV)

III-2-5/ Effet de la sécrétion de protéases *in vivo*

Après sacrifice à J26, les protéines sont extraites des tumeurs afin d'étudier les systèmes protéolytiques. La zymographie montre que les tumeurs des souris Mock ou NC1 α 4(IV) sécrètent de la proMMP-2 et de la proMMP-9. L'étude par zymographie reverse indique que les cellules des différentes tumeurs expriment également du TIMP-1 et du TIMP-2. Le système d'activation du plasminogène, étudié par zymographie en gel de gélatine-plasminogène, montre que les cellules des deux types de tumeurs sécrètent de l'uPA ainsi que du tPA. Après quantification, aucune différence significative entre les deux types de tumeur n'a été observée (Figure 43).

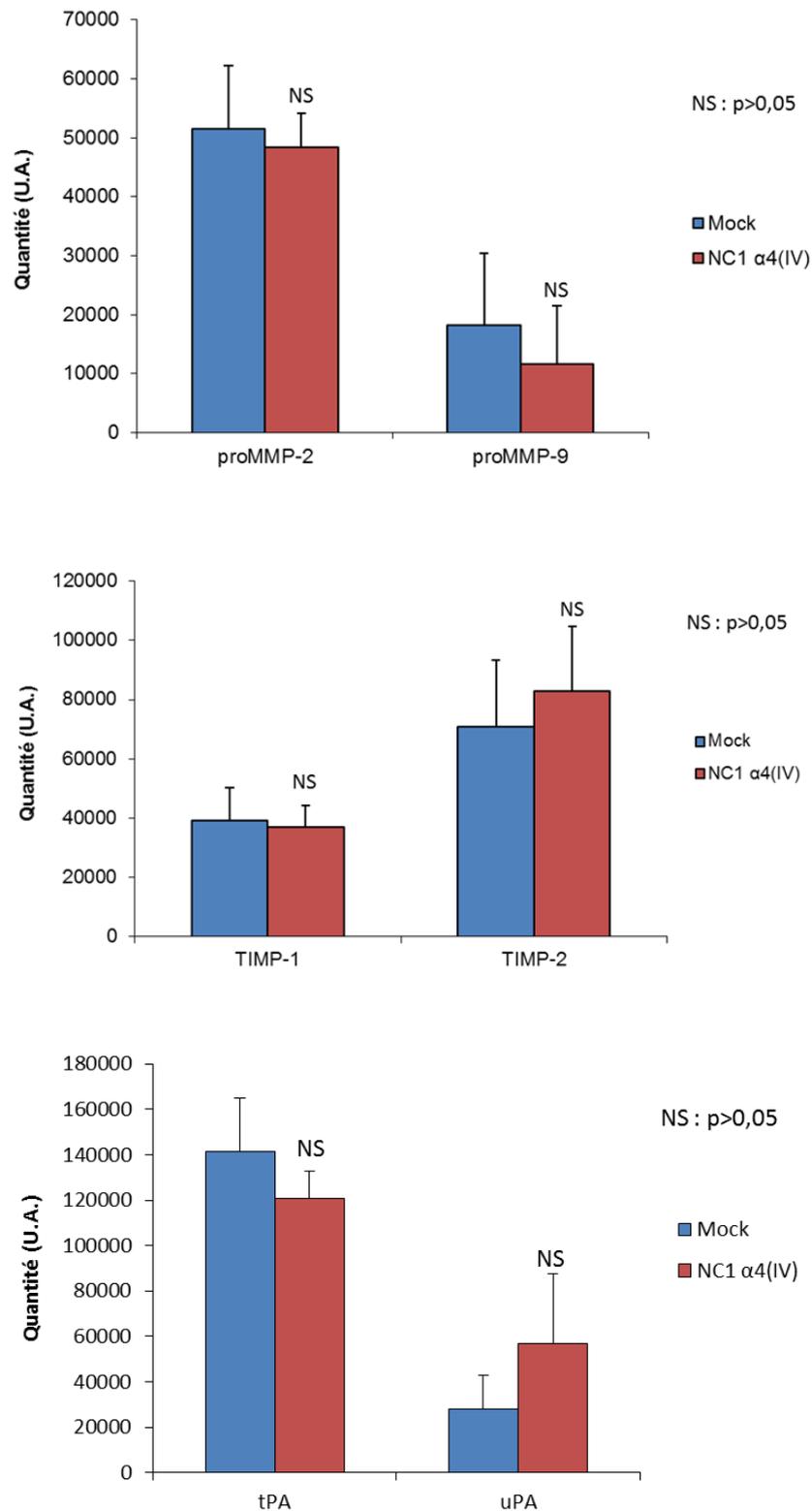


Figure 43 : Etude de différents systèmes protéolytiques dans les extraits protéiques des tumeurs résultant de l'injection des cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$

III-3/ Effet de la protéine recombinante *in vitro*

III-3-1/ Production de la protéine recombinante dans un système procaryote

Afin d'étudier l'effet du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ sur les cellules de mélanome, nous avons produit le domaine recombinant dans un système procaryote. Pour cela, les bactéries *E. coli* JM 109 ont été transformées avec le plasmide pQE-31 contenant la séquence codant le domaine recombinant 6His-NC1 $\alpha 4(IV)$. Ce plasmide contenant un gène de résistance à l'ampicilline, les bactéries transformées par le plasmide ont été sélectionnées grâce à cet antibiotique. La production de la protéine recombinante est induite par ajout d'IPTG aux bactéries en phase de croissance exponentielle. Les bactéries sont ensuite lysées grâce à un tampon de lyse et soumises à une sonication. L'extrait est soumis à une chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA. Les différentes fractions sont analysées par électrophorèse SDS-PAGE et western-blot avec des anticorps dirigés contre la partie 6His ou contre le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$.

Avant colonne, une bande de 28 kDa apparaît dans les extraits non induit et induit par l'IPTG. Cette bande est plus importante dans la fraction après induction par l'IPTG. Ceci montre que la protéine est produite et induite par l'IPTG bien qu'un mécanisme d'échappement existe et permet la production en plus faible quantité de la protéine recombinante sans ajout d'IPTG. La pureté de la protéine recombinante après chromatographie d'affinité est attestée par la présence d'une seule bande de 28 kDa alors que de nombreuses bandes sont présentes dans les extraits avant chromatographie. De plus, cette bande de 28 kDa est révélée après western-blot à l'aide d'un anticorps anti-6His et anti-NC1 $\alpha 4(IV)$ montrant qu'il s'agit bien de la protéine recombinante 6His-NC1 $\alpha 4(IV)$ (Figure 44).

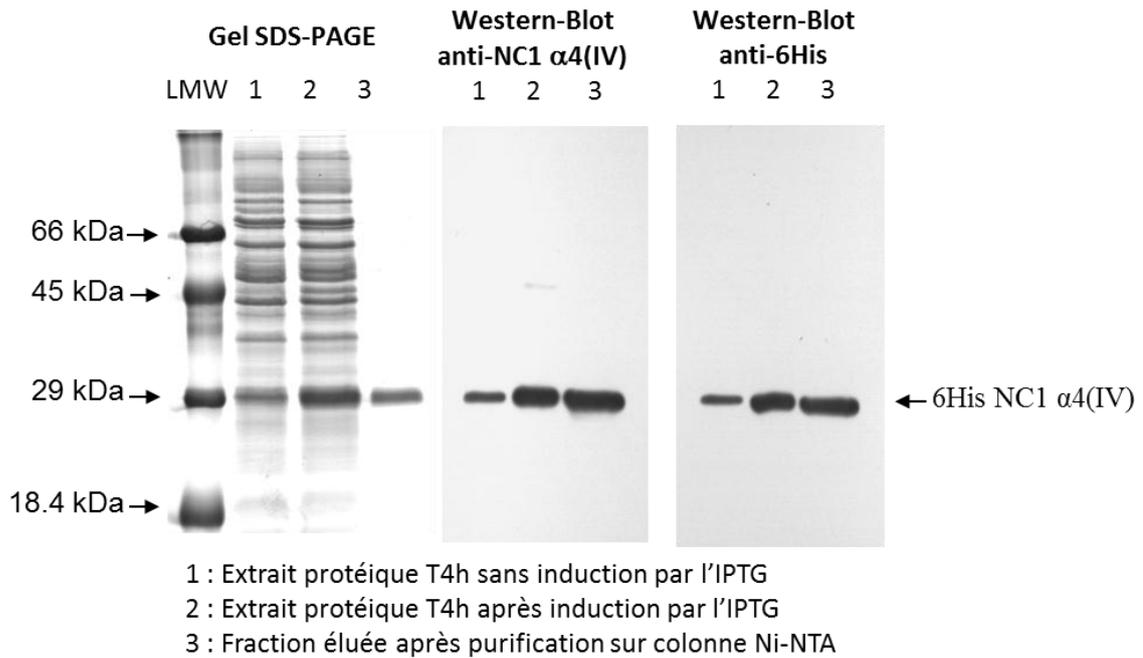


Figure 44 : Production et purification de la protéine 6His-NC1 α 4(IV) en système procaryote analysées par électrophorèse SDS-PAGE et western-blot anti-NC1 α 4(IV) et anti-6His

III-3-2/ Activité biologique de la protéine recombinante NC1 α 4(IV)

III-3-2-1/ Etude de la prolifération de différentes lignées cellulaires en présence de NC1 α 4(IV)

Nous avons tout d'abord étudié l'effet de la protéine recombinante NC1 α 4(IV) à différentes concentrations sur la prolifération de différentes lignées de cellules de mélanome ainsi que sur des fibroblastes dermiques humains normaux. Les lignées de mélanome étudiées sont les cellules A375, SK-Mel-28, HT-144 et UACC 903. Les concentrations de la protéine recombinante NC1 α 4(IV) varient de 0 à 20 μ g/mL. La viabilité cellulaire a été vérifiée par un test au bleu trypan et était supérieure à 95%. Au-delà de la concentration de 20 μ g/mL, la viabilité cellulaire devient inférieure à 95%, et les expériences n'ont pas été poursuivies pour ces concentrations.

La protéine recombinante NC1 α 4(IV) n'a pas d'effet significatif sur la prolifération cellulaire des cellules A375 et des fibroblastes. En revanche, elle inhibe la prolifération des cellules HT-144, SK-Mel-28 et UACC 903 à partir de 10 μ g/mL (Figure 45).

La prolifération des cellules HT-144 est ainsi inhibée de 29% après 72h de culture en présence de 10 $\mu\text{g/mL}$ de NC1 $\alpha 4(\text{IV})$. Elle est inhibée de 29% et 50% respectivement après 48h et 72h de culture en présence de 20 $\mu\text{g/mL}$ de NC1 $\alpha 4(\text{IV})$.

La prolifération des cellules SK-Mel-28 est inhibée de 26% après 72h de culture en présence de 10 $\mu\text{g/mL}$ de NC1 $\alpha 4(\text{IV})$. Elle est inhibée de 37% et 43% respectivement après 48h et 72h de culture en présence de 20 $\mu\text{g/mL}$ de NC1 $\alpha 4(\text{IV})$.

Les cellules UACC 903 présentent la plus forte inhibition de prolifération avec une inhibition de 29% et 37% après 48h et 72h de culture en présence de 10 $\mu\text{g/mL}$ de NC1 $\alpha 4(\text{IV})$. En présence de 20 $\mu\text{g/mL}$ de NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, la prolifération des cellules UACC 903 est inhibée de 45% et 56% respectivement après 48h et 72h de culture. Les cellules UACC 903 ont été utilisées pour la suite des expériences avec une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, concentration minimale permettant d'observer une inhibition significative de la prolifération.

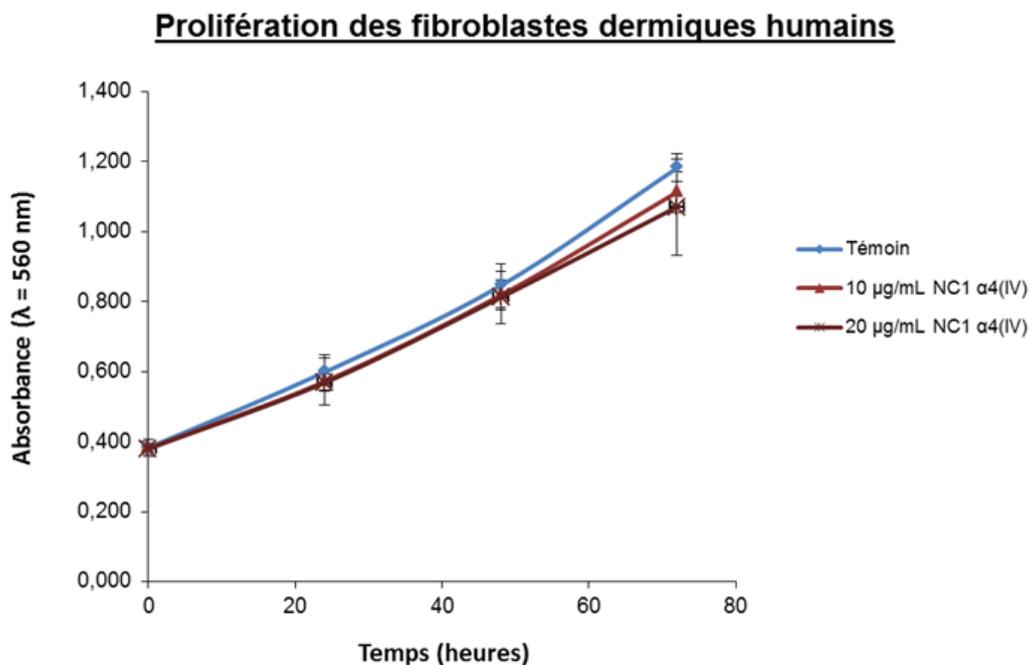


Figure 45 : Etude de la prolifération de différentes lignées cellulaires de mélanome et de fibroblastes en présence de différentes concentrations du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ pendant 72h

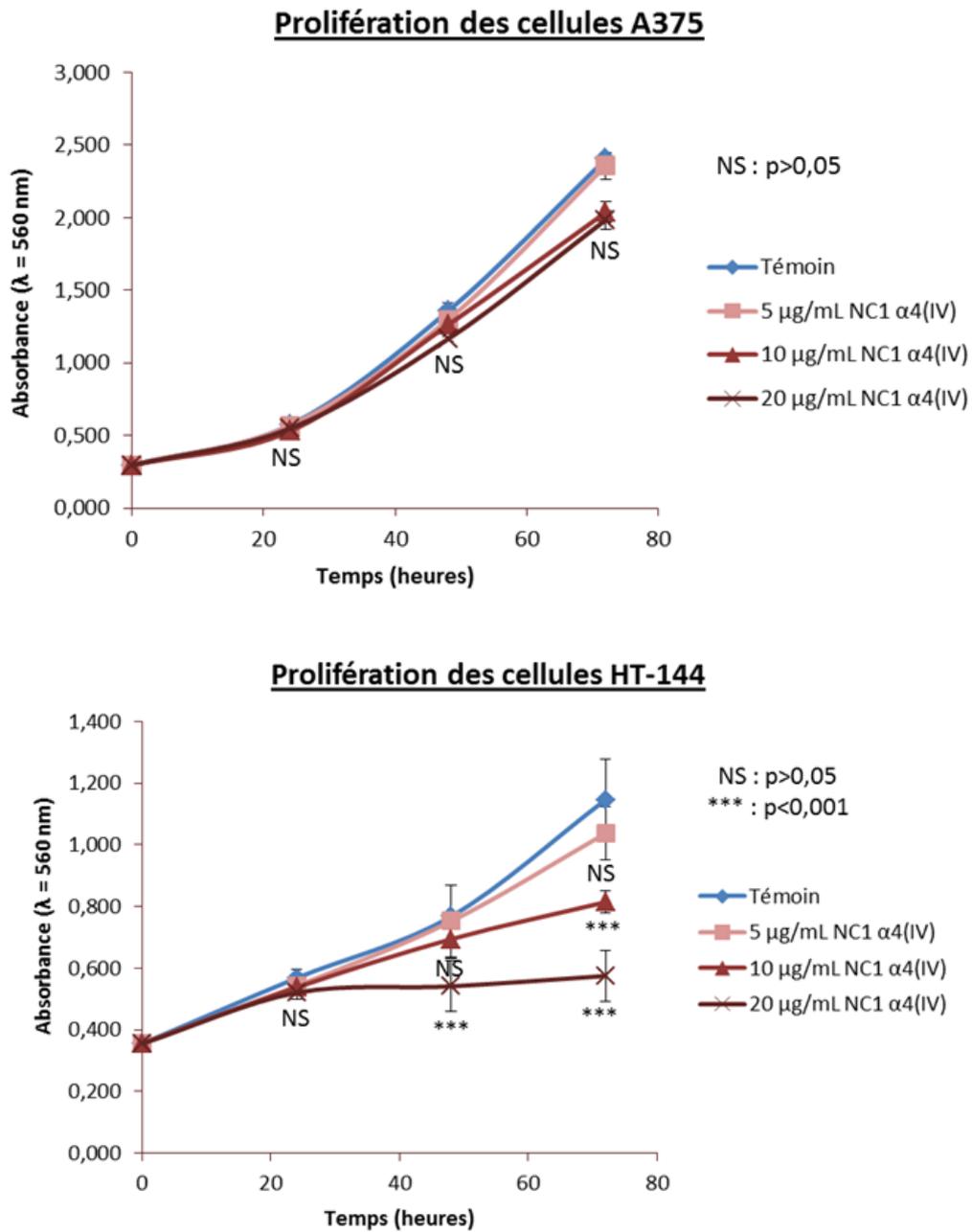


Figure 45 : Etude de la prolifération de différentes lignées cellulaires de mélanome et de fibroblastes en présence de différentes concentrations du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ pendant 72h

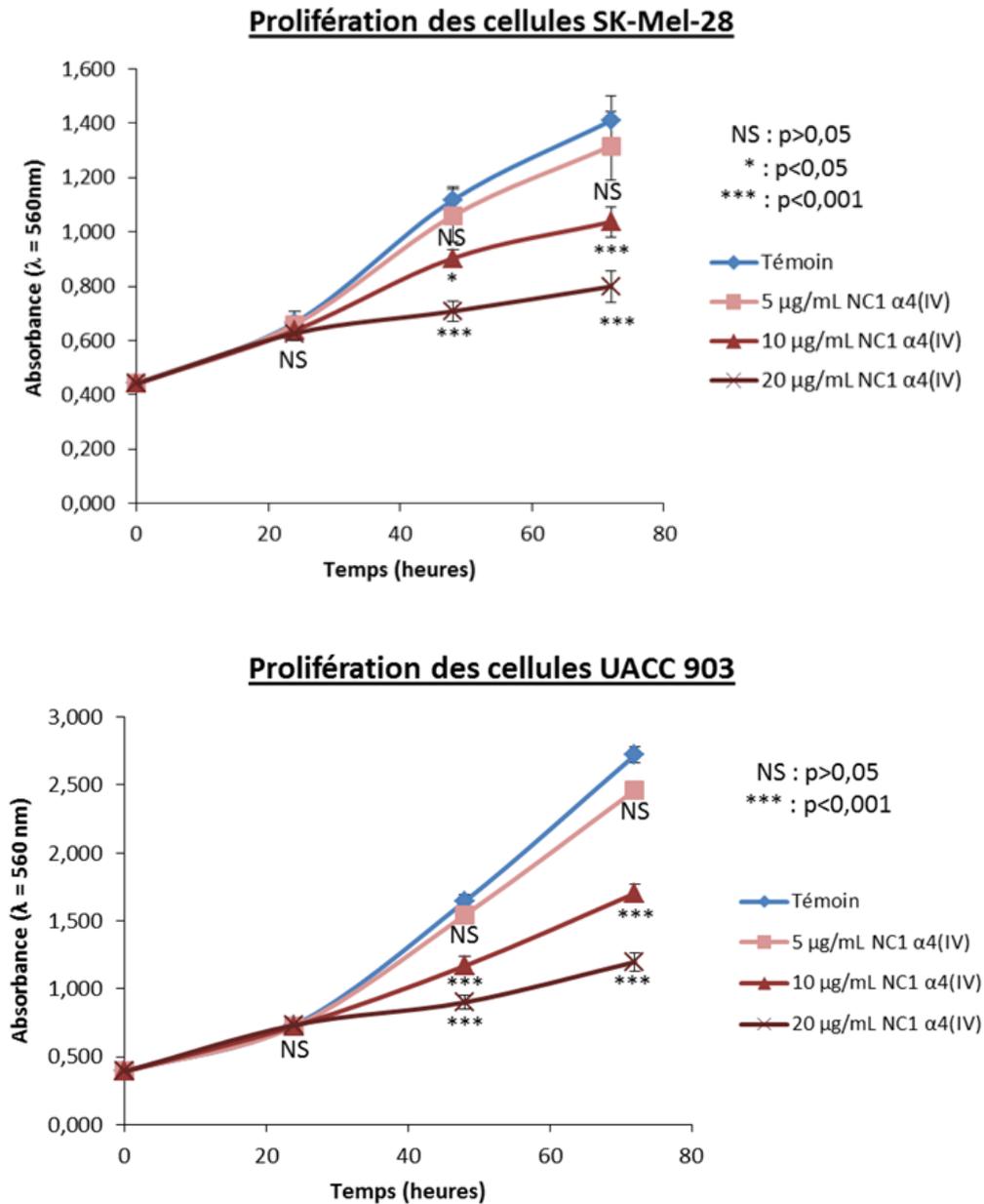


Figure 45 : Etude de la prolifération de différentes lignées cellulaires de mélanome et de fibroblastes en présence de différentes concentrations du domaine recombinant NC1 α4(IV) pendant 72h

III-3-2-2/ Etude du cycle cellulaire des cellules UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 α 4(IV)

L'inhibition de la prolifération cellulaire par le domaine NC1 α 4(IV) nous a conduits à étudier son impact sur les différentes phases du cycle cellulaire. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Marie-Lise Jourdan de l'unité INSERM U921 à la Faculté de Médecine de Tours.

III-3-2-2-1/ Synchronisation des cellules

Afin d'étudier le cycle cellulaire, la synchronisation des cellules est nécessaire. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, incubé les cellules UACC 903 à 80% de confluence en présence de DMEM 4,5 g/L de glucose contenant du SVF 5% et de l'hydroxyurée 2 mM pendant 24h. Ceci permet aux cellules de continuer leur cycle cellulaire jusqu'à ce qu'elles soient en phase G1 où l'hydroxyurée induit l'arrêt du cycle cellulaire. Les cellules sont détachées et ensemencées à raison de 20 000 cellules/cm² et la prolifération est suivie pendant 48h.

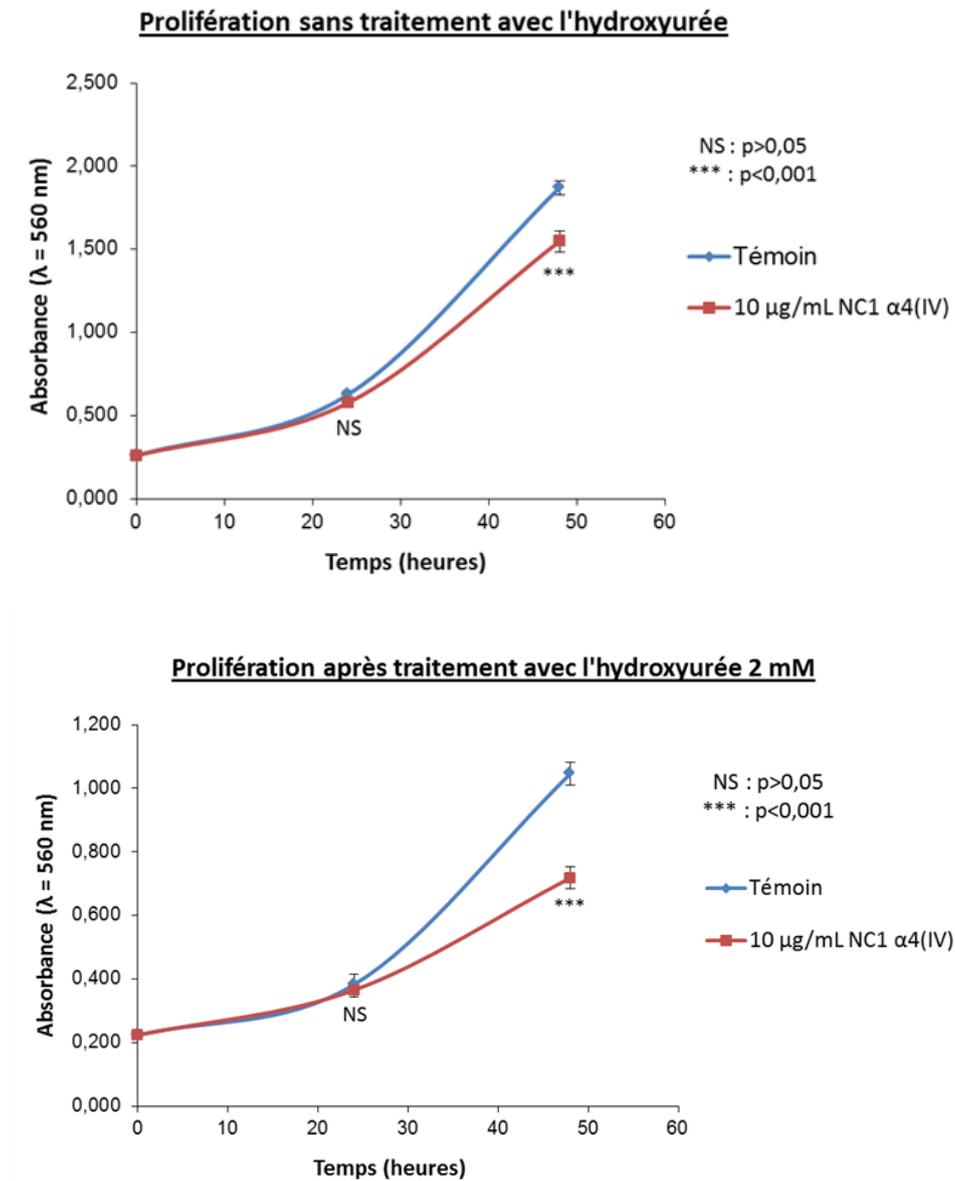


Figure 46 : Prolifération des cellules UACC 903 en présence de 10 µg/mL de NC1 α4(IV) pendant 48h après traitement ou non par l'hydroxyurée 2 mM

Après 48h, on observe une inhibition de prolifération accentuée après traitement avec l'hydroxyurée, passant ainsi de 18% d'inhibition sans traitement avec l'hydroxyurée à 31% d'inhibition après traitement avec l'hydroxyurée (Figure 46). Les cellules semblent donc, au moins en partie, synchronisées.

L'analyse du cycle cellulaire est réalisée par cytométrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium. Ainsi les cellules sont discriminées en fonction de leur quantité d'ADN permettant de déduire leur répartition dans chacune des phases du cycle cellulaire.

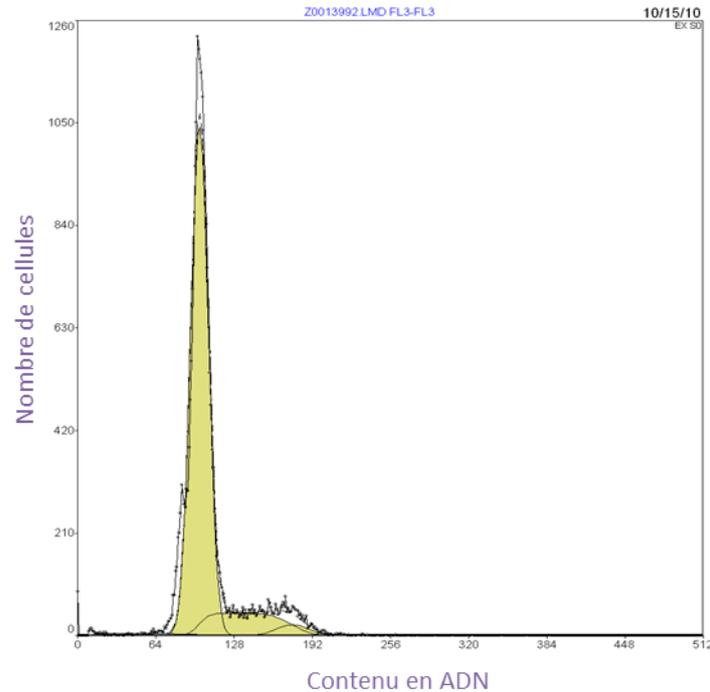


Figure 47 : Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules UACC 903 dans chacune des phases du cycle cellulaire au temps T0 après le traitement avec l'hydroxyurée

Au temps T0, 3% des cellules UACC 903 sont en phase G2, 15% sont en phase S et la majorité des cellules (82%) en phase G1 ; toutes les cellules ne sont donc pas synchronisées au départ (Figure 47).

Afin d'améliorer la synchronisation des cellules, une privation de SVF avant le traitement avec l'hydroxyurée est envisagée. Après une privation de SVF pendant 36h, suivie d'une incubation pendant 24h en présence d'hydroxyurée 2mM, les cellules sont détachées etensemencées à raison de 20 000 cellules/cm².

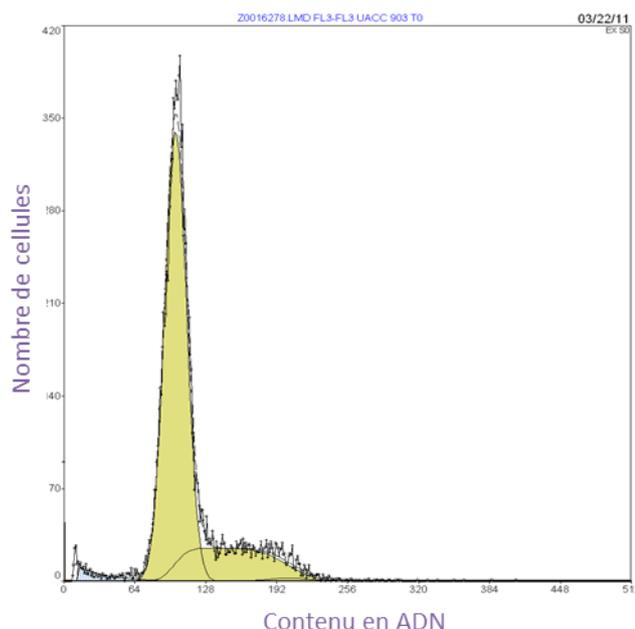


Figure 48 : Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules UACC 903 dans chacune des phases du cycle cellulaire au temps T0 après privation de SVF suivie du traitement avec l'hydroxyurée

L'étape supplémentaire de privation de SVF a permis d'améliorer la synchronisation des cellules UACC 903 puisque seulement 1% des cellules sont en phase G2 (Figure 48). Cependant, là encore, les cellules ne sont pas toutes synchronisées avec 22% des cellules en phase S au temps T0.

III-3-2-2-2/ Etude du cycle cellulaire en présence du domaine recombinant NC1 α 4(IV)

Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude cinétique de la répartition des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire après une incubation des cellules UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 α 4(IV) (10 μ g/mL) pendant 4h, 8h, 24h, 28h, 32h et 48h.

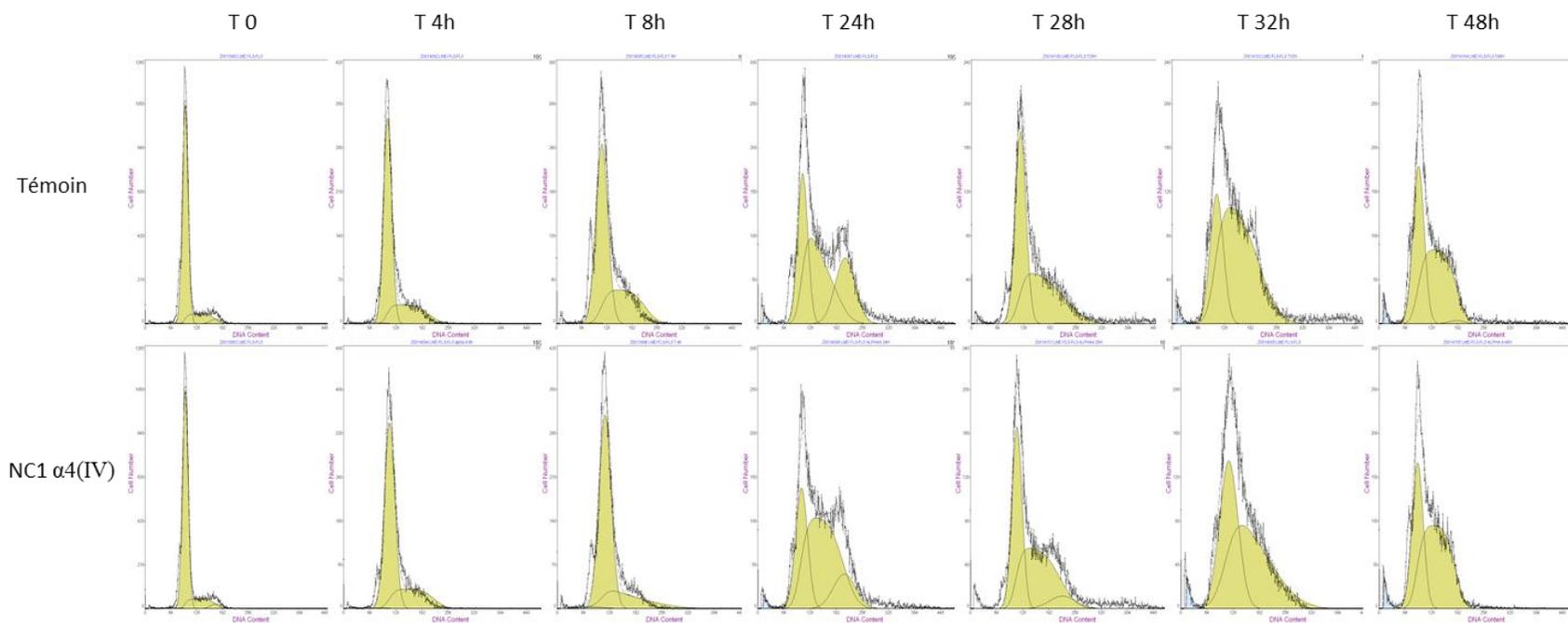


Figure 49 : Analyse par cytométrie en flux de la cinétique de répartition dans chacune des phases du cycle cellulaire des cellules UACC 903 incubées en présence du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Dès 8h, un léger retard des cellules incubées en présence de protéine recombinante à raison de 10 µg/mL est observé en phase G1. Ce retard se répercute au niveau de la phase S puis de la phase G2 après 24h d'incubation. En effet, 16% des cellules incubées en présence du domaine NC1 α4(IV) se trouve en phase G2 contre 25% des cellules témoins après 24h alors que 56% des cellules traitées sont encore en phase S contre 44% des cellules témoins (Figure 49).

Cependant, l'absence de temps intermédiaires entre 8h et 24h semble masquer le pic maximal du pourcentage de cellules témoins en phase S. Des temps intermédiaires sont donc nécessaires.

Pour observer une différence plus importante entre les deux populations, une concentration de protéine recombinante plus importante est envisagée. Après synchronisation, les cellules sont détachées etensemencées à raison de 20 000 cellules/cm² en présence de différentes concentrations de protéine recombinante et la prolifération est suivie sur 72h (Figure 50).

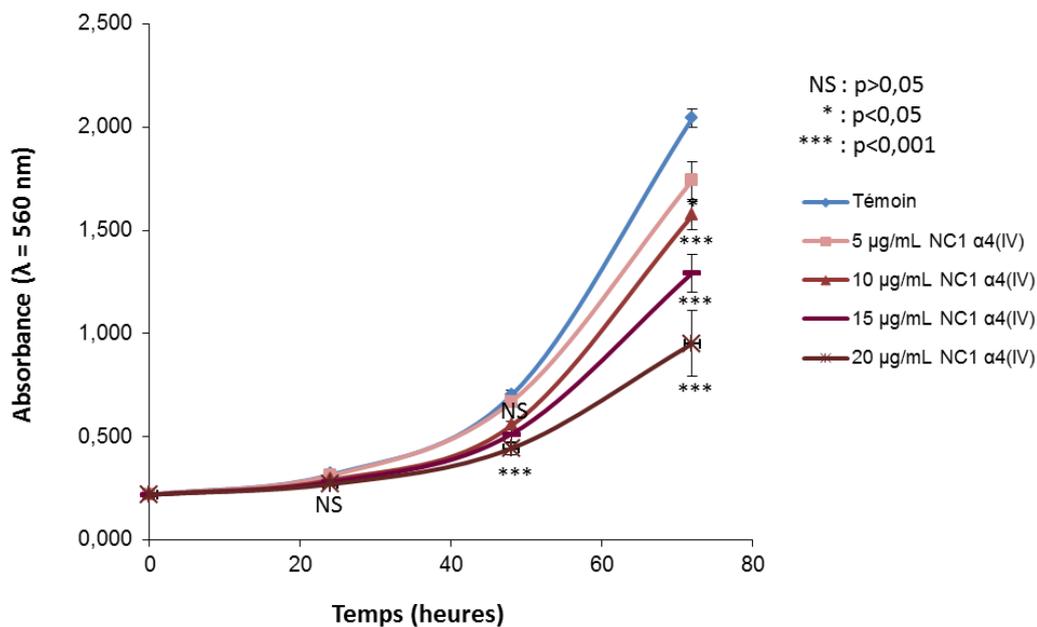


Figure 50 : Prolifération des cellules UACC 903 synchronisées en présence de différentes concentrations du domaine recombinant NC1 α4(IV)

Parallèlement, la viabilité cellulaire est déterminée par un test au bleu trypan pour chacune des concentrations. Après traitement avec NC1 α4(IV) à raison de 20 µg/mL, la viabilité cellulaire devient inférieure à 95% puisque 82% des cellules sont viables à cette concentration. Pour l'étude du

cycle cellulaire, nous utiliserons donc la concentration de 15 µg/mL, concentration pour laquelle la viabilité cellulaire est de 96%.

Nous avons réalisé une nouvelle étude cinétique de la répartition des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire après une incubation des cellules UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 α 4(IV) à raison de 15 µg/mL pendant 12h, 16h, 20h, 24h et 36h.

Les temps précoces (T 4h et T 8h) ne sont pas étudiés au cours de cette cinétique. Le léger retard en phase G1 des cellules incubées en présence de NC1 α 4(IV) (10 µg/mL), observé au temps T 8h au cours de l'analyse précédente n'est donc pas observable ici (Figure 51).

Le pourcentage maximal (56%) des cellules témoins en phase S est observé après 16h d'incubation. Pour les cellules incubées en présence du domaine recombinant (15 µg/mL), le pourcentage maximal (61%) des cellules en phase S est observé après 20h d'incubation. Ce retard se répercute au niveau de la phase G2 puisqu'après 20h d'incubation, 20% des cellules témoins se trouvent en phase G2 contre 12% des cellules traitées avec le domaine recombinant.

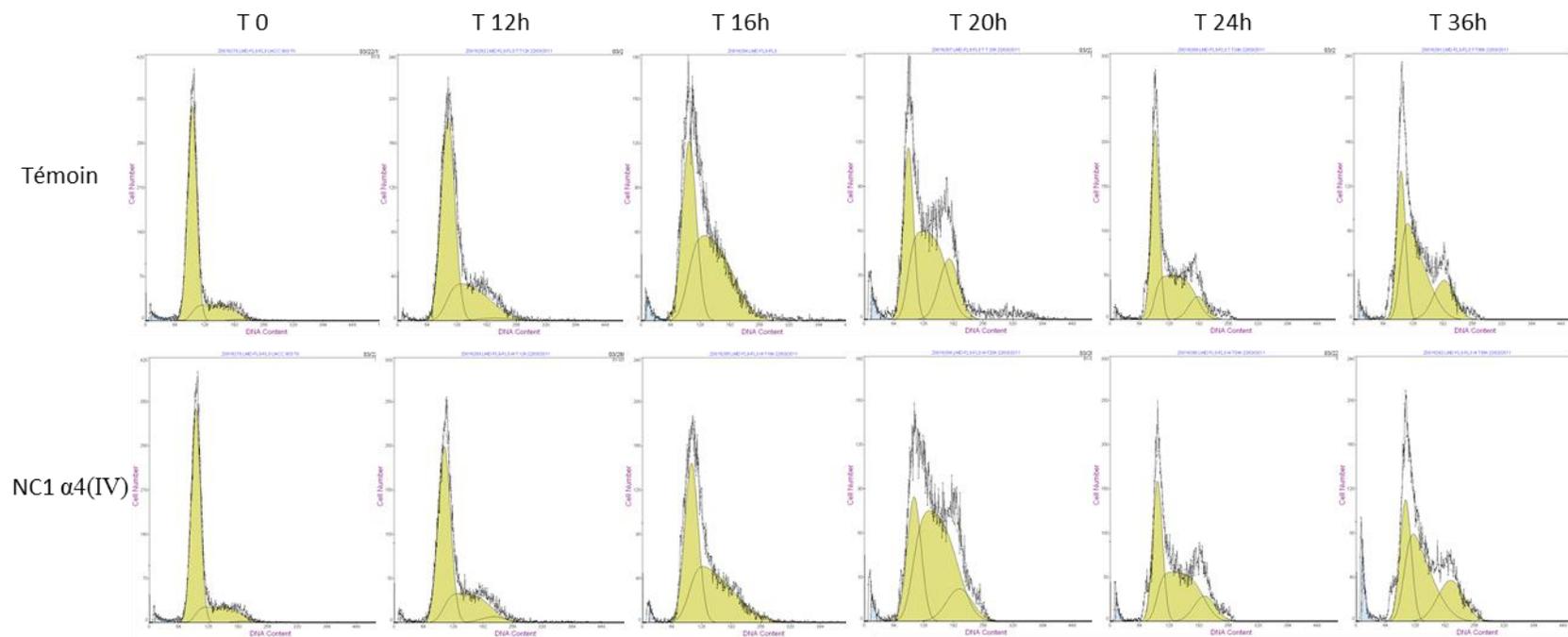
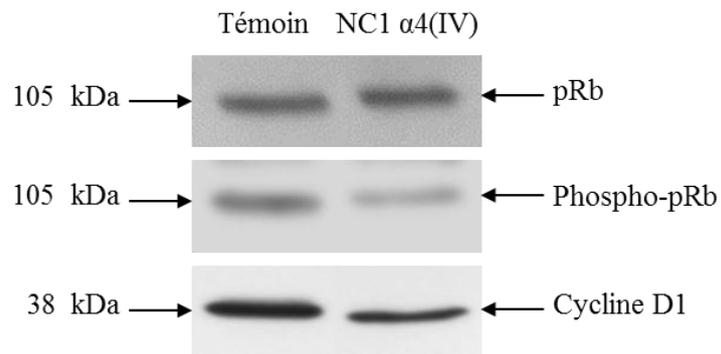


Figure 51 : Analyse par cytométrie en flux de la cinétique de répartition dans chacune des phases du cycle cellulaire des cellules UACC 903 incubées en présence du domaine recombinant NC1 α 4(IV) à raison de 15 μ g/mL

Le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ a donc un effet sur le cycle cellulaire. Il semble induire un ralentissement du cycle cellulaire des cellules de mélanome UACC 903 au niveau de la transition G1/S ce qui pourrait expliquer l'inhibition de la prolifération induite par le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$.

Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons réalisé des extraits nucléaires des cellules UACC 903 synchronisées et incubées pendant 20h en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ (15 $\mu\text{g/mL}$). Ces extraits ont été analysés par western-blot avec des anticorps dirigés contre différentes protéines contrôlant le cycle cellulaire : la cycline D1, la protéine Rb et son état de phosphorylation. En présence du domaine recombinant, on observe une diminution de l'expression de la cycline D1 de 33% et une inhibition de la phosphorylation de la protéine Rb de 48% (Figure 52).

A/



B/

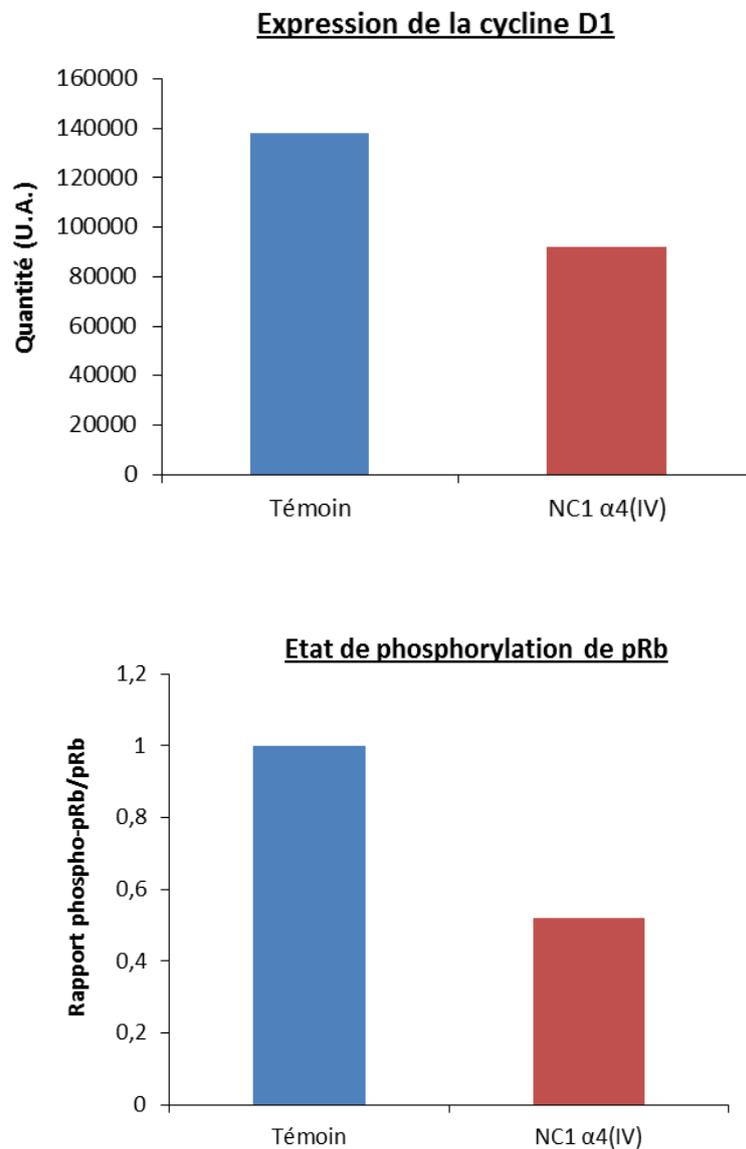


Figure 52 : Etude de l'expression de la cycline D1 et de l'état de phosphorylation de la protéine pRb analysés par western-blot (A) et quantification (B)

La surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ induit une inhibition de la prolifération mais également de la migration et de l'invasion des cellules UACC 903. Nous avons étudié l'effet du domaine recombinant sur les propriétés migratoires et invasives des cellules UACC 903.

III-3-3/ Inhibition de la migration en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$

Afin d'étudier la migration, les cellules UACC 903 ont étéensemencées en chambres de Boyden modifiées pendant 24h en présence ou absence du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ (10 $\mu\text{g/mL}$).

Le domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ induit une inhibition de 41% de la migration des cellules UACC 903 (Figure 53).

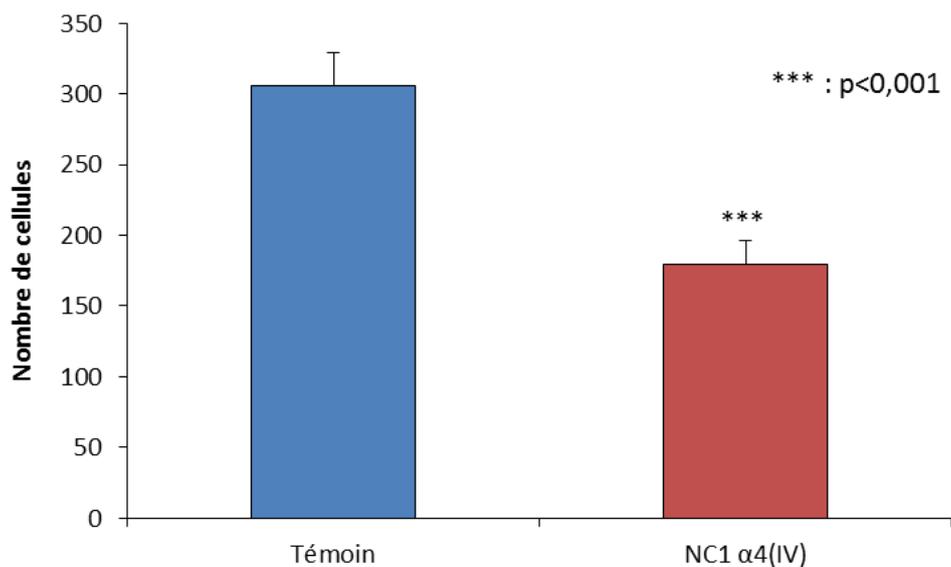


Figure 53 : Migration des cellules UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$ (10 $\mu\text{g/mL}$) étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 24 h

III-3-4/ Inhibition de l'invasion en présence du domaine NC1 α 4(IV)

L'invasion des cellules UACC 903 est étudiée en chambres de Boyden modifiées au travers d'un tapis de Matrigel[®], qui mime la matrice extracellulaire. Les cellules UACC 903 sont incubées pendant 72h en présence ou absence du domaine recombinant NC1 α 4(IV) à raison de 10 μ g/mL.

Le domaine recombinant NC1 α 4(IV) induit une inhibition de l'invasion des cellules UACC 903 de 53% (Figure 54).

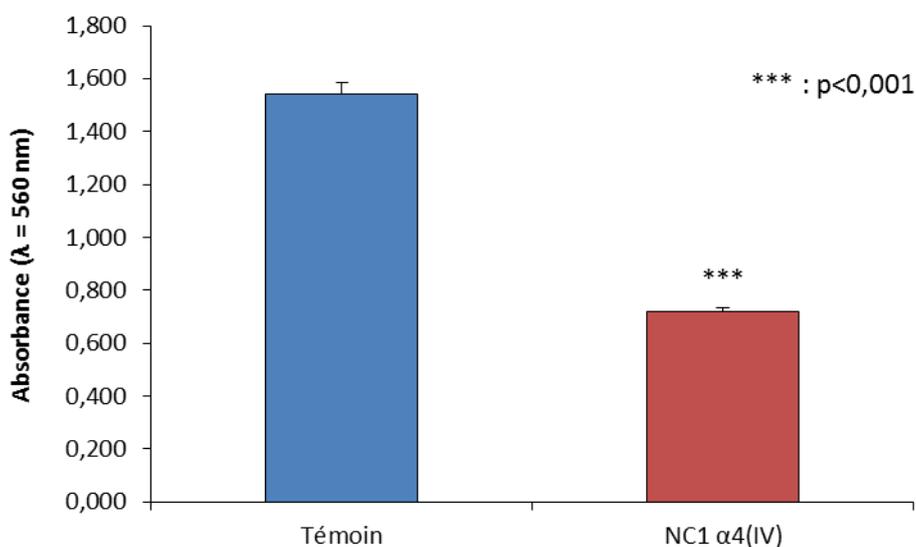


Figure 54 : Invasion des cellules UACC 903 en présence du domaine recombinant NC1 α 4(IV) (10 μ g/mL) étudiée en chambres de Boyden modifiées

III-3-5/ Etude des systèmes protéolytiques en présence du domaine NC1 α 4(IV)

L'étude des effets inhibiteurs de la tétrastatine obtenus par surexpression dans les cellules de mélanome transfectées n'avait montré aucune différence significative de sécrétion des gélatinases, des TIMPs et des activateurs du plasminogène. De façon similaire, nous avons étudié la sécrétion des gélatinases par zymographie, des TIMPs par zymographie reverse et d'uPA et de tPA par zymographie en gel de gélatine-plasminogène après 48h d'incubation des cellules UACC 903 sans SVF et en présence de NC1 α 4(IV) (10 μ g/mL). De

la même manière, l'incubation des cellules UACC 903 avec le domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ n'induit aucune différence significative de sécrétion de MMPs, de TIMPs ou des activateurs du plasminogène.

III-4/ Etude d'un récepteur potentiel du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$: l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

III-4-1/ Adhésion des cellules UACC 903 au domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$: dépendance des cations divalents

Des travaux antérieurs du laboratoire et d'autres équipes ont montré que les récepteurs de nombreux domaines NC1 des chaînes α du collagène IV sont des intégrines [Pasco, 2000a ; Maeshima, 2001 ; Hamano, 2005 ; Magnon, 2005 ; Roth, 2005 ; Sudhakar, 2005 ; Koskimaki, 2009]. Nous avons émis l'hypothèse que le récepteur du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ pouvait également être une intégrine. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un test d'adhésion des cellules UACC 903 en présence de cations divalents après une pré-incubation des cellules avec l'EDTA. En effet, la liaison d'une intégrine avec son ligand est dépendante des cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} .

L'incubation des cellules avec l'EDTA 5 mM empêche l'adhésion des cellules UACC 903 au substratum de domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ avec une inhibition de 86% et 84% après 30 minutes et 60 minutes d'adhésion respectivement par rapport aux cellules incubées dans du milieu contenant des ions Ca^{2+} et des ions Mg^{2+} . De plus, l'ajout de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} dans le milieu après une pré-incubation des cellules avec de l'EDTA rétablit les capacités d'adhérence des cellules au substratum de domaine recombinant NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ (Figure 55). L'adhésion des cellules UACC 903 au domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ dépend donc des cations divalents ce qui conforte l'hypothèse que le récepteur du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ pourrait être une intégrine.

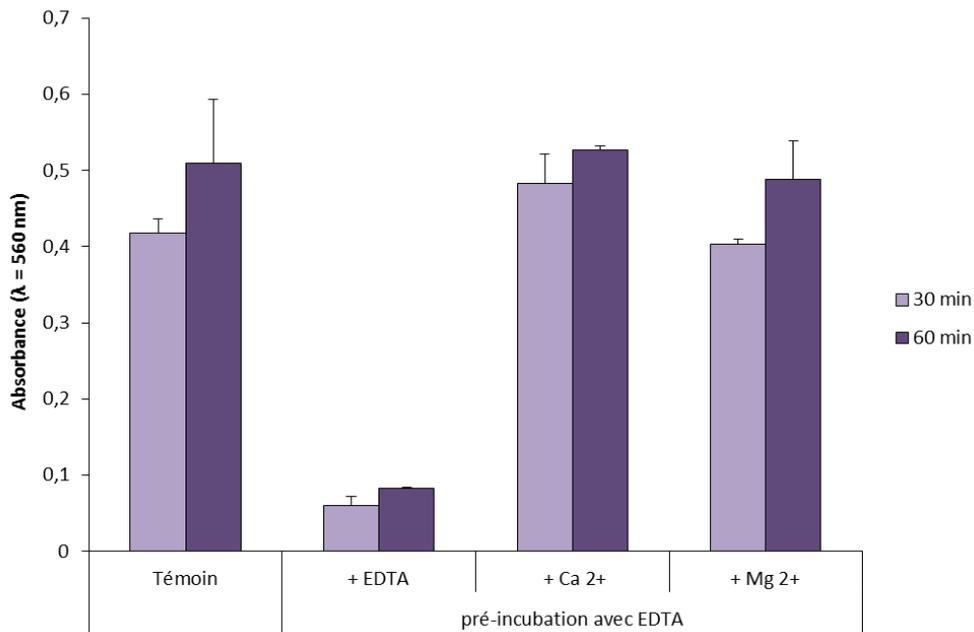


Figure 55 : Adhésion cations divalents-dépendante des cellules UACC 903 sur un substratum de domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$

III-4-2/ Expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules UACC 903

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été décrite pour être le récepteur de différents domaines NC1 de chaînes du collagène IV, notamment du domaine NC1 des chaînes $\alpha 2$ et $\alpha 3$ [Pasco, 2000a ; Roth, 2005]. Nous avons vérifié son expression à la surface des cellules UACC 903. Pour cela, les cellules UACC 903 sont incubées en présence d'un anticorps anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ (clone 23C6) couplé à l'Alexa Fluor 647. Le marquage est ensuite analysé par cytométrie en flux. Un marquage à l'iodure de propidium permet de discriminer les cellules viables. L'analyse montre que 72% des cellules UACC 903 viables sont marquées et expriment donc l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à leur surface (Figure 56).

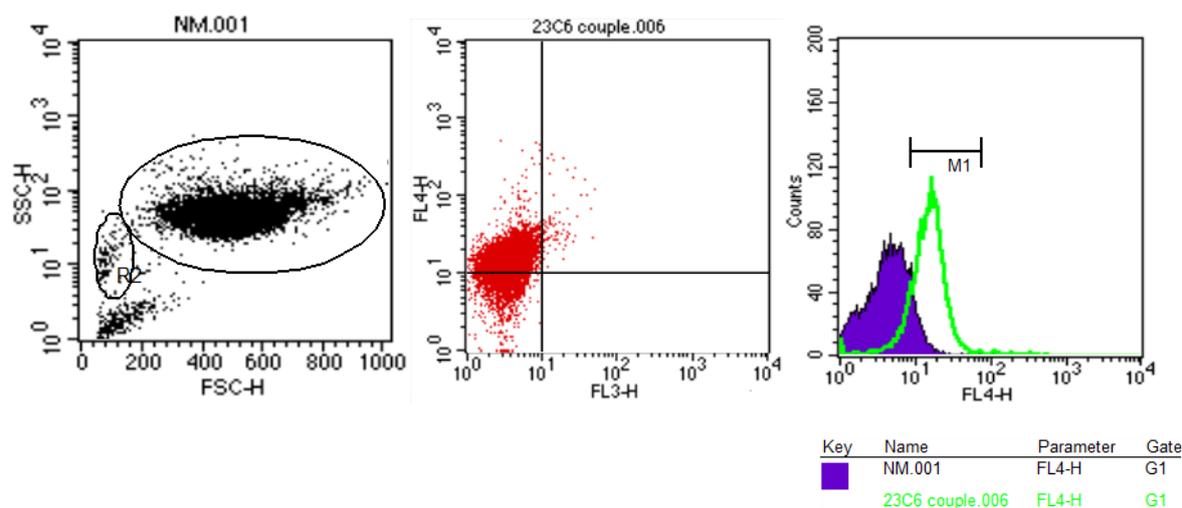


Figure 56 : Analyse par cytométrie en flux du marquage anti- $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules UACC 903

Nous avons également vérifié l'expression de cette intégrine à la surface des cellules A375, HT-144 et SK-Mel-28. Ces cellules expriment toutes l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ puisque 89% des cellules A375, 86% des cellules HT-144 et 94% des cellules SK-Mel-28 présentent un marquage analysé par cytométrie en flux.

Afin d'estimer le taux d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les cellules A375, HT-144, SK-Mel-28, UACC 903 et par les fibroblastes dermiques, des extraits protéiques totaux ont été réalisés et analysés par western-blot à l'aide d'anticorps anti-intégrine α_v et anti-intégrine β_3 (Figure 57A). Après quantification et normalisation par rapport à l'actine, nous observons que les cellules UACC 903 sont celles qui expriment le plus ces deux sous-unités d'intégrine. Les cellules HT-144 ont un taux d'expression de cette intégrine inférieure aux cellules UACC 903 mais supérieure aux cellules SK-Mel-28. Les fibroblastes dermiques et les cellules A375 expriment très peu ces intégrines par rapport aux autres cellules étudiées (Figure 57B). L'effet anti-prolifératif du domaine recombinant était maximal lorsque les cellules UACC 903 étaient le modèle d'étude. Dans le cas des cellules HT-144, cette inhibition de la prolifération était plus faible que dans les cellules UACC 903 mais plus importante que dans les cellules SK-Mel-28. Aucun effet anti-prolifératif n'a été démontré sur les cellules A375 et les fibroblastes dermiques, exprimant peu l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il existe donc une corrélation directe entre le taux d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et l'effet du domaine recombinant.

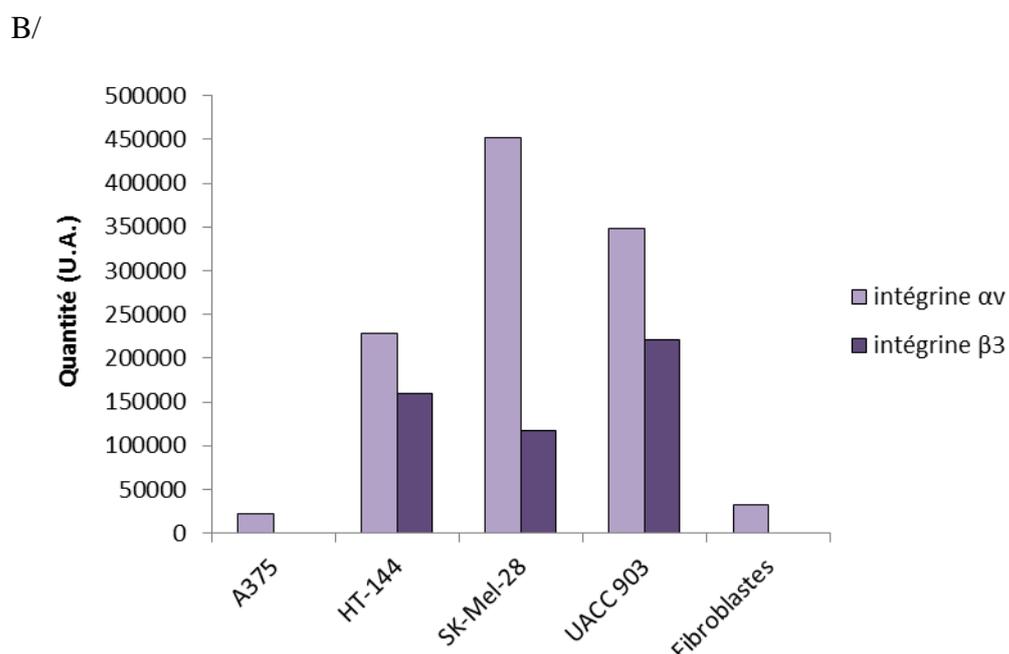
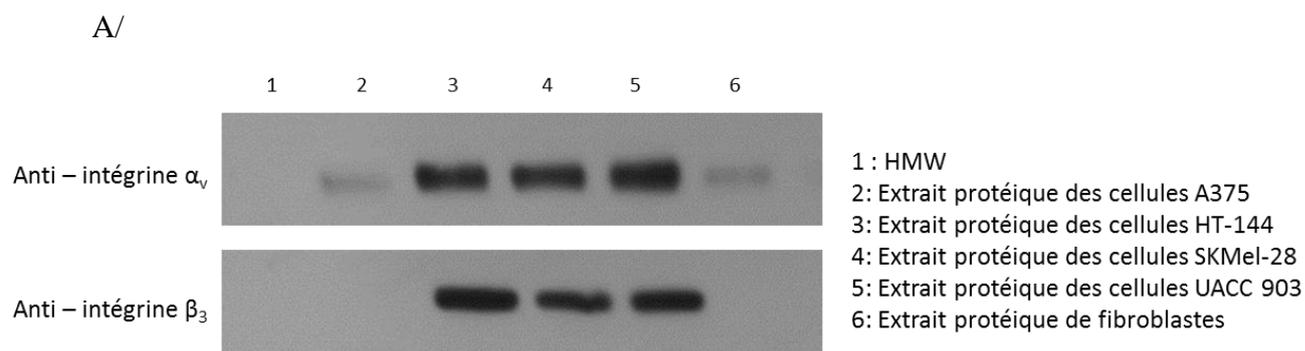


Figure 57 : Western-blot anti-intégrine α_v et anti-intégrine β_3 sur les extraits protéiques de différents types cellulaires (A) et quantification (B)

III-4-3/ Inhibition de l'adhésion des cellules UACC 903 au domaine NC1 α_4 (IV) en présence d'anticorps bloquant

Pour conforter l'hypothèse proposant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme un récepteur de la tétrastatine, nous avons réalisé des tests d'adhésion des cellules UACC 903 sur un substratum de domaine NC1 α_4 (IV) en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais aussi d'anticorps bloquant la sous-unité d'intégrine β_1 (Figure 58). L'incubation préalable des cellules UACC 903 avec l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induit une inhibition de

l'adhésion des cellules au domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ de 38%. L'adhésion des cellules au domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ semble donc se faire au moins en partie *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

En présence de l'anticorps bloquant la sous-unité d'intégrine β_1 , il existe également une inhibition de l'adhésion de 39%. Il semble donc que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ne soit pas le seul récepteur potentiel du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ à la surface des cellules UACC 903 mais que la sous-unité d'intégrine β_1 intervienne également.

De plus, l'incubation préalable des cellules avec les deux anticorps bloquants induit une inhibition de l'adhésion de 62%. Cet effet additif semble montrer que le domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ peut se lier à plusieurs intégrines, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais aussi au moins une intégrine impliquant la sous-unité β_1 .

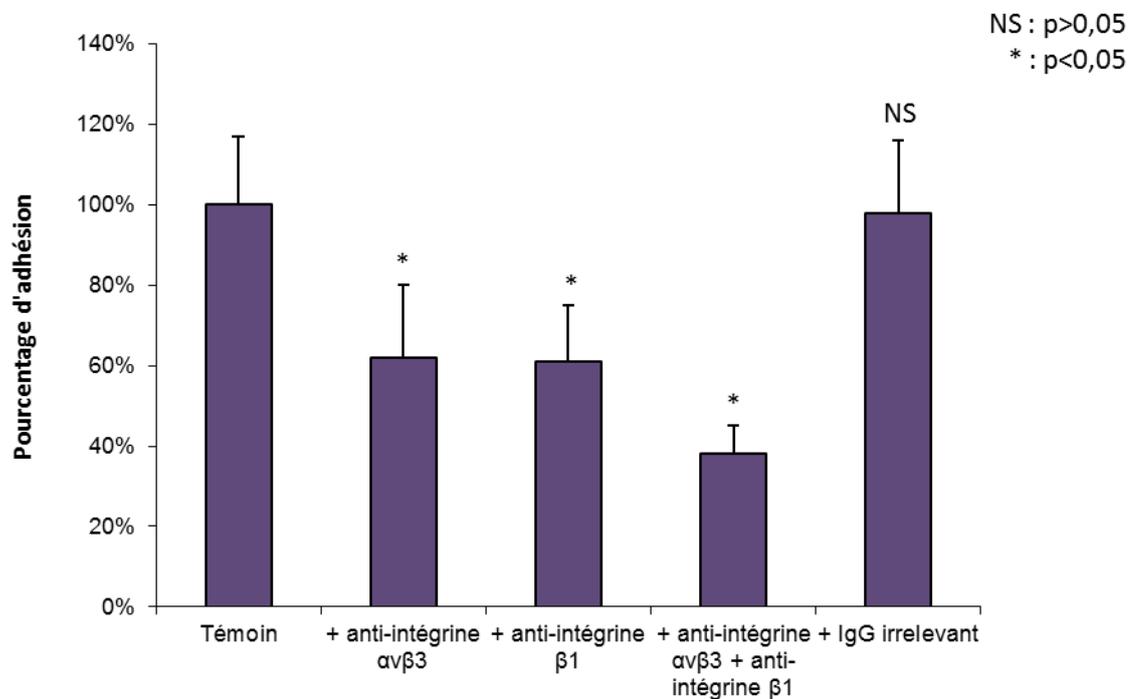


Figure 58 : Etude de l'adhésion des cellules UACC 903 sur le domaine recombinant NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et/ou la sous-unité d'intégrine β_1

III-4-4/ Interaction du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Afin de confirmer l'interaction du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, nous avons réalisé une étude d'interaction entre ces deux protéines en résonance plasmonique de surface qui permet par ailleurs de calculer la constante apparente d'affinité (K_D). Cette étude a été menée à Lyon en collaboration avec le Pr Sylvie Ricard-Blum sur l'appareil Biacore T100 de l'UMS 344.

Dans cette étude, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est immobilisée sur une « sensor chip » CM5 et l'analyte, le domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$, est injecté à différentes concentrations. Le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ se lie à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ selon un modèle à deux états : d'abord la formation d'un complexe entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ qui se réarrange ensuite en un complexe plus stable. L'injection rapide d'EDTA 10 mM dissocie ce complexe, corrélant ainsi les résultats précédents qui mettaient en évidence la dépendance de la liaison à la présence de cations divalents. La constante apparente d'affinité est de $148,15 \pm 9,54$ nM, ce qui reflète une affinité modérée de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ (Figure 59).

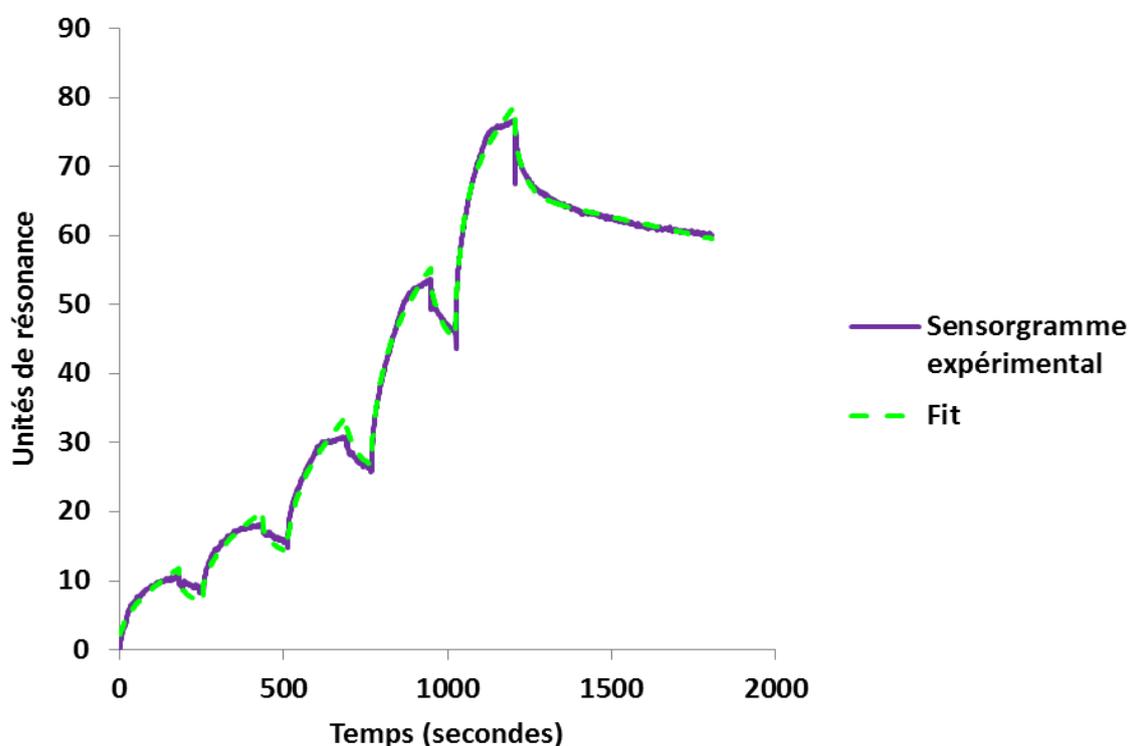


Figure 59 : Etude de l'interaction du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par résonance plasmonique de surface

Une seconde étude où l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est immobilisée sur une « sensor chip » CM5 a été réalisée. Le domaine NC1 $\alpha_4(IV)$ semble capable de se lier à cette intégrine selon un modèle à deux états réactionnels également (Figure 60). L'affinité du domaine pour cette intégrine est plus faible que pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ puisque la constante apparente d'affinité entre le domaine NC1 $\alpha_4(IV)$ et l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est de 425 nM.

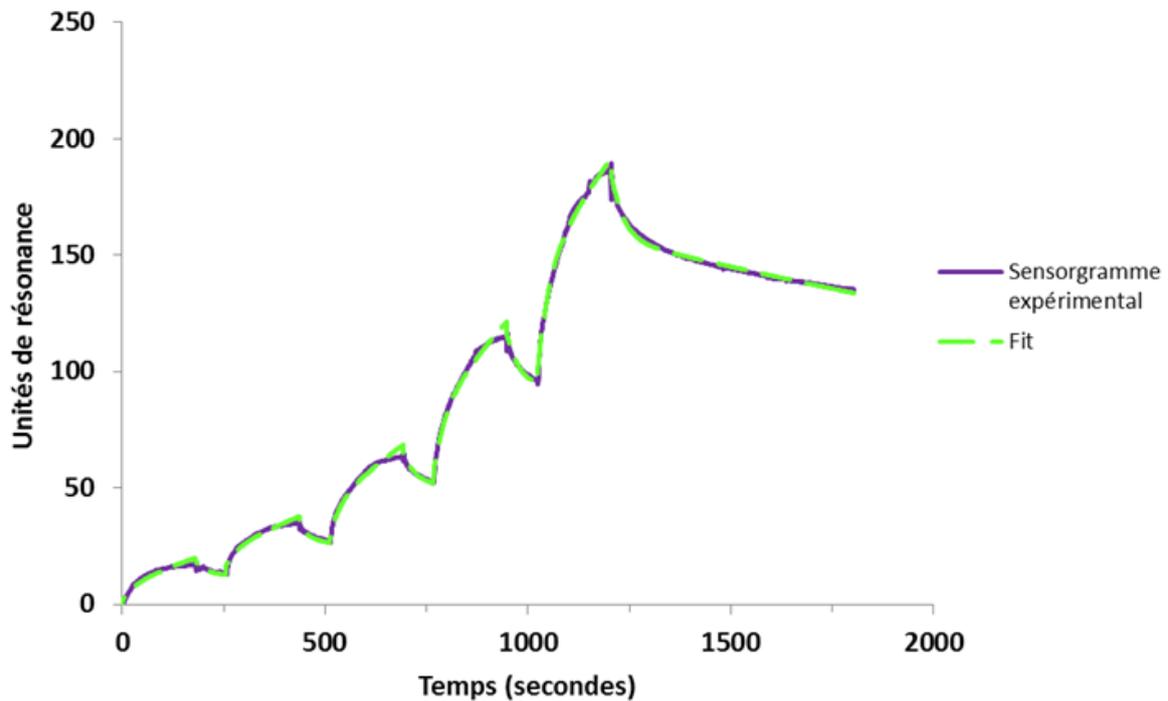


Figure 60 : Etude par résonance plasmonique de surface de l'interaction du domaine NC1 $\alpha_4(IV)$ injecté à plusieurs concentrations avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ immobilisée

III-4-5/ Etude de la prolifération et de l'invasion en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la sous-unité d'intégrine β_1

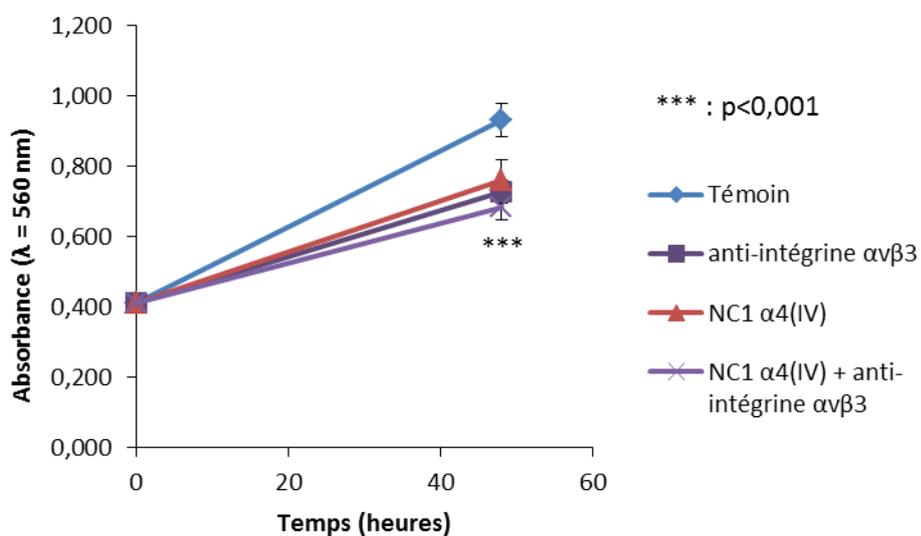
III-4-5-1/ Prolifération en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou la sous-unité d'intégrine β_1

Afin de confirmer si l'interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et/ou avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est (sont) à l'origine des effets biologiques observés, nous avons étudié la prolifération des cellules UACC 903 soit en présence du domaine NC1 α_4 (IV) à raison de 10 $\mu\text{g/mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, soit en présence du domaine NC1 α_4 (IV) à raison de 10 $\mu\text{g/mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant la sous-unité d'intégrine β_1 .

L'inhibition de prolifération induite par la tétrastatine est retrouvée lors de l'incubation préalable des cellules avec l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En présence de la tétrastatine (10 $\mu\text{g/mL}$), la prolifération est inhibée de 20% après 48h de culture. L'incubation préalable des cellules UACC 903 avec l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induit à elle seule une inhibition de la prolifération de 22%. Par ailleurs, cet effet n'est pas additif puisque la prolifération des cellules en présence de tétrastatine, après l'incubation préalable des cellules avec l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, est inhibée de 25% (Figure 61A). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ semble donc intervenir dans l'inhibition de la prolifération induite par la tétrastatine.

En revanche, cet effet anti-prolifératif n'est pas retrouvé lors de l'incubation préalable des cellules UACC 903 avec l'anticorps bloquant la sous-unité β_1 . En effet, cette seule incubation avec l'anticorps bloquant la sous-unité β_1 n'a aucun effet significatif sur la prolifération de ces cellules. En revanche, la prolifération des cellules de mélanome est inhibée lors de l'incubation avec la tétrastatine, qu'il y ait eu pré-incubation avec l'anticorps bloquant ou non (Figure 61B). Ainsi, bien que la tétrastatine soit capable d'interagir avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, celle-ci ne semble pas être médiatrice de l'activité biologique.

A/



B/

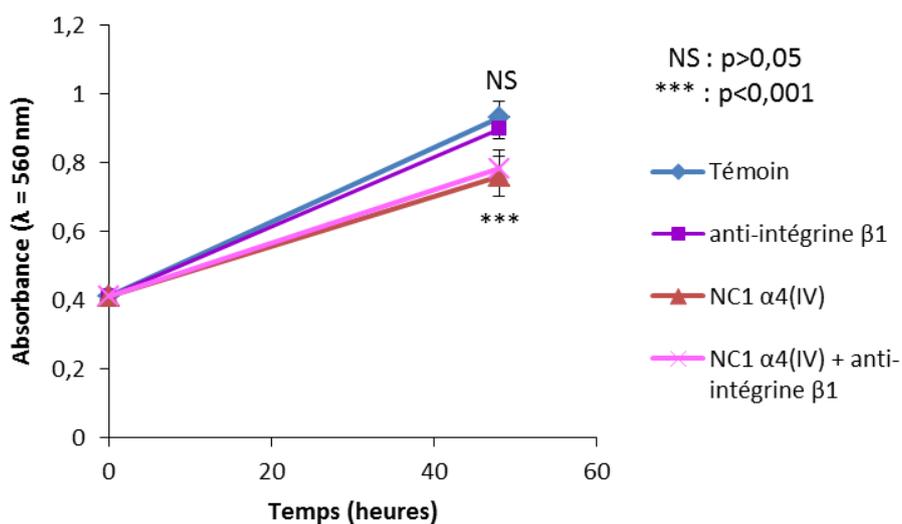


Figure 61 : Prolifération des cellules UACC 903 pendant 48h soit en présence du domaine NC1 $\alpha_4(IV)$ à raison de $10 \mu\text{g/mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (A) soit en présence du domaine NC1 $\alpha_4(IV)$ à raison de $10 \mu\text{g/mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant la sous-unité d'intégrine β_1 (B)

III-4-5-2/ Invasion en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Les propriétés invasives des cellules UACC 903 ont également été étudiées en présence d'un anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et/ou du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$.

En présence de l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, l'invasion est inhibée de 32% et de 44% lors de l'incubation en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$. L'anticorps bloquant reproduit donc les effets du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$. De plus, l'incubation des cellules en présence de l'anticorps bloquant puis en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ inhibe l'invasion des cellules de 52%. Il n'y a pas de différence significative d'inhibition entre l'incubation avec l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et/ou en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ (Figure 62). Il semble donc que l'effet anti-invasif observé soit dû à l'interaction entre le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

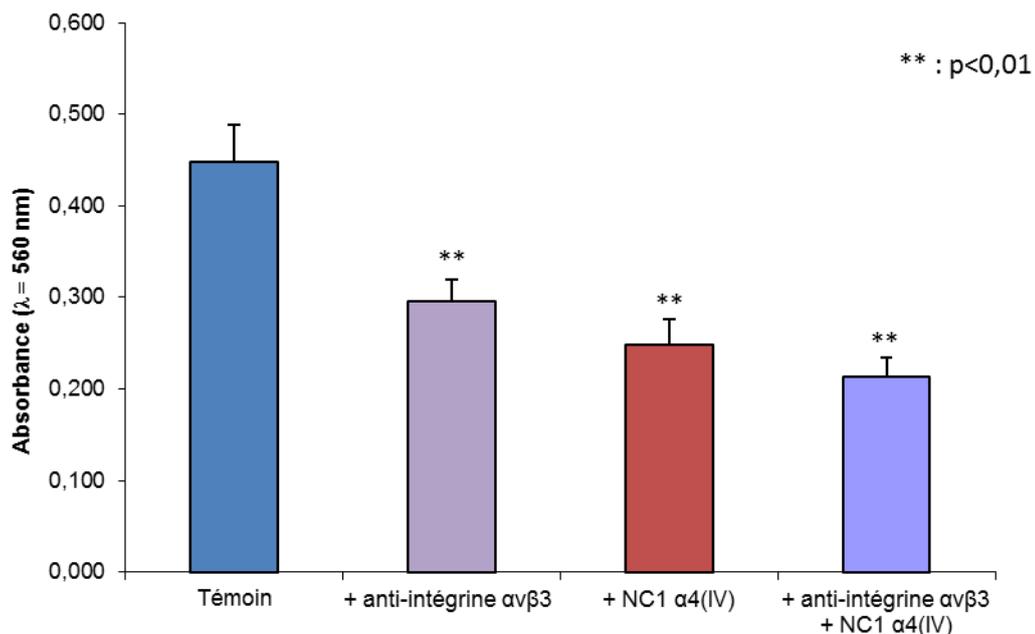


Figure 62 : Invasion des cellules UACC 903 en présence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ à raison de 10 $\mu\text{g/mL}$ et/ou de l'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 72h

III-5/ Etude de la séquence active du domaine NC1 α 4(IV)III-5-1/ Mise en évidence de la sécrétion de la protéine 3xFLAG-NC1 α 4(IV) [180-229] par les cellules de mélanome

La tumstatine, domaine NC1 α 3(IV), exerce son activité anti-tumorale par l'intermédiaire d'une séquence peptidique localisée dans sa partie C-terminale (résidus 185-203) [Pasco, 2000a]. De la même façon, nous avons voulu déterminer si la (ou les) séquence(s) active(s) de la tétrastatine se situait(ent) dans la partie C-terminale du domaine NC1 α 4(IV). Pour cela, les cellules UACC 903 ont été transfectées au sein de notre laboratoire avec le plasmide p3xFLAG-CMV-9 contenant ou non la séquence codant pour NC1 α 4(IV) [180-229]. Les clones ont été caractérisés par le Dr Jessica Thevenard par RT-PCR à l'aide des amorces spécifiques du plasmide p3xFLAG-CMV-9 de part et d'autre du multi-site de clonage. Une bande de 336 pb apparaît dans les cellules UACC 903 transfectées par le plasmide p3xFLAG contenant l'insert codant le domaine NC1 α 4(IV) [180-229] ce qui montre que les cellules UACC 903 ont bien incorporé ce plasmide (Figure 63).

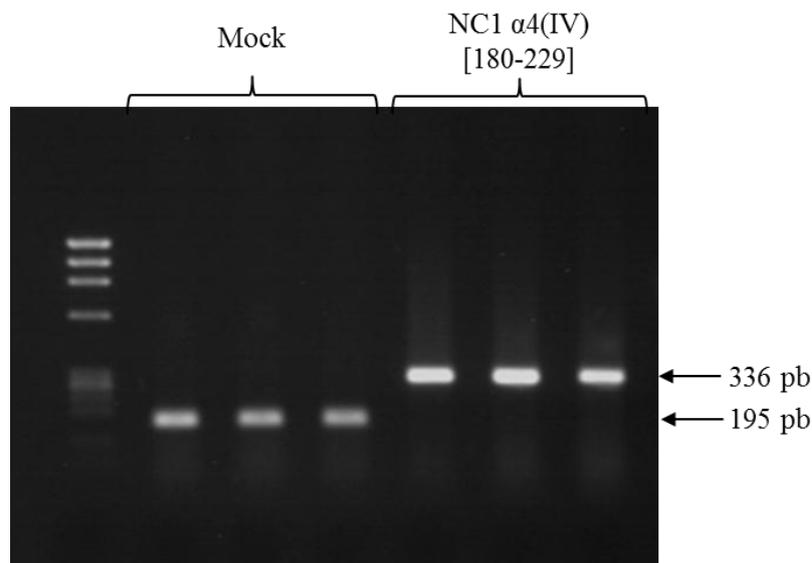


Figure 63 : Caractérisation par PCR des clones UACC 903 transfectés par le plasmide p3xFLAG-CMV-9 contenant ou non la séquence codant le domaine NC1 α 4(IV)[180-229]

Les clones Mock 1 et NC1 α 4C2 ont été choisis pour l'étude des propriétés anti-tumorales du domaine NC1 α 4(IV) [180-229] *in vivo* dans un modèle de xéno greffe de mélanome humain chez la souris athymique (paragraphe III-5-2). Après 48h de culture sans SVF, les milieux de culture des cellules UACC 903 Mock 1 et NC1 α 4C2 sont récoltés. Les protéines présentes dans ces milieux sont précipitées par l'acétone avant d'être analysées par western-blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre le domaine NC1 α 4(IV). Après révélation, une bande d'environ 9 kDa apparaît dans la piste correspondant au milieu de culture des cellules UACC 903 NC1 α 4C2 alors qu'aucune bande n'apparaît dans celle correspondant au milieu des cellules Mock 1 (Figure 64). Ainsi, la sécrétion du domaine NC1 α 4(IV) [180-229] a été mise en évidence dans les milieux de culture des cellules NC1 α 4C2.

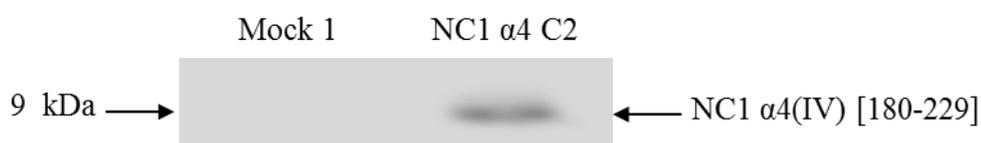


Figure 64 : Mise en évidence de la sécrétion du domaine NC1 α 4(IV)[180-229] dans le milieu de culture des cellules UACC 903

III-5-2/ Effets biologiques de la surexpression du domaine NC1 α 4(IV)[180-229]

L'effet *in vitro* de la surexpression du domaine NC1 α 4(IV) [180-229] sur la prolifération et l'invasion des cellules UACC 903 a été étudié par le Dr J Thevenard. La surexpression du domaine NC1 α 4(IV) [180-229] induit une inhibition de prolifération pendant 72h de 42 % et une inhibition des propriétés invasives pendant 72h de 86 %. Ces résultats suggéraient bien que la (ou les) séquence(s) active(s) se situaient dans cette partie C-terminale de la tétrastatine. Nous avons fait synthétiser des peptides contenant les séquences d'intérêt.

In vivo, l'effet de la surexpression du domaine NC1 α 4(IV) [180-229] a été étudié dans un modèle de xéno greffes de mélanome humain chez la souris athymique. Pour cela, 5.10^6 cellules UACC 903 Mock ou surexprimant le domaine NC1 α 4(IV) [180-229] ont été injectées en sous-cutané au niveau du flanc gauche de l'animal. L'évolution des tumeurs est

sui vie pendant 26 jours. Cependant, aucune inhibition de la croissance tumorale n'a été observée (Figure 65).

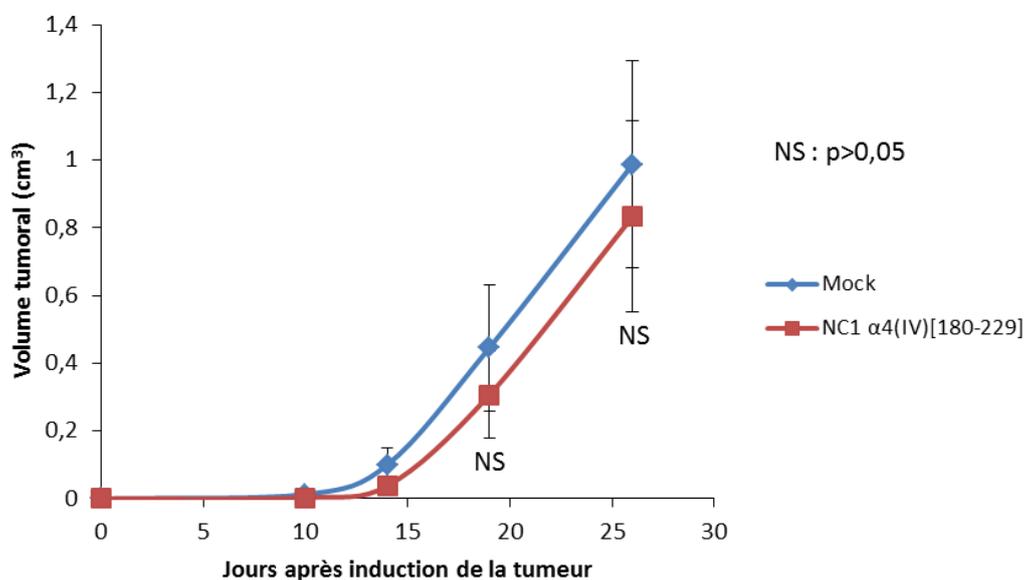


Figure 65 : Evolution du volume tumoral de xénogreffes de mélanome humain après injection de cellules UACC 903 surexprimant ou non le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ [180-229] en sous-cutané chez la souris nude

III-5-3/ Etude de la prolifération et de l'invasion des cellules UACC 903 en présence du peptide AR-50

Le peptide AR-50 correspond à la séquence du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ [167-216] comprenant notamment la séquence de la tétrastatine-3 (NC1 $\alpha 4(IV)$ [167-185]), décrite comme potentiellement anti-angiogénique [Karagiannis, 2007].

Nous avons étudié la prolifération des cellules UACC 903 en présence de ce peptide. Aucune différence de prolifération n'a été montrée en présence du peptide AR-50 (40 μM) (Figure 66).

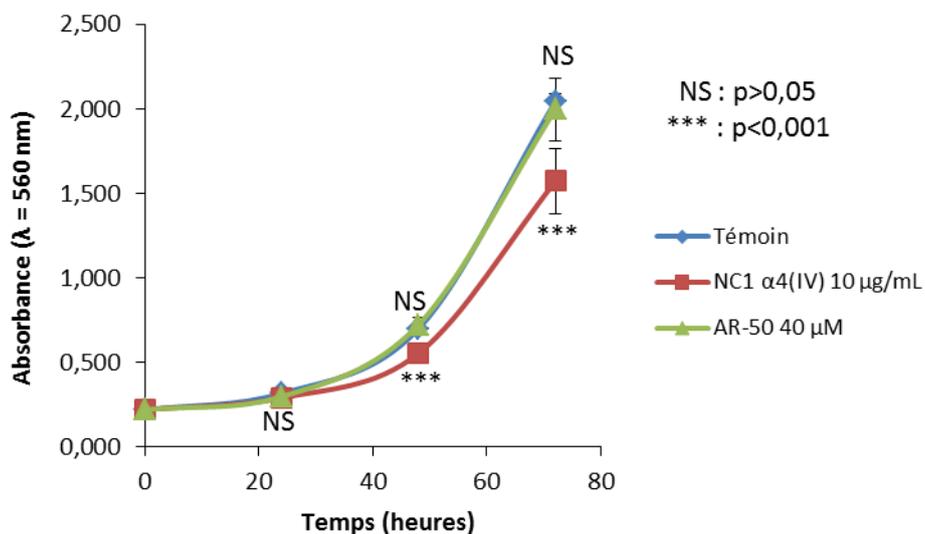


Figure 66 : Prolifération des cellules UACC 903 en présence de 40 µM de peptide AR-50

L'invasion des cellules UACC 903 a été étudiée en chambres de Boyden modifiées en présence de différentes concentrations du peptide AR-50. Aucune différence significative des propriétés invasives des cellules UACC 903 en présence du peptide AR-50 n'a été démontrée (Figure 67).

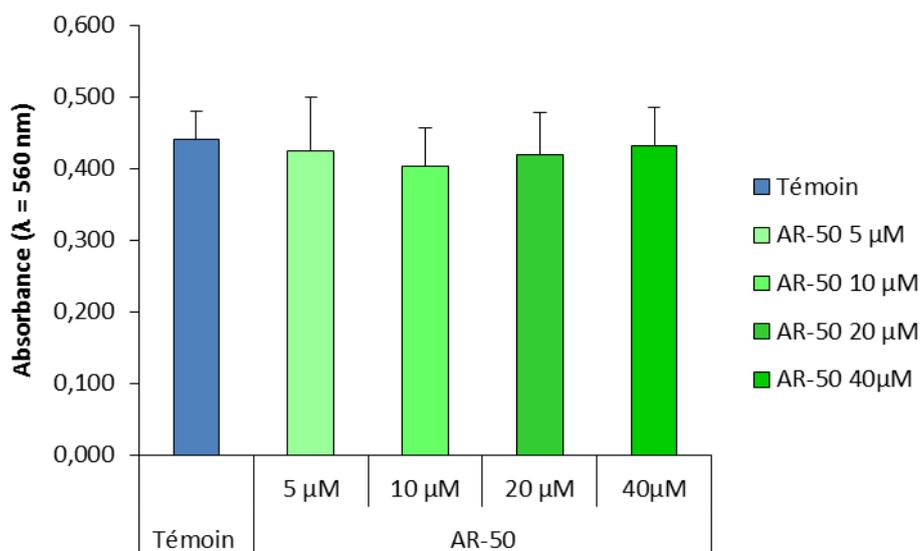


Figure 67: Invasion des cellules UACC 903 étudiée en chambres de Boyden modifiées pendant 72h en présence de différentes concentrations du peptide AR-50

III-5-4/ Etude de la prolifération et de l'invasion des cellules UACC 903 en présence du peptide CS-50

Le peptide CS-50 correspond à la séquence NC1 α 4(IV) [180-229], séquence surexprimée par les cellules UACC 903 transfectées. Nous avons étudié l'effet de ce peptide sur la prolifération et l'invasion des cellules UACC 903.

En présence du peptide CS-50, la prolifération des cellules UACC 903 est inhibée de 38% après 72h en présence de peptide CS-50 40 μ M (Figure 68). La viabilité cellulaire a été vérifiée en parallèle par un test au bleu trypan et est supérieure à 95%. Ce peptide contient donc une séquence qui inhibe la prolifération des cellules UACC 903 comme nous l'avons observé avec le domaine NC1 α 4(IV) complet.

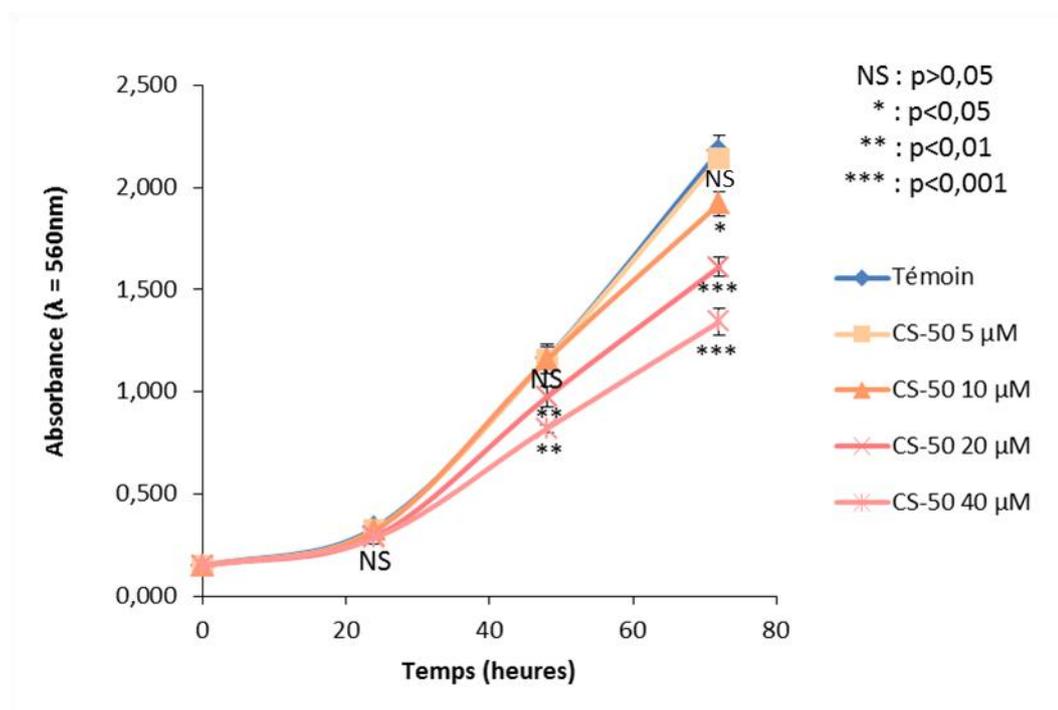


Figure 68 : Prolifération des cellules UACC 903 pendant 72h en présence de différentes concentrations de peptide CS-50

L'invasion des cellules UACC 903 a également été étudiée en chambre de Boyden modifiée en présence de peptide CS-50 à raison de 40 μ M. Nous observons une inhibition de l'invasion de 60% des cellules UACC 903 en présence de ce peptide (Figure 69). Le peptide CS-50 reproduit également l'inhibition de l'invasion des cellules UACC 903 observée en présence du domaine NC1 α 4(IV) complet.

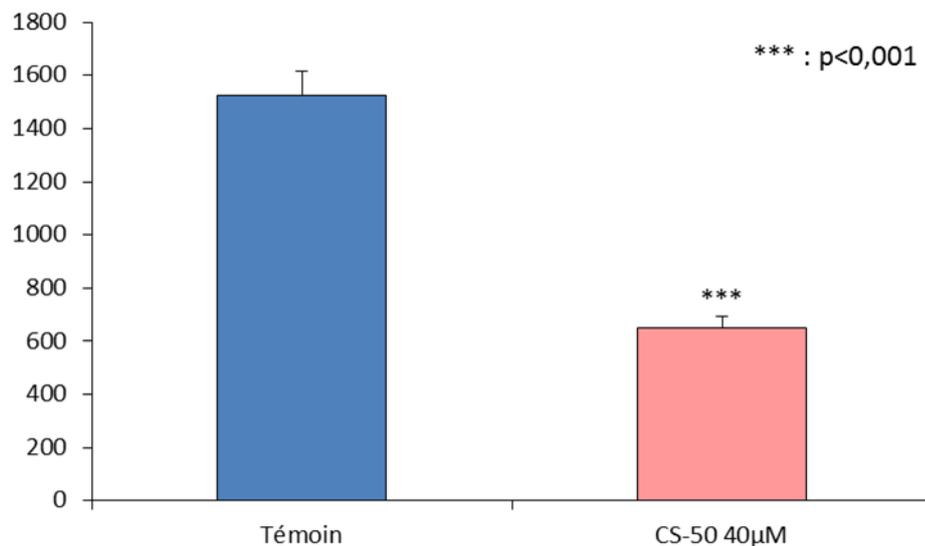


Figure 69: Invasion des cellules UACC 903 étudiée en chambre de Boyden modifiée en présence de 40 μ M de peptide CS-50 pendant 72h

Le peptide AR-50 (NC1 α 4(IV) [167-216]) n'a pas d'effet alors que le peptide CS-50 (NC1 α 4(IV)[180-229]) reproduit les effets du domaine NC1 α 4(IV) complet. Ces peptides ne diffèrent que par la séquence [216-229] : QKISRCQVCVKYS, qui semble indispensable à l'activité biologique du domaine NC1 α 4(IV). Un peptide de 20 acides aminés contenant cette séquence est en cours de synthèse et de validation de son activité biologique.

IV - Discussion

IV/Discussion

Longtemps considérée comme un simple support, la matrice extracellulaire est en réalité une source d'interactions qui modifient, par exemple, le comportement des cellules tumorales. Au cours de l'invasion, le remodelage de la matrice extracellulaire et notamment des membranes basales permet la libération de fragments capables d'exercer une activité biologique, appelés matrikines. Diverses matrikines dérivées du collagène de type IV ont été décrites pour leur activité anti-angiogénique et/ou anti-tumorale, notamment les domaines NC1 des différentes chaînes α du collagène de type IV.

Les domaines NC1 des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$ et $\alpha 3(\text{IV})$, respectivement appelés arrestène, canstatine et tumstatine, ont été décrits pour leurs propriétés anti-tumorales dans divers modèles de cancers *in vivo*. Ainsi, une inhibition d'environ 80% de la croissance tumorale est induite par l'injection du domaine NC1 $\alpha 1(\text{IV})$ dans un modèle de xénogreffes de tératocarcinome [Sudhakar et coll., 2005]. Dans un modèle de cancer humain ovarien, la croissance tumorale est inhibée de 50% par le domaine NC1 $\alpha 2(\text{IV})$ [Roth et coll., 2005]. Le domaine NC1 $\alpha 3(\text{IV})$ inhibe la croissance tumorale de 60% dans un modèle de xénogreffes de carcinome prostatique humain, de 44% dans un modèle de xénogreffes de carcinome rénal [Maeshima et coll., 2000] et de 60% dans un modèle de mélanome murin [Pasco et coll., 2004]. Cependant, aucune activité anti-tumorale n'avait été décrite à ce jour pour le domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ [Petitclerc et coll., 2000]. Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que ce domaine exerce une activité anti-tumorale dans un modèle de mélanome humain.

Afin d'étudier les propriétés anti-tumorales de la tétrastatine, deux stratégies ont été adoptées : d'une part, la surexpression de la tétrastatine par des cellules de mélanome humain et d'autre part, l'utilisation de la protéine recombinante qui permet de s'assurer que les effets observés ne sont pas dus au stress post-transfection. La production de la protéine recombinante est réalisée dans un système procaryote mais sa faible solubilité ne permet pas de la produire en grande quantité. De ce fait, il est difficile d'obtenir une quantité utilisable importante du domaine d'intérêt.

IV-1/ Inhibition de la croissance tumorale *in vivo*

Afin d'étudier l'activité anti-tumorale potentielle du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, nous avons mis en place un modèle de xénogreffes de mélanome humain chez la souris athymique en injectant en sous-cutané 5.10^6 cellules de mélanome UACC 903 par souris. Ce modèle permet

d'obtenir des tumeurs à croissance relativement lente pour pouvoir suivre leur évolution pendant 26 jours. Les immunomarquages anti-NC1 α 4(IV) réalisés sur les coupes de tumeur (Figure 38) permettent de vérifier que le domaine d'intérêt est bien produit par les cellules tumorales et non par les cellules stromales. Cette surexpression induit une forte inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (-80%).

Elle peut être en partie expliquée par l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales surexprimant la tétrastatine. Le marquage des tumeurs avec un anticorps dirigé contre Ki-67 montre une diminution du nombre de cellules prolifératives. Cependant, l'inhibition de prolifération de 30% ne suffit pas à elle-seule pour expliquer l'inhibition de la croissance tumorale observée.

Les tumeurs surexprimant la tétrastatine paraissent moins agressives car elles montrent une croissance essentiellement horizontale. De plus, très peu de cellules cancéreuses ont envahi le stroma, contrairement aux tumeurs Mock, comme nous pouvons l'observer sur les coupes de tumeurs (Figure 36C). Les deux principales cascades protéolytiques responsables de l'invasion tumorale sont les MMPs et le système d'activation du plasminogène. L'expression des MMP-2 et MMP-9 n'est pas modifiée, de même que l'expression des TIMP-1 et TIMP-2, ainsi que celle de l'uPA et du tPA, comme nous l'avons montré avec les zymogrammes réalisés sur les extraits protéiques préparés à partir des tumeurs. L'expression de la MMP-14, étudiée par immunomarquages, ne semble pas modifiée au sein des deux groupes de tumeurs. L'inhibition de l'invasion pourrait s'expliquer par une diminution de la MMP-14 active à la surface cellulaire comme c'est le cas *in vitro*. Pour compléter notre étude, un marquage spécifique de la forme active de la MMP-14 peut être envisagé.

IV-2/ Effet sur l'angiogenèse *in vivo*

La plupart des matrikines dérivées des domaines NC1 α (IV) exercent des propriétés anti-angiogéniques à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cependant, aucune activité anti-angiogénique *in vivo* n'a été décrite pour le domaine NC1 α 4(IV) complet [Petitclerc et coll., 2000]. En revanche, des peptides dérivés de ce domaine, à savoir la tétrastatine-1, la tétrastatine-2 et la tétrastatine-3, sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération de cellules endothéliales ainsi que leur migration induite par le VEGF et présentent donc des propriétés anti-angiogéniques *in vitro*. [Karagiannis et Popel, 2007]. L'étude de la vascularisation des tumeurs Mock ou surexprimant la tétrastatine, par immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-vWF, montre

que le nombre de vaisseaux tend à diminuer, bien que de façon non significative, dans les tumeurs surexprimant la tétrastatine (Figure 41).

Dans ces tumeurs, les vaisseaux sont soulignés par une bande fibreuse et leur diamètre tend à être plus important. Pour expliquer ce dernier point, deux hypothèses peuvent être envisagées. D'une part, le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ peut permettre le recrutement de péricytes entraînant une stabilisation plus importante des vaisseaux. D'autre part, les cellules Mock, plus invasives, peuvent dégrader la couche fibreuse entourant les néovaisseaux. Les vaisseaux néoformés dans les tumeurs surexprimant la tétrastatine seraient plus stables et moins perméables que ceux formés dans les tumeurs contrôles. Ainsi, les nutriments acheminés par les néovaisseaux diffuseraient de façon moindre dans les tumeurs surexprimant la tétrastatine ce qui expliquerait en partie l'inhibition de la croissance tumorale.

Dans le modèle de xénogreffes utilisées, une couche fibreuse se forme autour de la tumeur (Figure 36B). Elle est plus large autour des tumeurs surexprimant la tétrastatine, pouvant contribuer à limiter l'invasion tumorale comme cela a été montré pour des cancers bronchiques [Polette et coll., 1997]. Par ailleurs, on observe des cellules tumorales dans les tissus périphériques des souris Mock, contrairement aux souris surexprimant la tétrastatine. Il est possible que le domaine NC1 $\alpha 4(IV)$ influence la sécrétion de collagène par les fibroblastes proches de la tumeur mais également par les cellules tumorales elles-mêmes. Des fibroblastes dermiques humains ont été incubés pendant 48h en présence ou non de la tétrastatine. Aucune différence de sécrétion de collagène de type I n'a été montrée. Il en est de même pour les cellules UACC 903 surexprimant ou non la tétrastatine. La tétrastatine pourrait également induire l'expression par les cellules tumorales d'un facteur stimulant la production de collagène I par les fibroblastes. L'incubation de fibroblastes dermiques humains en présence de milieux conditionnés provenant de cellules UACC 903 surexprimant ou non la tétrastatine n'a pas non plus permis de mettre en évidence de différence d'expression de collagène I par ces fibroblastes (Figure 37).

Bien que les souris athymiques soient dépourvues d'immunité acquise, l'immunité innée est présente. Ceci implique potentiellement un rôle de la composante inflammatoire sur la croissance des tumeurs surexprimant ou non la tétrastatine. Afin d'expliquer l'inhibition de croissance des tumeurs observée *in vivo*, il semble également nécessaire d'étudier l'influence de la tétrastatine sur les cellules inflammatoires.

IV-3/ Inhibition de la croissance tumorale *in vitro*

Pour déterminer le mécanisme d'action anti-tumoral du domaine NC1 $\alpha 4(IV)$, définir les caractéristiques des cellules transfectées et reproduire les effets observés avec ces cellules, une étude *in vitro* a été menée suivant deux approches : la surexpression de la tétrastatine par les cellules de mélanome ou l'utilisation du domaine recombinant NC1 $\alpha 4(IV)$. Cette dernière approche présente l'avantage de pouvoir réaliser des études d'interactions avec le(s) récepteur(s) potentiel(s) et permet d'exclure les phénomènes cellulaires liés au stress post-transfection.

Les propriétés invasives des cellules ont été étudiées en modèle de chambres de Boyden modifiées. La surexpression de la tétrastatine dans les cellules de mélanome UACC 903 induit une inhibition de leurs propriétés invasives. Cette inhibition de l'invasion est également retrouvée lors de l'incubation des cellules en présence de tétrastatine recombinante. Afin d'expliquer cette inhibition, nous nous sommes intéressés aux principales cascades protéolytiques. Aucune modification de l'expression et de l'activation de MMP-2 n'a été observée en présence de tétrastatine. L'expression de TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3 ne varie pas en présence de tétrastatine, de même que l'expression de tPA et uPA. La tétrastatine n'a donc pas d'effet direct sur l'expression de ces protéases matricielles.

La MMP-14 est une métalloprotéase fortement impliquée dans la progression tumorale. Elle exerce son activité biologique *via* différents modes d'action. Elle est capable de dégrader la matrice extracellulaire par son action propre mais participe également directement à l'activation d'autres cascades protéolytiques impliquant notamment la MMP-2 et le TIMP-2. De plus, la MMP-14 est une « sheddase » capable de cliver par exemple le récepteur du hyaluronane qui peut promouvoir la migration cellulaire [Kajita et coll., 2001]. L'activité de la MMP-14 est également régulée par sa capacité à être internalisée par endocytose soit par des vésicules recouvertes de clathrine, soit par des caveolae au niveau de radeaux lipidiques [Osenkowski et coll., 2004]. Ainsi, la MMP-14 apparaît comme une protéase clé de l'invasion tumorale. La surexpression de la tétrastatine n'a pas d'effet sur son expression, comme nous l'avons montré par RT-PCR et western-blot (Figures 31 et 32). En revanche, son activation est fortement inhibée lors de la surexpression de la tétrastatine. De même, sa localisation est modifiée. On observe une perte de la MMP-14 et de la cavéoline-1 au niveau du front de migration des cellules UACC 903 surexprimant la tétrastatine (Figure 34). Ces résultats mettent en évidence la perte du phénotype migratoire des cellules UACC 903 lors de la surexpression de la tétrastatine. En effet, la colocalisation de la MMP-14

et de la cavéoline indique que la MMP-14 est présente au niveau de radeaux lipidiques. Après internalisation, une partie de la MMP-14 est transportée jusqu'aux lysosomes pour être dégradée tandis que l'autre partie est recyclée à la membrane [Itoh, 2006].

IV-4 Inhibition de la prolifération *in vitro*

La surexpression du domaine NC1 $\alpha 4$ (IV) dans les cellules de mélanome UACC 903 induit une inhibition de leur prolifération de 30% après 48h de culture. Cet effet anti-prolifératif est retrouvé lors de l'ajout du domaine recombinant NC1 $\alpha 4$ (IV) dans le milieu de culture des cellules UACC 903 non transfectées. Ceci prouve que l'effet anti-prolifératif observé lors de la surexpression n'est pas dû à un stress des cellules causé par la transfection elle-même. Cette inhibition de la prolifération *in vitro* explique les effets anti-prolifératifs observés dans les tumeurs *in vivo*.

Les matrikines dérivées des domaines NC1 α (IV) inhibent la prolifération de cellules tumorales par un phénomène de cytotoxicité, observé notamment dans le cas de la pentastatine-1 [Koskimaki et coll., 2010], ou par l'induction de l'apoptose observée dans le cas de la séquence 185-203 de la tumstatine. Cette séquence inhibe la prolifération de cellules de cancer gastrique *via* la voie Fas [Li et coll., 2009]. La canstatine induit un phénomène de sénescence des cellules endothéliales, ainsi que leur apoptose [Kamphaus et coll., 2000 ; Roth et coll., 2005]. Dans notre étude, le domaine recombinant NC1 $\alpha 4$ (IV) ne diminue pas la viabilité des cellules aux concentrations utilisées. De même, la surexpression du domaine n'induit pas l'apoptose des cellules UACC 903 [Thevenard, 2007]. L'effet anti-prolifératif du domaine NC1 $\alpha 4$ (IV) n'est donc pas dû à une induction de l'apoptose, ni à un phénomène de cytotoxicité du domaine mais suggère plutôt un blocage du cycle cellulaire. L'étude du cycle cellulaire des cellules UACC 903 cultivées en présence de la tétrastatine, réalisée en cytométrie en flux, montre un ralentissement du cycle cellulaire dès la phase G1/S. En effet, le pourcentage maximum de cellules en phase S est retrouvé après 20h d'incubation en présence de tétrastatine (15 $\mu\text{g/mL}$) contre 16h d'incubation en présence de milieu seul (Figure 51). Un tel effet sur le cycle de cellules tumorales a été décrit pour les peptides correspondant aux séquences 185-203 et 63-83 de la tumstatine. Un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 est induit après 24h d'incubation de cellules de cancer gastrique SCG-7901 avec ces peptides. Les auteurs ont en effet montré qu'environ 50% et 55% des cellules non traitées ou traitées en présence d'un peptide contrôle étaient en phase G1 contre environ 70% et

68% des cellules traitées respectivement avec les peptides correspondant aux séquences 185-203 et 63-83 après 24h de culture [Li et coll., 2009].

Pour notre étude sur le cycle cellulaire, les cellules UACC 903 ont été synchronisées par privation de SVF pendant 36h et incubation avec de l'hydroxyurée 2 mM pendant 24h. Ces incubations aboutissent à un pourcentage d'environ 80% de cellules synchronisées. La synchronisation des cellules n'est pas totale. Afin de l'améliorer, d'autres méthodes seront envisagées, comme la synchronisation par double blocage à la thymidine [Ma et Poon, 2011].

Afin de conforter l'hypothèse de l'induction d'un blocage du cycle cellulaire en phase G1, nous avons étudié les variations d'expression ou de phosphorylation de protéines impliquées dans la régulation de cette phase. La tétrastatine provoque une diminution de la cycline D1, cycline nécessaire à la progression des cellules dans la phase G1, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de la protéine Rb (Figure 52). Ces résultats confirment ceux obtenus par le Dr Jessica Thevenard avec les cellules transfectées. Elle avait montré au cours d'une étude préliminaire une diminution de la phosphorylation de la protéine Rb ainsi qu'une forte augmentation de l'expression de la protéine p21 dans les cellules surexprimant la tétrastatine [Thevenard, 2007].

IV-5/ Etude du récepteur potentiel

La plupart des domaines NC1 α (IV) exercent leur activité anti-tumorale et/ou anti-angiogénique en se fixant sur des récepteurs membranaires de la famille des intégrines. L'arrestène se fixe sur l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ des cellules endothéliales et inhibe la phosphorylation de FAK conduisant à l'inactivation des voies Raf/Merk/Erk1/2/p38 MAPK aboutissant ainsi à la formation de pseudotubes [Sudhakar et coll., 2005]. Plusieurs récepteurs ont été décrits pour la canstatine, tous sont des intégrines : les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_1\beta_1$, et $\alpha_v\beta_5$ [Magnon et coll., 2005 ; Roth et coll., 2005]. La tumstatine interagit avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de manière RGD-indépendante et RGD-dépendante [Pasco et coll., 2000b; Maeshima et coll., 2001b ; Hamano et Kalluri, 2005]. Le récepteur potentiel de la pentastatine-1, peptide dérivé du domaine NC1 α_5 (IV), est également une intégrine impliquant la sous-unité β_1 [Koskimaki et coll., 2009], tandis que le récepteur de l'hexastatine n'a pas encore été décrit.

Sur la base de ces données du laboratoire et de la bibliographie, nous avons émis l'hypothèse que le récepteur du domaine NC1 α_4 (IV) pouvait être une intégrine. L'interaction d'une intégrine avec son ligand dépend des cations divalents, essentiellement Ca^{2+} et Mg^{2+} [Barczyk et coll., 2010]. L'adhésion des cellules UACC 903 sur un substratum de

NC1 $\alpha 4(IV)$ dépend des cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} . Elle est totalement abolie par la présence d'EDTA, chélateur de cations divalents. Ces premiers résultats confortent notre hypothèse.

De plus, nous avons étudié le rôle éventuel de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme récepteur de la tétrastatine. Pour cela, par cytométrie en flux, nous avons tout d'abord vérifié son expression à la surface des cellules de mélanome UACC 903 ainsi que sur les autres lignées de mélanome (A375, HT-144 et SK-Mel-28) utilisées au cours de cette thèse. Nous avons ensuite évalué par western-blot son taux d'expression par chacune de ces lignées. Toutes les lignées cellulaires de mélanome testées expriment cette intégrine. La tétrastatine inhibe la prolifération cellulaire de ces lignées de mélanome humain avec des intensités variables et il existe une corrélation directe entre le taux d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et l'effet anti-prolifératif observé. Plus le taux d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est élevé, plus l'inhibition de la prolifération est importante (Figure 70).

Les fibroblastes dermiques expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ plus faiblement que les cellules de mélanome et leur prolifération n'est pas modifiée en présence de tétrastatine. Ces résultats prouvent que l'inhibition de la prolifération par la tétrastatine ne s'exerce pas de façon exclusive sur les cellules UACC 903 mais également sur d'autres lignées de mélanome. De plus, la tétrastatine semble inhiber de façon spécifique les cellules tumorales sans affecter les fibroblastes du stroma environnant.

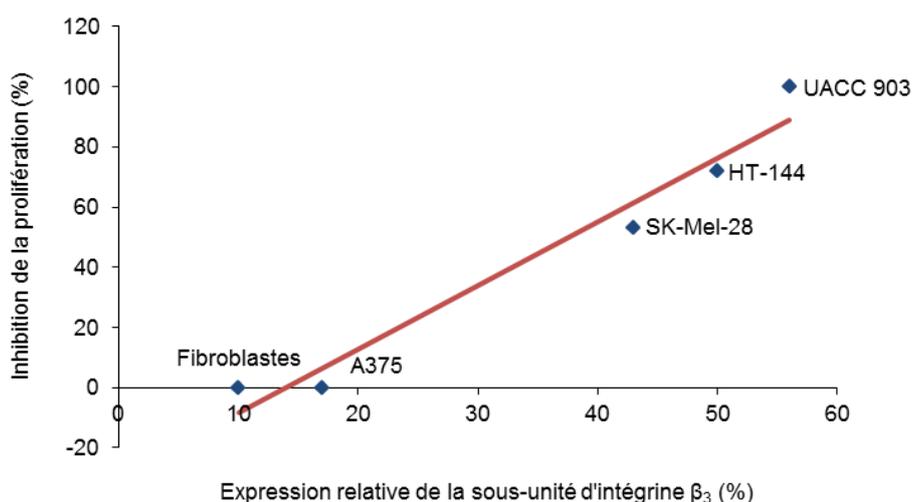


Figure 70 : Corrélation entre l'expression relative de la sous-unité d'intégrine β_3 et l'inhibition de la prolifération observée chez les fibroblastes, les cellules A375, SK-Mel-28, HT-144 et UACC 903 après 72h d'incubation en présence de tétrastatine (20 $\mu g/mL$)

Ces résultats sont à rapprocher d'études précédentes qui ont montré que des peptides dérivés du domaine NC1 $\alpha 3(\text{IV})$ exerce un effet anti-prolifératif par leur liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans différentes lignées de mélanome alors qu'aucun effet n'a été montré sur la prolifération de fibroblastes dermiques [Han et coll., 1997 ; Pasco et coll., 2000b].

Afin de confirmer l'hypothèse proposant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme un récepteur de la tétrastatine, l'adhésion des cellules UACC 903 sur un substratum de tétrastatine en présence d'anticorps bloquant cette intégrine a été étudiée. L'adhésion est inhibée (- 38%) en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ainsi qu'en présence d'anticorps bloquant la sous-unité d'intégrine β_1 (- 39%). Cet effet inhibiteur est additif lors de l'incubation en présence des deux anticorps bloquants (- 62%). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est donc en partie responsable de l'adhésion des cellules au substratum de tétrastatine. Une seconde intégrine de type β_1 pourrait aussi être impliquée. L'étude de l'interaction par résonance plasmonique de surface montre que le domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ se fixe sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ selon un modèle à deux états réactionnels et une affinité modérée ($K_D = 148,15 \pm 9,54$ nM). Nous avons également montré que ce domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ se fixe aussi sur l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ toujours selon un modèle à deux états mais avec une affinité moindre ($K_D = 425$ nM).

Pour confirmer le rôle de ces intégrines comme récepteurs de la tétrastatine à l'origine des effets biologiques observés, une étude fonctionnelle a été réalisée en présence d'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et d'anticorps bloquant la sous-unité d'intégrine β_1 . L'anticorps bloquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ reproduit l'effet anti-prolifératif et anti-invasif de la tétrastatine. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ apparaît comme un récepteur de la tétrastatine. En revanche, l'anticorps anti- β_1 n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules UACC 903. Même si cette intégrine fixe la tétrastatine, elle ne semble pas être médiatrice de l'activité biologique.

IV-6/ Détermination de la séquence active

L'activité anti-tumorale de la tumstatine réside dans une séquence localisée dans la partie C-terminale du domaine [Han et coll., 1997]. Afin d'étudier la(es) séquence(s) active(s) du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$, nous avons émis l'hypothèse que celle(s)-ci pouvait(ent) se trouver dans la partie C-terminale. Pour cela, des constructions et des transfections avec la partie C-terminale de la tétrastatine ont été utilisées. La surexpression du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ [180-229] reproduit les effets anti-prolifératif et anti-invasif de la tétrastatine *in vitro*, confirmant ainsi notre hypothèse. *In vivo*, l'inhibition de la croissance tumorale n'est pas retrouvée. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées : (i) la production du domaine NC1 $\alpha 4(\text{IV})$ [180-

229] est trop faible pour exercer un effet *in vivo*; (ii) sa durée de vie est plus courte en raison d'une dégradation plus rapide ; (iii) la séquence surexprimée ne contient qu'une partie de la séquence active ou une seconde séquence est impliquée.

Pour mieux cerner la(es) séquence(s) active(s), deux peptides synthétiques ont été testés (Figure 71). Le premier, appelé AR-50, correspond à la séquence NC1 α 4(IV)[167-216] et comprend la séquence correspondant à la tétrastatine-3 (NC1 α 4(IV)[167-185]), précédemment décrite pour son activité anti-angiogénique *in vitro* [Karagiannis et Popel, 2007]. Ce peptide n'a induit aucune inhibition de la prolifération ou de l'invasion des cellules UACC 903 *in vitro*. La séquence de ce peptide ne contient donc pas la séquence active ou la totalité de la séquence responsable des effets anti-tumoraux de la tétrastatine. En revanche, le second peptide, nommé CS-50, correspondant à la séquence [180-229] de la tétrastatine inhibe la prolifération et l'invasion *in vitro*. Il semble donc qu'au moins une séquence active de la tétrastatine se trouve dans la séquence [180-229] du domaine NC1 α 4(IV).

Ces deux peptides étudiés ne diffèrent que par la séquence [216-229] : KESQAQRQKISRCQVCVKYS. Cette séquence semble donc indispensable à l'activité biologique de la tétrastatine et des expériences sont en cours pour le démontrer.

NC1 α 4(IV) [1-229]:

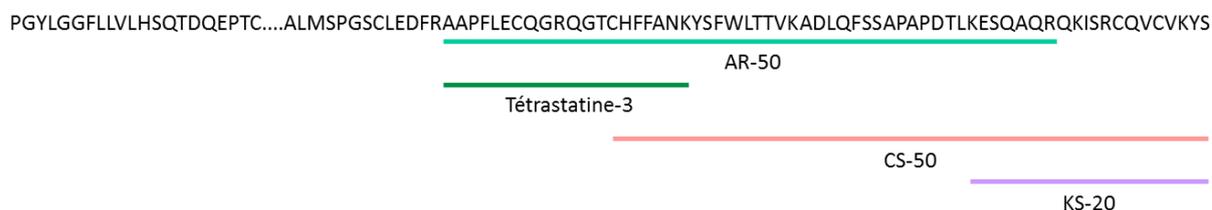


Figure 71 : Schéma représentant les séquences des différents peptides testés

V - Conclusions
Et
Perspectives

V/ Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons montré, dans un modèle expérimental de mélanome *in vitro* et *in vivo*, que la tétrastatine est une nouvelle matrikine à fort potentiel anti-tumoral. Cet effet anti-tumoral résulte d'une inhibition de la prolifération et des propriétés invasives des cellules de mélanome mais d'autres phénomènes semblent impliqués qui n'ont pu être élucidés.

In vitro, nous avons montré que l'effet anti-prolifératif de la tétrastatine s'exerce par un ralentissement du cycle cellulaire en phase G1/S. Afin d'affiner le mécanisme anti-prolifératif de la tétrastatine, l'étude de l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire lors de l'incubation des cellules avec la tétrastatine sera nécessaire. La protéine CKi-p16 inhibe la formation des complexes cycline D-cdk 4 et cycline D-cdk 6 capables de phosphoryler la protéine Rb. En phase G1 tardive, la cycline E est nécessaire à la progression des cellules en phase S puisque lors de son association avec la protéine cdk 2, ce complexe conduit à l'hyperphosphorylation de Rb. L'hyperphosphorylation de la protéine Rb permet la libération du facteur de transcription E₂F indispensable pour l'expression de la cycline A, cycline permettant la progression du cycle durant la phase S [Cam et Dynlacht, 2003]. Il serait intéressant d'étudier l'expression de ces protéines du cycle cellulaire lors de l'incubation des cellules UACC 903 avec la tétrastatine et notamment de la cycline E ainsi que du facteur de transcription E₂F, intervenant tous deux au niveau de la transition G1/S. Cette transition est régulée par un point de contrôle suivant deux voies : une voie rapide, avec l'inactivation de cdc 25 A, et une voie lente, *via* p53 qui active p21. Les protéines cdc 25 A et p21 sont responsables de l'inhibition des complexes cyclines-cdk et donc du blocage du cycle cellulaire [Bucher et Britten, 2008]. Le rôle de la tétrastatine sur l'expression de ces protéines reste à déterminer.

La tétrastatine induit également une inhibition importante des propriétés invasives des cellules de mélanome UACC 903. Ces propriétés invasives ont été étudiées *in vitro* en modèle de chambres de Boyden modifiées. L'étude de la migration des cellules en modèle de blessure permettra de nous renseigner sur l'effet de la tétrastatine sur les propriétés migratoires des cellules UACC 903. Ainsi, les paramètres de migration tels que la vitesse ou encore la trajectoire des cellules tumorales pourront être étudiés. En effet, la migration de cellules tumorales peut être modifiée non seulement par une inhibition de la vitesse de migration des cellules mais également par une perte de directionnalité des cellules, comme démontré avec le domaine NC1 α 1(XIX) [Toubal et coll., 2010]. Nous avons montré que l'inhibition de

l'invasion peut s'expliquer notamment par une perte de la MMP-14, colocalisée avec la cavéoline-1, au niveau du front de migration des cellules. Cette disparition de la MMP-14 au niveau du front de migration pourrait s'expliquer par son endocytose, *via* les caveolae, au niveau des radeaux lipidiques. Afin d'appuyer cette hypothèse, la localisation de la MMP-14 pourrait être étudiée en présence de filipine ou nystatine, capables d'inhiber l'endocytose dépendante des caveolae [Rothberg et coll., 1992]. Afin de mieux comprendre son implication, il serait intéressant de réaliser un marquage de la MMP-14 active afin d'observer sa localisation au niveau du front de migration au cours de la migration dans un modèle de blessure ou encore de transfecter les cellules UACC 903 avec un plasmide permettant l'expression de la forme active GFP-MMP-14 avant d'étudier leur migration par vidéomicroscopie en présence de tétrastatine.

L'expression d'autres MMPs impliquées dans la croissance du mélanome comme par exemple les MMP-3, MMP-15 et MMP-16 [Hofmann et coll., 2000] ou encore les MMP-1 et MMP-13 [Airola et coll., 1999] pourrait également être étudiée. L'implication potentielle d'ADAMs et d'ADAM-TSs n'a pas été envisagée. Or, leur implication dans la progression tumorale n'est plus à démontrer : ADAM-9 promeut l'invasion de cellules de cancer du colon, ADAM-15 est capable de stimuler la prolifération et la migration de cellules endothéliales dans un modèle de mélanome, et ADAM-12 inhibe l'apoptose de cellules cancéreuses dans un modèle de cancer du sein [Duffy et coll., 2009]. Par ailleurs, le blocage d'ADAM-12 induit la formation d'invadopodes capables de dégrader la matrice extracellulaire, vraisemblablement *via* l'activité de la MMP-14 présente au niveau de radeaux lipidiques [Albechsten et coll., 2011].

In vivo, l'inhibition de la croissance tumorale peut être en partie expliquée par une inhibition des propriétés prolifératives mais également par une inhibition des propriétés invasives des cellules tumorales. Nous avons montré *in vitro* que cet effet anti-invasif peut s'expliquer notamment par une inhibition de l'activation de la MMP-14. Il serait intéressant de vérifier cette inhibition *in vivo* à l'aide d'un marquage spécifique de la MMP-14 active sur des coupes de tumeurs mais il n'existe pas d'anticorps spécifique de cette forme dans le commerce. Pour remédier à ce problème, il sera possible de réaliser un double marquage à l'aide d'un anticorps spécifique de la forme proMMP-14 d'une part et d'un anticorps dirigé contre les deux formes de la MMP-14 d'autre part. La forme active sera alors évaluée par la différence entre le marquage de la MMP-14 totale et le marquage spécifique de la forme proMMP-14.

Les études menées au cours de ce travail nous permettent de n'expliquer qu'en partie l'inhibition de la croissance tumorale observée *in vivo*. La composante inflammatoire, potentiellement régulée par la tétrastatine, pourrait jouer un rôle important dans cette inhibition. En effet, les matrikines sont capables de réguler certaines cellules inflammatoires. C'est le cas notamment de la séquence 185-203 de la tumstatine qui empêche l'activation de polynucléaires neutrophiles [Monboisse et coll., 1994]. Les macrophages associés aux tumeurs jouent un rôle important dans la progression tumorale puisqu'ils sont capables de produire des MMPs et des cytokines suite à leur stimulation par les cellules tumorales [Ungefroren et coll., 2011]. Ainsi, il sera intéressant d'étudier l'effet potentiel de la tétrastatine sur le chimiotactisme et l'activation de polynucléaires neutrophiles ou encore sur la production de MMPs et de cytokines par les macrophages.

Nous avons montré que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur de la tétrastatine. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est également exprimée à la surface des cellules endothéliales activées et la tumstatine, par exemple, exerce son activité anti-angiogénique par sa liaison à cette intégrine [Maeshima et coll., 2001b]. Or, la tétrastatine, contrairement aux autres domaines NC1 des chaînes α du collagène IV, a peu d'effet sur la néoangiogenèse *in vivo*. Pour mieux comprendre son rôle dans l'angiogenèse, l'étude de la formation de pseudotubes par les cellules HUVECs *in vitro* sera nécessaire. Une expérience préliminaire réalisée par incubation de cellules HUVECs avec la tétrastatine a abouti à une inhibition de 35% de la formation de pseudotubes sur Matrigel[®]. De plus, son influence sur l'angiogenèse *in vivo* pourra également être étudiée plus précisément grâce à différents modèles comme par exemple en modèle de matrigel plugs ou encore en système DIVAA (Directed *In Vivo* Angiogenesis Assay) où des implants contenant un extrait mimant la membrane basale ainsi que l'effecteur sont injectés en sous cutané chez la souris.

Parallèlement à la néoangiogenèse tumorale, la lymphangiogenèse tumorale joue un rôle tout aussi important dans la progression tumorale et notamment dans la dissémination métastatique des mélanomes. Il sera intéressant de réaliser un marquage LYVE-1 spécifique des vaisseaux lymphatiques par exemple afin d'étudier l'impact de la tétrastatine sur la lymphangiogenèse [Tobler et Detmar, 2006].

La détermination de la séquence minimale active permettra par la suite de concevoir des analogues structuraux susceptibles d'être utilisés dans le traitement du mélanome. Ceux-ci pourront être utilisés soit seuls, soit en combinaison avec d'autres traitements, permettant d'augmenter leur efficacité. La tumstatine 45-132 couplé au TGF- α par exemple permet d'inhiber d'un facteur 1,6 la formation de néovaisseaux dans un modèle de membrane

chorioallantoïdienne par rapport aux conditions non traitées ou traitées uniquement au TGF- α [Yan et coll., 2010]. De même la surexpression de la tumstatine associée à de faibles doses de Gemcitabine, induit une inhibition accrue de la croissance tumorale et de l'angiogenèse dans un modèle murin de carcinome de colon et de carcinome pulmonaire de Lewis [Yao et coll., 2005].

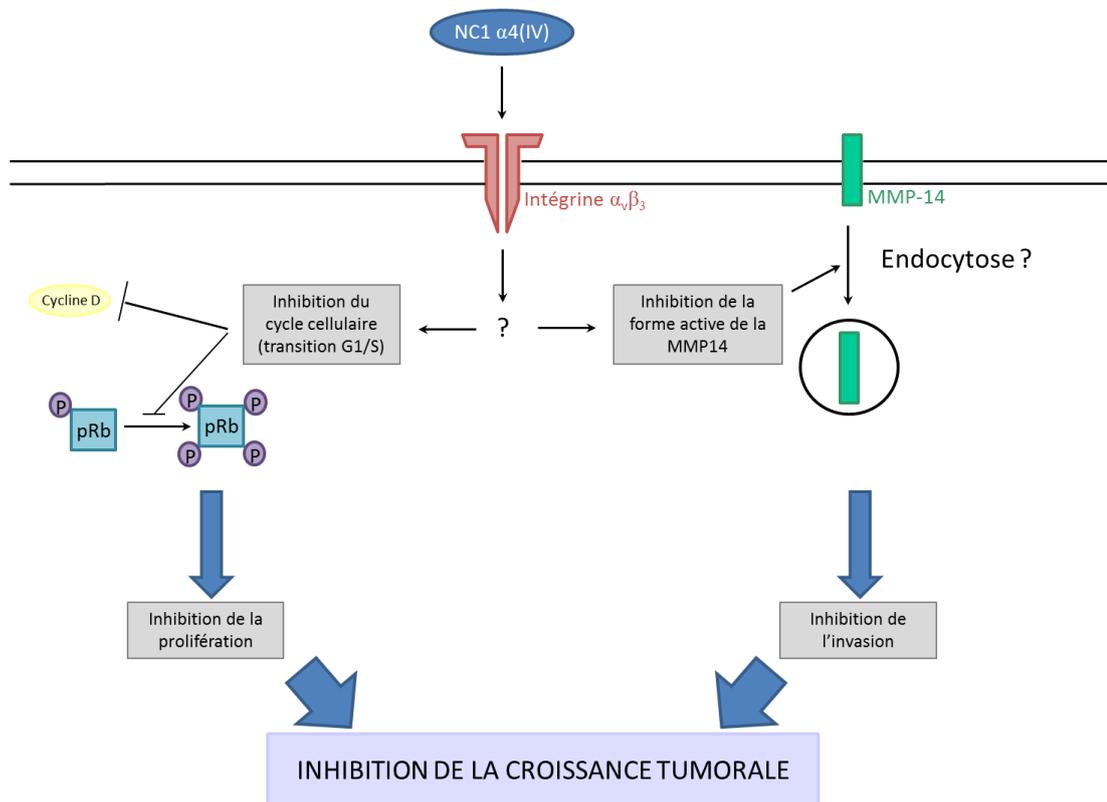


Figure 72 : Schéma récapitulatif de l'action de la tétrastatine sur les cellules tumorales

Le mélanome est le cancer cutané le plus agressif. Aujourd'hui, le meilleur traitement reste la chirurgie lorsque le mélanome est encore à un stade précoce. Les chimiothérapies, radiothérapies et immunothérapies donnent pour le moment des résultats décevants avec un taux de survie moyen compris entre 6 et 9 mois au stade clinique III. Les dernières avancées thérapeutiques prometteuses concernent essentiellement le ciblage des mutations les plus courantes retrouvées dans le mélanome, en particulier, les thérapies ciblées contre la mutation de BRAF, retrouvée dans plus de 50% des mélanomes. Parmi les inhibiteurs de BRAF muté, le représentant principal est le Vemurafenib dirigé contre la mutation BRAF V600E. Ce traitement prometteur a obtenu un taux de réponse des patients de 81% en phase I clinique, puis de 52% en phase II. Aujourd'hui, l'étude de ses effets a atteint le stade III [Eggermont et

Robert, 2011]. Un traitement immunothérapeutique, l'Ipilimumab, consistant en un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques, semble également prometteur. Le blocage de ce récepteur induit une augmentation de la réponse immunitaire anti-tumorale *via* l'augmentation de l'activation et de la prolifération de cellules T. Ce traitement a obtenu des résultats prometteurs notamment en ce qui concerne la survie des patients en phase I et II [Eggermont et Robert, 2011 ; Rivere et coll., 2011]. Cependant, ces traitements présentent des effets secondaires importants comme par exemple une réaction d'auto-immunité avec l'Ipilimumab, ou encore le développement d'un carcinome à cellules squameuses cutanées d'un kératoacanthome après le traitement avec le Vemurafenib [Eggermont et Robert, 2011 ; Rivere et coll., 2011].

Les matrikines dérivées des membranes basales inhibent la prolifération et l'invasion des cellules tumorales et/ou l'angiogenèse tumorale. Elles pourraient être utilisées dans plusieurs types de tumeurs contrairement aux thérapies ciblées difficilement transposables. La conception d'analogues structuraux à partir des séquences actives peut permettre un ciblage du site tumoral. L'inconvénient de ces peptides est qu'ils sont potentiellement facilement dégradables, d'où la nécessité d'une vectorisation et d'un mode d'administration adéquat. En revanche, comme il s'agit d'inhibiteurs endogènes, il y a généralement très peu d'effets secondaires. De plus, la combinaison des traitements classiques de chimiothérapie avec ces peptides peut permettre une optimisation de l'effet anti-tumoral ou un abaissement des doses de l'agent cytotoxique et donc une amélioration de la qualité de vie pendant la maladie des patients avec des effets secondaires moindres.

VI-Bibliographie

ABUKHDEIR AM, PARK BO

P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance

Expert Rev Mol Med 2008 ; 10 : 19.

AIROLA K, KARONEN T, VAALAMO M, LEHTI K, LOHI J, KARINIEMI AL, *et al.*

Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas

Br J Cancer 1999 ; 80(5/6) : 733–743.

ALA-AHO R, KÄHÄRI VM

Collagenases in cancer

Biochimie 2005 ; 87(3-4) : 273–286.

ALBRECHTSEN R, STAUTZ D, SANJAY A, KVEIBORG M, WEWER UM

Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity

Exp Cell Res 2011 ; 317(2) : 195-209.

AMENTA PS, HADAD S, LEE MT, BARNARD N, LI D, MYERS JC

Loss of types XV and XIX collagen precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of the female breast.

J Pathol 2003 ; 199(3) : 298-308.

ANANTHAKRISHNAN R, EHRLICHER A

The forces behind cell movement

Int J Biol Sci 2007 ; 3(5) : 303-317.

ANDREASEN PA, KJOLLER L, CHRISTENSEN L, DUFFY MJ

The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review

Int J Cancer 1997 ; 72(1) : 1–22.

AGTMAEL TV, BRUCKNER-TUDERMAN L

Basement membranes and human disease

Cell Tissue Res 2010 ; 339(1) : 167-88.

AUMAILLEY M, BRUCKNER-TUDERMAN L, CARTER WG, DEUTZMANN R,
EDGAR D, EKBLÖM P, *et al.*

A simplified laminin nomenclature

Matrix Biol 2005 ; 24(5) : 326 – 332.

BAGNATO A, ROSANO L, SPINELLA F, DI CASTRO V, TECCE R, NATALI PG
Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in
melanoma cell progression

Cancer Res 2004 ; 64(4) : 1436-1443.

BAKER AH, EDWARDS DR, MURPHY G

Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities

J Cell Sci 2002 ; 115(19) : 3719-3727.

BARCZYK M, CARRACEDO S, GULLBERG D

Integrins

Cell Tissue Res 2010 ; 339(1) : 269–280.

BOOSANI CS, VARMA AK, SUDHAKAR A

Validation of different systems for tumstatin expression and its *in-vitro* and *iv-vivo* activities

J Cancer Sci Ther 2010 ; 2009 : 8–18.

BREW K, DINAKARPANDIAN D, NAGASE H

Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function

Biochim Biophys Acta 2000 ; 1477(1-2) : 267-283.

BROOKS PC, STRÖMBLAD S, SANDERS LC, VON SCHALSCHA TL, AIMES RT,
STETLER-STEVENSON WG, *et al.*

Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by
interaction with integrin $\alpha\beta 3$

Cell 1996 ; 85(5) : 683–693.

BUCHER N, BRITTEN CD

G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer

Br J Cancer 2008 ; 98(3) : 523 – 528.

CAM H, DYNLACHT BD

Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication

Cancer Cell 2003 ; 3(4) : 311-316.

CLOTTE E

Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy

Bull Cancer 2005 ; 92(2) : 119-127.

COLORADO PC, TORRE A, KAMPHAUS G, MAESHIMA Y, HOPFER H, TAKAHASHI K, *et al.*

Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen

Cancer Res 2000 ; 60(9) : 2520-2526.

CULAV EM, CLARK CH, MERRILEES MJ

Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy

Phys Ther 1999 ; 79(3) : 308 –319.

DAVIS GE, BAYLESS KJ, DAVIS MJ, MEININGER GA

Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules

Am J Pathol 2000 ; 156(5) : 1489-1498.

DE VRIES TJ, KITSON JL, SILVERS WK, MINTZ B

Expression of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in cutaneous melanomas of transgenic melanoma-susceptible mice

Cancer Res 1995 ; 55(20) : 4681-4687.

DOR Y, PORAT R, KESHET E

Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis

Am J Physiol Cell Physiol 2001 ; 280(6) : 1367-74.

DOWNS SM

Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes

Mol Reprod Dev 2010 ; 77(7) : 566–585.

DUFFY MJ, MCKIERNAN E, O'DONOVAN N, MCGOWAN PM

Role of ADAMs in cancer formation and progression

Clin Cancer Res 2009 ; 15(4) : 1140-1144.

DURBEEJ M

Laminins

Cell Tissue Res 2010 ; 339(1) : 259–268.

EDWARDS DR, HANDSLEY MM, PENNINGTON CJ

The ADAM metalloproteinases

Mol Aspects Med 2008 ; 29(5) : 258–289.

EGGERMONT AM, ROBERT C

New drugs in melanoma: it's a whole new world

Eur J Cancer 2011 ; 47(14) : 2150-7.

FAYE C, MOREAU C, CHAUTARD E, JETNE R, FUKAI N, RUGGIERO F, *et al.*

Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate

J Biol Chem 2009 ; 284(33) : 22029-22040.

FIELDS CG, MICKELSON DJ, DRAKE SL, MCCARTHY JB, FIELDS GB

Melanoma cell adhesion and spreading activities of a synthetic 124-residue triple-helical “mini-collagen”

J Biol Chem 1993 ; 268(19) : 14153-14160.

FLOQUET N, PASCO S, RAMONT L, DERREUMAUX P, LARONZE JY,
NUZILLARD JM, *et al.*

The antitumor properties of the $\alpha 3(\text{IV})$ -(185–203) peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent

J Biol Chem 2004 ; 279(3) : 2091–2100.

FOIANI M, LUCCINI G

The DNA polymerase α -primase complex couples DNA replication, cell cycle progression and DNA damage response

Trends Biochem Sci 1997 ; 22(11) : 424-427.

FRIEDL P, WOLF K

Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process

Cancer Metastasis Rev 2009 ; 28(1-2) : 129–135.

FRIEDMAN RJ, FARBER MJ, WARYCHA MA, PAPATHASIS N, MILLER MK,
HEILMAN ER

The “dysplastic” nevus

Clin Dermatol 2009 ; 27(1) : 103–115.

GELSE K, PÖSCHL E, AIGNER T

Collagens—structure, function, and biosynthesis

Adv Drug Deliv Rev 2003 ; 55(12) : 1531– 1546.

GERHARDT H, GOLDING M, FRUTTIGER M, RUHRBERG C, LUNDKVIST A,
ABRAMSSON A, *et al.*

VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia

J Cell Biol 2003 ; 161(6) : 1163–1177.

GORDON MK, HAHN RA

Collagens

Cell Tissue Res 2010 ; 339(1) : 247–257.

HAASS NK, SMALLEY KSM, LI L, HERLYN M

Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma

Pigment Cell Res 2005 ; 18(3) : 150–159.

HÄGG PM, HÄGG PO, PELTONEN S, AUTIO-HARMAINEN H, PIHLAJANIEMI T

Location of type XV collagen in human tissues and its accumulation in the interstitial matrix of the fibrotic kidney

Am J Pathol 1997 ; 150(6) : 2075-2086.

HAMANO Y, KALLURI R

Tumstatin, the NC1 domain of $\alpha 3$ chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth

Biochem Biophys Res Commun 2005 ; 333(2) : 292–298.

HAN J, OHNO N, PASCO S, MONBOISSE JC, BOREL JP, KEFALIDES NA

A cell binding domain from the $\alpha 3$ chain of type IV collagen inhibits proliferation of melanoma cells

J Biol Chem 1997 ; 272(33) : 20395–20401.

HE GA, LUO JX, ZHANG TY, WANG FY, LI RF

Canstatin-N fragment inhibits in vitro endothelial cell proliferation and suppresses in vivo tumor growth

Biochem Biophys Res Commun 2003 ; 312(3) : 801–805.

HE GA, LUO JX, ZHANG TY, HU ZS, WANG FY

The C-terminal domain of canstatin suppresses in vivo tumor growth associated with proliferation of endothelial cells

Biochem Biophys Res Commun 2004 ; 318(2) : 354–360.

HEUSSCHEN R, VAN GINK M, GRIFFIOEN AW, THIJSSEN VL

MicroRNAs in the tumor endothelium: novel controls on the angioregulatory switchboard

Biochim Biophys Acta 2010 ; 1805(1) : 87-96.

HOFMANN UB, WESTPHAL JR, VAN MUIJEN GN, RUITER DJ

Matrix metalloproteinases in human melanoma

J Invest Dermatol 2000 ; 115(3) : 337-44.

HWANG-BO J, YOO KH, JEONG HS, CHUNG IS

Recombinant canstatin inhibits tumor growth in an orthotopic AT-84 oral squamous cell carcinoma model

Biotechnol Lett 2010 ; 32(2) : 189–194.

INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE

Disponible à partir de l'URL : www.invs.sante.fr/

ITOH Y

MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue

IUBMB Life 2006 ; 58(10) : 589 – 596.

KADLER KE, BALDOCK C, BELLA J, BOOT-HANDFORD RP

Collagens at a glance

J Cell Sci 2007 ; 120(12) : 1955-1958.

KAJITA M, ITOH Y, CHIBA T, MORI H, OKADA A, KINOH H, SEIKI M

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration

J Cell Biol 2001 ; 153(5) : 893–904.

KALLURI R

Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis

Nat Rev Cancer 2003 ; 3(6) : 422-33.

KAMPHAUS GD, COLORADO PC, PANKA DJ, HOPFER H, RAMCHANDRAN R,

TORRE A, *et al.*

Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth

J Biol Chem 2000 ; 275(2) : 1209–1215.

KARAGIANNIS ED, POPEL AS

Identification of novel short peptides derived from the $\alpha 4$, $\alpha 5$, and $\alpha 6$ fibrils of type IV collagen with anti-angiogenic properties

Biochem Biophys Res Commun 2007 ; 354(2) : 434–439.

KARAMYSHEVA AF

Mechanisms of angiogenesis

Biochemistry (Mosc) 2008 ; 73(7) : 751-762.

KELLER KE, AGA M, BRADLEY JM, KELLEY MJ, ACOTT TS

Extracellular matrix turnover and outflow resistance

Exp Eye Res 2009 ; 88(4) : 676–682.

KOSKIMAKI JE, KARAGIANNIS ED, ROSCA EV, VESUNA F, WINNARD PT JR, RAMAN V, *et al.*

Peptides derived from type IV collagen, CXC chemokines, and thrombospondin-1 domain-containing proteins inhibit neovascularization and suppress tumor growth in MDA-MB-231 breast cancer xenografts

Neoplasia 2009 ; 11(12) : 1285–1291.

KOSKIMAKI JE, KARAGIANNIS ED, TANG BC, HAMMERS H, WATKINS DN, PILI R, *et al.*

Pentastatin-1, a collagen IV derived 20-mer peptide, suppresses tumor growth in a small cell lung cancer xenograft model

BMC Cancer 2010 ; 10 : 29.

KRUDE T

Initiation of chromosomal DNA replication in mammalian cell-free systems

Cell Cycle 2006 ; 5(18) : 2115-2122.

KRUEGEL J, MIOSGE N

Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices

Cell Mol Life Sci 2010 ; 67(17) : 2879–2895.

KUEHBACHER A, URBICH C, ZEIHNER AM, DIMMELER S

Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis

Circ Res 2007 ; 101(1) : 59-68.

KUPHAL S, BAUER R, BOSSERHOFF AK

Integrin signaling in malignant melanoma

Cancer Metastasis Rev 2005 ; 24(2) : 195–222.

KUPHAL S, BOSSERHOFF A

Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma

J Pathol 2009 ; 219(4) : 400–409.

KURATOMI Y, NOMIZU M, TANAKA K, PONCE ML, KOMIYAMA S,

KLEINMAN HK, *et al.*

Laminin γ 1 chain peptide, C-16 (KAFDITYVRLKF), promotes migration, MMP-9 secretion, and pulmonary metastasis of B16 – F10 mouse melanoma cells

Br J Cancer 2002 ; 86(7) : 1169 – 1173.

KURCHAT P, ZIGRINO P, NISCHT R, BREITKOPF K, STEURER P, KLEIN CE, *et al.*

Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines

J Biol Chem 1999 ; 274(30) : 21056–21062.

LEBLEU VS, MACDONALD B, KALLURI R

Structure and function of basement membranes

Exp Biol Med (Maywood) 2007 ; 232(9) : 1121-9.

LEBLEU V, SUND M, SUGIMOTO H, BIRRANE G, KANASAKI K, FINAN E, *et al.*

Identification of the NC1 domain of α 3 chain as critical for α 3 α 4 α 5 type IV collagen network assembly.

J Biol Chem 2010 ; 285(53) : 41874-85.

LE CLAINCHE C, CARLIER MF

Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration.

Physiol Rev 2008 ; 88(2) : 489-513.

LI YJ, SUN LC, HE Y, LIU XH, LIU M, WANG QM, JIN XM

The anti-tumor properties of two tumstatin peptide fragments in human gastric carcinoma

Acta Pharmacol Sin 2009 ; 30(9) : 1307–1315.

LUO M, GUAN JL

Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis

Cancer Lett 2010 ; 289(2) : 127–139.

MA HT, POON RY

Synchronization of HeLa Cells

Methods Mol Biol 2011 ; 761 : 151-161.

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(18) : 4174-4181.

MAESHIMA Y, COLORADO PC, TORRE A, HOLTHAUS KA, GRUNKEMEYER JA, ERICKSEN MB, *et al.*

Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane

J Biol Chem 2000 ; 275(28) : 21340–21348.

MAESHIMA Y, MANFREDI M, REIMER C, HOLTHAUS KA, HOPFER H, CHANDAMURI BR, *et al.*

Identification of the Anti-angiogenic Site within Vascular Basement Membrane-derived tumstatin

J Biol Chem 2001 ; 276(18) : 15240–15248.

MAESHIMA Y, YERRAMALLA UL, DHANABAL M, HOLTHAUS KA,
BARBASHOV S, KHARBANDA S, *et al.*

Extracellular matrix-derived peptide binds to $\alpha\beta 3$ integrin and inhibits angiogenesis
J Biol Chem 2001 ; 276(34) : 31959–31968.

MAGNON C, GALAUP A, MULLAN B, ROUFFIAC V, BOUQUET C, BIDART JM, *et al.*

Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through
interaction with $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$ integrins
Cancer Res 2005 ; 65(10) : 4353-4361.

MAGNON C, OPOLON P, CONNAULT E, MIR LM, PERRICAUDET M,
MARTEL-RENOIR D

Canstatin gene electrotransfer combined with radiotherapy: preclinical trials for cancer
treatment
Gene Ther 2008 ; 15(21) : 1436–1445

MAHABELESWAR GH, BYZOVA TV

Angiogenesis in Melanoma
Semin Oncol 2007 ; 34(6) : 555–565.

MALINDA KM, KLEINMAN HK

The Laminins
Int J Cell Biol 1996 ; 28(9) : 957-959

MAQUART FX, SIMEON A, PASCO S, MONBOISSE JC

Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines
J Soc Biol 1999 ; 193(4-5) : 423-428.

MAQUART FX, PASCO S, RAMONT L, HORNEBECK W, MONBOISSE JC

An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell
activity-Implication in tumor invasion
Crit Rev Oncol Hematol 2004 ; 49(3) : 199–202.

MARNEROS AG, OLSEN BR

Physiological role of collagen XVIII and endostatin

FASEB J 2005 ; 19(7) : 716-28.

MARTIN BT, STREBHARDT K

Polo-Like Kinase 1 : Target and Regulator of Transcriptional Control

Cell Cycle 2006 ; 5(24) : 2881-2885.

MILES AJ, SKUBITZ AP, FURCHT LT, FIELDS GB

Promotion of cell adhesion by single-stranded and triple-helical peptide models of basement membrane collagen alpha 1(IV)531-543. Evidence for conformationally dependent and conformationally independent type IV collagen cell adhesion sites.

J Biol Chem 1994 ; 269(49) : 30939-30945.

MILLER AJ, TSAO H

New insights into pigmentary pathways and skin cancer

Br J Dermatol 2010 ; 162(1) : 22–28.

MIYAZAKI K

Laminin-5 (laminin-332): unique biological activity and role in tumor growth and invasion

Cancer Sci 2006 ; 97(2) : 91–98.

MONBOISSE JC, GARNOTEL R, BELLON G, OHNO N, PERREAU C, BOREL JP, *et al.*

The alpha 3 chain of type IV collagen prevents activation of human polymorphonuclear leukocytes.

J Biol Chem 1994 ; 269(41) : 25475-25482.

MUNDEL TM, YLINIEMI AM, MAESHIMA Y, SUGIMOTO H, KIERAN M, KALLURI R, *et al.*

Type IV collagen $\alpha 6$ chain-derived noncollagenous domain 1 ($\alpha 6$ (IV)NC1) inhibits angiogenesis and tumor growth

Int J Cancer 2008 ; 122(8) : 1738–1744.

MURPHY G

The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment

Nat Rev Cancer 2008 ; 8(12) : 929-941.

MURPHY G

Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the “sheddas”

Semin Cell Dev Biol 2009 ; 20(2) : 138-145.

MUSSO O, REHN M, SAARELA J, THERET N, LIETARD J, HINTIKKA E, *et al.*

Collagen XVIII is localized in sinusoids and basement membrane zones and expressed by hepatocytes and activated stellate cells in fibrotic human liver

Hepatology 1998 ; 28(1) : 98-107.

MYERS JC, LI D, AMENTA PS, CLARK CC, NAGASWAMI C, WEISEL JW

Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates via globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini

J Biol Chem 2003 ; 278(34) : 32047–32057.

MYLLYHARJU J, KIVIRIKKO KI

Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms

Trends Genet 2004 ; 20(1) : 33-43.

NAKAHARA H, NOMIZU H, AKIYAMA SK, YAMADA Y, YEH Y, CHEN WT

A mechanism for regulation of melanoma invasion ligation of $\alpha 6\beta 1$ integrin by laminin γ peptides

J Biol Chem 1996 ; 271(44) : 27221–27224.

NYBERG P, XIE L, SUGIMOTO H, COLORADO P, SUND M, HOLTHAUS K, *et al.*

Characterization of the anti-angiogenic properties of arresten, an $\alpha 1\beta 1$ integrin-dependent collagen-derived tumor suppressor

Exp Cell Res 2008 ; 314(18) : 3292-3330.

OBSERVATOIRE EUROPEEN DU CANCER

Disponible à partir de l'URL : eu-cancer.iarc.fr/?lang=1

ORTEGA N, WERB Z

New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens
J Cell Sci 2002 ; 115(22) : 4201-4214.

OSENKOWSKI P, TOTH M, FRIDMAN R

Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP)
J Cell Physiol 2004 ; 200(1) : 2-10.

PANKA DJ, MIER JW

Canstatin inhibits akt activation and induces fas-dependent apoptosis in endothelial cells
J Biol Chem 2003 ; 278(39) : 37632-37636.

PASCO S, HAN J, GILLERY P, BELLON G, MAQUART FX, BOREL JP, *et al.*

A specific sequence of the noncollagenous domain of the $\alpha 3(\text{IV})$ chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells.
Cancer Res 2000 ; 60(2) : 467-73.

PASCO S, MONBOISSE JC, KIEFFER N

The $\alpha 3(\text{IV})$ 185-206 peptide from noncollagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the $\beta 3$ subunit of integrin $\alpha v\beta 3$ and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation
J Biol Chem 2000 ; 275(42) : 32999-33007.

PASCO S, RAMONT L, VENTEO L, PLUOT M, MAQUART FX, MONBOISSE JC

In vivo overexpression of tumstatin domains by tumor cells inhibits their invasive properties in a mouse melanoma model
Exp Cell Res 2004 ; 301(2) : 251-265.

PASCO S, BRASSART B, RAMONT L, MAQUART FX, MONBOISSE JC

Control of melanoma cell invasion by type IV collagen

Cancer Detect Prev 2005 ; 29(3) : 260-266.

PETITCLERC E, BOUTAUD A, PRESTAYKO A, XU J, SADO Y, NINOMIYA Y, *et al.*

New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV : novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo

J Biol Chem 2000 ; 275(11) : 8051-8061.

POLETTE M, THIBLET J, PLOTON D, BUISSON AC, MONBOISSE JC,
TOURNIER JM, *et al.*

Distribution of $\alpha 1(IV)$ and $\alpha 3(IV)$ chains of type IV collagen in lung tumours.

J Pathol 1997 ; 182(2) : 185-91.

PUPA SM, MENARD S, FORTI S, TAGLIABUE E

New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression

J Cell Physiol 2002 ; 192(3) : 259–267.

RAMONT L, BRASSART-PASCO S, THEVENARD J, DESHORGUE A, VENTEO L,
LARONZE JY, *et al.*

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

Mol Cancer Ther 2007 ; 6(2) : 506-514.

RATHINAM R, ALAHARI SK

Important role of integrins in the cancer biology

Cancer Metastasis Rev 2010 ; 29(1) : 223–237.

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F

The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane

Pathol Biol 2005 ; 53(7) : 430–442.

RIVERE A, BOURGEOIS DJ, RIKER AI

Use of ipilimumab in melanoma

Immunotherapy 2011 ; 3(8) : 927-30.

ROTH JM, AKALU A, ZELMANOVICH A, POLICARPIO D, NG B,
MACDONALD S, *et al.*

Recombinant $\alpha 2(\text{IV})$ NC1 domain inhibits tumor cell-extracellular matrix interactions,
induces cellular senescence, and inhibits tumor growth in vivo

Am J Pathol 2005 ; 166(3) : 901-911.

ROTHBERG KG, HEUSER JE, DONZELL WC, YING YS, GLENNEY JR,
ANDERSON RG

Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats

Cell 1992 ; 68(4) : 673-682.

SAARELA J, YLIKÄRPPÄ R, REHN M, PURMONEN S, PIHLAJANIEMI T

Complete primary structure of two variant forms of human type XVIII collagen and tissue-specific differences in the expression of the corresponding transcripts.

Matrix Biol 1998 ; 16(6) : 319-328.

SASAKI T, HOHENESTER E, TIMPL R

Structure and Function of Collagen-Derived Endostatin Inhibitors of Angiogenesis

IUBMB Life 2002 ; 53(2) : 77-84.

SCHMIDT S, FRIEDL P

Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms

Cell Tissue Res 2010 ; 339(1) : 83-92.

SEIKI M, KOSHIKAWA N, YANA I

Role of pericellular proteolysis by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis

Cancer Metastasis Rev 2003 ; 22(2-3) : 129-143.

SMITH HW, MARSHALL CJ

Regulation of cell signalling by uPAR

Nat Rev Mol Cell Biol 2010 ; 11(1) : 23-36.

SUDHAKAR A, NYBERG P, KESHAMOUNI VG, MANNAM AP, LI J,
SUGIMOTO H, *et al.*

Human $\alpha 1$ type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by $\alpha 1\beta 1$ integrin

J Clin Invest 2005 ; 115(10) : 2801–2810.

SUDHAKAR A, BOOSANI CS

Inhibition of tumor angiogenesis by tumstatin: insights into signaling mechanisms and implications in cancer regression

Pharm Res 2008 ; 25(12) : 2731-2739.

SUMIYOSHI H, MOR N, LEE SY, DOTY S, HENDERSON S, TANAKA S, *et al.*

Esophageal muscle physiology and morphogenesis require assembly of a collagen XIX–rich basement membrane zone

J Cell Biol 2004 ; 166(4) : 591–600.

TAKATA M, SAIDA T

Genetic alterations in melanocytic tumors

J Dermatol Sci 2006 ; 43(1) : 1-10.

TANDLE A, BLAZER DG 3RD, LIBUTTI SK

Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments

J Transl Med 2004 ; 2(1) : 22.

THEVENARD JESSICA

Contrôle de la progression tumorale par des matrikines dérivées des collagènes de membrane basale

Thèse 3^{ème} cycle : Biochimie et Biologie Moléculaire : Reims : 2007 ; 205.

TOBLER NE, DETMAR M

Tumor and lymph node lymphangiogenesis - impact on cancer metastasis

J Leukoc Biol 2006 ; 80(4) : 691-696.

TOUBAL A, RAMONT L, TERRY C, BRASSART-PASCO S, PATIGNY D, SAPI J *et al.*

The NC1 domain of type XIX collagen inhibits melanoma cell migration

Eur J Dermatol 2010 ; 20(6) : 712-718.

TRAN KT, LAMB P, DENG JS

Matrikines and matricryptins: implications for cutaneous cancers and skin repair

J Dermatol Sci 2005 ; 40(1) : 11-20.

UNGEFROREN H, SEBENS S, SEIDL D, LEHNERT H, HASS R

Interaction of tumor cells with the microenvironment

Cell Commun Signal 2011 ; 9 : 18.

VASSALLI JD, SAPPINO AP, BELIN D

The plasminogen activator/plasmin system

J Clin Invest 1991 ; 88(4) : 1067-1072.

VISSE R, NAGASE H

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry

Circ Res 2003 ; 92(8) : 827-839.

VON THALER AK, KAMENISCH Y, BERNEBURG M

The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis

Exp Dermatol 2010 ; 19(2) : 81-88.

WANG WB, ZHOU YL, HENG DF, MIAO CH, CAO YL

Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and canstatin gene suppression therapy on breast tumor xenograft growth in mice

Breast Cancer Res Treat 2008 ; 110(2) : 283-295.

WICKSTRÖM SA, VEIKKOLA T, REHN M, PIHLAJANIEMI T, ALITALO K,
KESKI-OJA J

Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells

Cancer Res 2001 ; 61(17) : 6511-6516.

WU X, GAN B, YOO Y, GUAN JL

FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation

Dev Cell 2005 ; 9(2) : 185-196.

XU R, XIN L, FAN Y, MENG HR, LI ZP, GAN RB

Mouse restin inhibits bovine aortic endothelial cell proliferation and causes cell apoptosis

Acta Biochim Biophys Sin 2002 ; 34(2) : 138-142.

YAN Y, XU W, QIAN H, ZHU W, MAO F, ZHANG X

Tumstatin 45-132 – TNF alpha suppresses tumour growth through anti-angiogenic effects and cytotoxicity

Biotechnol Appl Biochem 2010 ; 56(3) : 119-127.

YAO B, HE QM, TIAN L, XIAO F, JIANG Y, ZHANG R, *et al.*

Enhanced antitumor effect of the combination of tumstatin gene therapy and gemcitabine in murine models

Hum Gene Ther 2005 ; 16(9) : 1075-1086.

YURCHENCO PD, SCHITTONY JC

Molecular architecture of basement membranes

FASEB J 1990 ; 4(6) : 1577-1590.

YURCHENCO PD, PATTON BL

Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly

Curr Pharm Des 2009 ; 15(12) : 1277–1294.

VII - Annexe