



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE (URCA)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Par

Laurie VERZEAUX

le 10 Juin 2015

Etude de l'interaction du TIMP-1 avec ses récepteurs

Membres du jury :

Rapporteurs : **Pr. Sylvie RICARD-BLUM** – Université Lyon 1
Pr. Patrick HENRIET - Université catholique de Louvain

Examineurs : **Pr. Vinh TRAN** – Université de Nantes – Président du Jury
Dr. Michel KHRESTCHATISKY – Université d'Aix Marseille

Directeur de thèse : **Pr. Emmanuelle DEVARENNE - CHARPENTIER** – URCA

Co-encadrant de thèse : **Dr. Nicolas ETIQUE** – URCA

N° attribué par la bibliothèque

||R|E|I| | | |

Résumé :

Le TIMP-1, inhibiteur naturel des métalloprotéinases matricielles, exerce des effets pléiotropes indépendants de l'inhibition des MMPs et participe au développement de certains cancers et maladies neurodégénératives. Ces effets cytokiniques du TIMP-1 impliquent sa liaison à des récepteurs membranaires dont certains sont caractérisés, la glycoprotéine CD63/intégrine β 1 et le complexe pro-MMP-9/CD44. Cependant les acides aminés ou les domaines du TIMP-1 se liant à ces récepteurs ne sont pas identifiés. Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en évidence un nouveau récepteur du TIMP-1, la protéine LRP-1. Dans les neurones corticaux murins, le TIMP-1 se fixe aux domaines DII et DIV de LRP-1, est endocyté et induit une réduction de la taille des neurites ainsi qu'une augmentation du volume des cônes de croissance. Afin de caractériser cette interaction, nous avons utilisé une approche originale de modélisation moléculaire associant les analyses de modes normaux et la dynamique moléculaire. Ces analyses *in silico* ont permis d'identifier un mouvement de pince entre les domaines N- et C-terminaux du TIMP-1. Nous avons muté trois résidus (F12, K47 et W105) localisés dans une région essentielle d'un point de vue énergétique à l'exécution de ce mouvement. Ces trois mutants n'ont pas d'effet sur la longueur du réseau neuritique et ne sont pas endocytés par LRP-1. En revanche, ils interagissent avec les 2 autres récepteurs (CD63 et pro-MMP-9) et reproduisent les effets du TIMP-1 sauvage. De plus, nous avons identifié une séquence de 6 acides aminés localisée dans le domaine extracellulaire I de CD63 et essentielle à la liaison avec le TIMP-1. L'ensemble de ces travaux a permis l'identification de régions impliquées dans l'interaction du TIMP-1 avec ses différents récepteurs et pourrait permettre le développement de nouveaux outils pharmacologiques ciblant les activités cytokiniques du TIMP-1.

Mots clefs : TIMP-1, LRP-1, neurones corticaux, CD63, modélisation moléculaire

Abstract

TIMP-1, a natural inhibitor of matrix metalloproteinases, exerts pleiotropic effects independent of MMP inhibition and thus participates in the development of some cancers and neurodegenerative disorders. These cytokine-like activities require TIMP-1 binding to membrane receptors. Up to date two receptors, CD63/integrin β 1 and proMMP-9/CD44, have been characterized. Nevertheless, TIMP-1 residues or regions binding these receptors remain unknown. In this work, we have identified the protein LRP-1 as a new receptor for TIMP-1. In mouse cortical neurons, TIMP-1 preferentially binds DII and DIV domains of LRP-1, is internalized *via* a LRP-1-dependent endocytosis, reduces neurite length and increases growth cone volume. To go deeper into TIMP-1/LRP-1 interaction, we used an original molecular modeling approach which combined normal mode analysis and molecular dynamic. These *in silico* studies allowed us to point out a clamp movement between the N- and C-terminal domains of TIMP-1. Three residues localized in a region that seems essential for the movement have been mutated (F12, K47 and W105) and single mutants have been produced. These mutants do not reduce neurite outgrowth and are not internalized by LRP-1. In contrast, they interact with the two others receptors proMMP-9 and CD63 and induce associated biological effects. Furthermore, we have identified a sequence of six residues localized in the CD63 extracellular domain I and essential for TIMP-1 binding. The set of our data highlighted new regions of TIMP-1 interacting with its receptors and could lead to design novel therapeutic agents targeting the TIMP-1 cytokine-like activities.

Key words: TIMP-1, LRP-1, cortical neurons, CD63, molecular modeling

Je tiens à adresser mes remerciements au Professeur François-Xavier Maquart pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC) et pour m'avoir permis de réaliser ces travaux.

Je tiens également à remercier le Professeur Laurent Martiny, directeur du Laboratoire Signalisation et Récepteurs Matriciels (SiRMa) dans lequel j'ai effectué mes trois années de thèse et mes différents stages depuis la Licence.

Je remercie le Professeur Sylvie Ricard-Blum et le Professeur Patrick Henriet pour avoir accepté d'évaluer ce travail en étant rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Professeur Vinh Tran et le Docteur Michel Khrestchatisky d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Mes remerciements vont ensuite à ma Directrice de thèse, Emmanuelle Devarenne-Charpentier. Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche dès ma 3^e année de licence, et de m'avoir permis de réaliser cette thèse sous votre direction. Je vous remercie pour tout le suivi et la disponibilité dont vous avez fait preuve pendant ces trois années de thèse et notamment pendant cette période de rédaction. J'espère que j'en aurai retenu de bonnes choses !

Je remercie également le Docteur Nicolas Etique, mon co-encadrant de thèse mais également mon maître de stage depuis la 3^{ème} année de Licence. Merci à vous pour tous les conseils et la méthodologie que vous m'avez transmis. Merci pour le suivi hebdomadaire avec les réunions du vendredi qui ont permis un suivi régulier de l'avancement des travaux. Merci également de m'avoir fait confiance pour la réalisation des manipulations ce qui m'a permis d'évoluer et de me construire scientifiquement.

Je remercie également la Région Champagne-Ardenne qui a financé cette thèse, ainsi que le CNRS, l'ANR et l'Université de Reims Champagne-Ardenne, qui ont permis la réalisation de ces travaux de recherche.

Enfin, je tiens à remercier l'école doctorale et plus particulièrement Nathalie Le Barc'h et Estelle Odinot pour leurs nombreux conseils quant aux aspects administratifs de la thèse, mais aussi et surtout pour l'organisation des Doctoriales ainsi que du concours "Ma thèse en 180 secondes" qui auront été deux grandes expériences pendant ma thèse !

Cette thèse a eu la grande chance de coupler la modélisation moléculaire à la biologie. Cette expérience a été très riche d'un point de vue scientifique, mais également d'un point de vue humain. Je tiens donc à remercier grandement toute l'équipe du Plateau de Modélisation Multi-échelle, et tout particulièrement le Professeur Manu Dauchez. Mille mercis pour les discussions scientifiques, certes, mais aussi et surtout pour tout le reste, ton côté humain qui fait que l'équipe de modélisation est ce qu'elle est aujourd'hui ! Merci pour les nombreux cafés pris dans ton bureau, les discussions plus ou moins sérieuses, ... La façon que tu as de voir la thèse et la vie d'une manière générale font que ton bureau était devenu pour moi une zone de décompression ;-). Un énorme merci également au Docteur Belloy, pour toutes les simulations que tu as faites pour moi, pour la patience que tu as eu pour expliquer tout ça à une biologiste, et pour m'avoir appris à utiliser VMD toute seule comme une chef ! Voilà maintenant le temps pour moi de remercier le Docteur Romain Vasseur, merci à toi pour toutes ces années, pour les travaux réalisés et ce magnifique docking, mais aussi pour les excellents moments passés lors des Doctoriales ou de l'expérience Ma Thèse en 180 secondes. Un grand merci également à Nanaye et Jessica, avec lesquelles je n'aurai pas eu l'occasion de collaborer, mais qui m'auront tout de même fait part de leur sympathie. Je vous souhaite à tous le meilleur pour l'avenir, et de continuer dans cette ambiance de travail !

Je tiens également à adresser mes remerciements au Docteur Hervé Emonard et au Professeur Stéphane Dedieu pour m'avoir permis d'intégrer leur équipe de recherche, ainsi que pour m'avoir associée aux travaux de l'ANR TIMPAD, ce qui m'aura permis de découvrir un nouveau récepteur, LRP-1, ainsi que de nouvelles cellules, les neurones. Ces travaux m'ont permis de découvrir un nouveau domaine et auront sans doute apportés un bénéfice à cette thèse. J'en profite pour remercier le Docteur Jessica Thevenard Devy pour m'avoir initié à la culture de neurones et apporté tous les éléments nécessaires pour mener à bien les manips. Je remercie également les collaborateurs de Marseille, et plus particulièrement les Dr Michel Khrestchastisky et Santiago Rivera pour leur contribution à ces travaux. Je remercie également Marion David, Géraldine Ferracci, le Docteur Kévin Barranger et Amandine Bonnet pour leur réponse à mes questions, ainsi que pour les bons moments passés en congrès avec Kévin et Amandine.

Je remercie les personnes de la plateforme PICT, et plus particulièrement le Dr Christine Terryn. Je te remercie pour m'avoir formée à l'utilisation du microscope confocal et pour ta sympathie. Je remercie également Nathalie Lalun et Emilie Buache, qui m'auront bien souvent dépannée, pour avoir accès à la salle de microscopie, ou encore en réactifs ! Je remercie également le Docteur Jérôme Devy pour m'avoir expliqué et formée à l'analyse d'image.

Je tiens également à remercier Lulu, l'animalier. Je te remercie pour ta sympathie, ta bonne humeur au quotidien, tes petites chansonnettes, etc qui nous permettent de retrouver le sourire ! Merci aussi pour la confiance que tu m'as accordée en me confiant ton animalerie deux étés successifs ;-) et enfin, merci pour les conseils que tu m'auras donné les quelques fois où j'aurai été à la muscu en ta compagnie ! Je remercie également mes deux plus grandes aides techniques, Cathy et Isabelle. Merci pour tous les coups de mains, même si pour vous c'était souvent "pas grand chose", au final, ça m'aidait beaucoup ! Merci à vous également pour votre sympathie au quotidien.

Enfin, je tiens également à remercier toutes les personnes du laboratoire SiRMa, et notamment Pascal pour les discussions scientifiques que nous avons eu quant au système de purification 6 his, Hassan pour tes conseils et ton aide concernant l'enzymologie, Stéphanie, La famille Delacoux, Aline et Amar, Tata Ninie, et toutes les autres personnes que j'aurais pu oublier. Je vous remercie pour votre sympathie et pour tous les bons moments que nous avons partagés.

Lors de ces années, j'ai également eu l'occasion de réaliser des enseignements au sein du département de biologie et biochimie. Je remercie toutes les personnes m'ayant permis de m'épanouir dans ces activités. Merci à Christelle notamment pour le Bio 202, à Fred et Stéphane pour le BM 401 et à Nicolas pour le Bio 403. Je tiens également à remercier les enseignants de microbiologie et de physiologie animale, et plus particulièrement Hari, Sabine, Angélique, Estelle, Françoise, Franck, Thierry, Katia, et Caroline. Merci à vous de m'avoir fourni tout le nécessaire pour réaliser cette année d'ATER, dans des domaines qui n'étaient pas mes domaines de prédilections, mais cela m'a permis de m'ouvrir l'esprit et de profiter de cette année. Merci à vous pour votre sympathie.

Je tiens également à remercier tous les stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer et d'encadrer pour certains. Merci à vous pour les bons moments que nous avons passés ensemble, vous m'avez souvent remercié mais vous m'avez certainement au moins autant apporté que je ne vous ai donné. Je vous souhaite à tous bonne chance et bon courage pour la suite !

Enfin, il n'est pas sans dire que la thèse a été pour moi une grande expérience scientifique, certes, mais également une grande expérience humaine. Et cela n'aurait pas été sans vous, mes "collègues doctorants" ! Merci à vous pour tout, c'est très certainement pour moi la partie des remerciements la plus difficile à rédiger, d'une part car il y en a tellement à dire, mais aussi tellement à venir ☺ Merci à vous pour tout, votre aide pendant les manips, votre soutien pendant la rédaction, les soirées que l'on aura partagées, ainsi que les week-ends et les vacances ensemble... Difficile de commencer par quelqu'un mais

je vais commencer par Louis, merci à toi pour avoir été mon "Buddy" pendant toutes ces années, merci pour ton soutien, ton aide, tes conseils, tous ces moments partagés et toutes ces discussions (plus ou moins scientifiques ! 😊). Tout cela aura rendu cette thèse meilleure sous tous les angles, il n'y a pas à dire ! Bonne chance et bon courage pour la suite. Un grand merci également à Alex, que j'ai découvert pendant toutes ces années. Merci à toi pour tout, ainsi qu'à Solenn. Profites bien de cette expérience italienne et bon courage et bonne chance pour la suite. Merci également à toi Laetitia pour tout, nous nous connaissions avant cette aventure de la thèse, mais ces 2 années en ta compagnie nous ont fait nous découvrir autrement 😊 Merci également pour ta compagnie aux séances de sport. Je te souhaite le meilleur pour la suite, accroches toi, je suis certaine que tu arriveras à faire ce que tu veux ! Merci à toi Anthony, pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, scientifiques et non scientifiques, et pour ta vision de la vie. C'est maintenant toi le prochain sur la liste des Docteurs 😊. Merci à toi Ludivine pour les moments que nous avons partagé pendant ces 2 années, bon courage pour la suite, tiens bon ! Je vous souhaite à tous de bien profiter de vos dernières années de thèse et de passer une bonne soutenance, ainsi que de trouver un emploi qui vous convient pour la suite 😊 😊 😊. A bientôt !

Un immense merci à mes amis, ceux qui m'auront permis de rester dans la vie réelle, et qui ne m'auront pas lâchés lors de cette épreuve ! Un grand merci aux Dijonnais, Loïc et Lynda ainsi qu'au petit Bastien ! Merci à toi Romain M, copains de collège et lycée on s'est retrouvés en thèse dans la même université, et même si nos domaines de recherche n'étaient pas les mêmes, on a quand même su profiter de bons moments pendant ces années de Doctorat ! Bon courage pour ta fin de rédaction. Un grand merci également à Marion et Jérémie, merci à vous pour votre soutien et votre amitié, j'espère l'avenir vous permettra de vous retrouver rapidement ! Enfin je tiens à remercier mes binômes de TP à la fac, j'ai souvent dit aux étudiants que la clef de la réussite à la fac était de se trouver un bon binôme, et à chaque fois mes pensées étaient pour vous, Candice, Amélie (Casquette !) et Marion. Mille mercis à vous pour ces heures passées sur les bancs de la fac, les révisions plus ou moins sérieuses pour les partiels, mais aussi et surtout pour l'amitié après fac ! Je ne doute pas que ces amitiés dureront encore longtemps !

Voici maintenant le moment pour moi de remercier ceux sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, ma famille ! Un grand merci à tous les membres de ma famille en général, et plus particulièrement à toi Patou qui m'aura incité à faire cette thèse. Un immense merci également à mes parents et grands-parents sans qui je ne serais pas là à ce jour, merci pour votre soutien à tous les niveaux, vos encouragements et votre fierté ! Merci également à mes frères Julien et Axel et leur copines Elodie et Emeline, pour votre soutien, notamment lors des séances de vernis à ongles du dimanche soir, et vos encouragements.

A vous de vous de jouer maintenant ! J'ai été la 1ère à ouvrir le bal, mais d'ici quelques années on sera une belle bande de docteurs ! 😊 Enfin, mes derniers remerciements vont à toi Philippe, merci d'avoir été là, dans les bons comme dans les mauvais moments de cette thèse, au final tu en sais maintenant beaucoup aussi sur le TIMP-1 !

Sommaire

Liste des abréviations	23
Liste des tableaux	31
Liste des figures	33
INTRODUCTION.....	37
I. Les métalloprotéases matricielles (MMPs)	41
I.1. Classification des MMPs.....	41
I.2. Structure tridimensionnelle des MMPs.....	45
I.3. Régulation des MMPs	45
I.3.1. Régulation transcriptionnelle.....	47
I.3.2. Régulation post-transcriptionnelle.....	47
I.3.3. Régulation de l'activation des MMPS.....	49
I.3.4. Régulation de l'activité des MMPS.....	49
I.3.5. Régulation de la clairance des MMPs dans le milieu extracellulaire	51
I.4. Activités biologiques des MMPs.....	55
I.4.1. MMPs et migration cellulaire	55
I.4.2. MMPs et prolifération cellulaire	57
I.4.3. MMPs et mort cellulaire.....	59
I.4.4. MMPs et différenciation cellulaire	59
I.5. MMPs dans le contexte pathologique.....	61
I.5.1. MMPs et cancers.....	61
I.5.2. MMPs et maladies neurodégénératives.....	65
I.6. MMPs et stratégies thérapeutiques.....	69
II/ La famille des inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs).....	73
II.1. Structure	73
II.2. Expression et régulation.....	73
II.3. Rôles biologiques	75
II.4. Le TIMP-1	77
II.4.1. Structure	77
II.4.2. Expression et régulation du TIMP-1	77
III. Activités biologiques du TIMP-1.....	81
III.1. Activité inhibitrice de MMPs	81

III.1.1. Interaction TIMP-1 / MMPs.....	81
III.1.2. Effets biologiques associés.....	83
III.2 TIMP-1 et activités indépendantes de l'inhibition des MMPs	85
III.2.1. Le complexe récepteur CD44 / pro-MMP-9	87
III.2.2. Le complexe récepteur CD63 / Intégrine β 1	89
III.2.3. Les complexes récepteurs du TIMP-1 non identifiés et activités biologiques associées.	97
IV. Le rôle du TIMP-1 en contexte pathologique.....	103
IV.1. TIMP-1 et cancer	103
IV.2. TIMP-1 et maladies neurodégénératives	105
V. But du travail	107
MATERIEL ET METHODES.....	111
I. Etude <i>in silico</i> du TIMP-1.....	113
I.1. Analyse des modes normaux	113
I.2. Dynamique moléculaire	113
II. Lignées cellulaires et culture primaire	115
II.1. Culture primaire de neurones corticaux d'embryons de souris (E18)	115
II.2. La lignée cellulaire CHO.....	115
II.3. La lignée cellulaire MCF10A	117
II.4. La lignée cellulaire MCF10A déficiente en TIMP-1	117
II.4.1. Clonage du shRNA dirigé contre le TIMP-1 dans le vecteur pLMP	117
II.4.2. Transfection stable et sélection	119
II.5. La lignée cellulaire CHO surexprimant CD63	119
II.5.1. Clonage du CD63 dans le vecteur pQCXIP	121
II.5.2. Transfection stable et sélection	123
III. Production et purification du TIMP-1 et de ses mutants	123
III.1. Mutagenèse dirigée	123
III.2. Clonage dans le vecteur p3XFLAG CMV14	125
III.3. Production et purification du TIMP-1 et des mutants.....	127
III.4. Quantification du TIMP-1 et évaluation du taux de pureté.....	129
IV. Etude de l'expression protéique par immunoempreinte	131
IV.1. Préparation des extraits protéiques	131
IV.2. Electrophorèse et immunoempreinte	131
V. Etude de l'activité inhibitrice de MMPs	131

VI. Etude des interactions protéine-protéine <i>in vitro</i>	133
VI.1. Etude de l'interaction TIMP-1 / LRP-1.....	133
VI.1.1. Résonance plasmonique de surface.....	133
VI.1.2. Immunoprécipitation	135
VI.2. Etude de l'interaction TIMP-1 / pro-MMP-9 par immunoprécipitation	135
VI.3. Etude de l'interaction TIMP-1/CD63 par immunoprécipitation	135
VI.4. Etude de l'interaction TIMP-1/Domaine extracellulaire I (EDI) de CD63.....	137
VI.4.1. Synthèse du domaine extracellulaire 1 (EDI)	137
VI.4.2. Etude d'interaction	139
VI.5. Etude de l'interaction TIMP-1/Domaine extracellulaire II (EDII) de CD63.....	139
VI.5.1. Synthèse du domaine extracellulaire II (EDII)	139
VII. Etude de l'expression protéique par immunofluorescence	143
VII.1. Mise en évidence de la colocalisation entre LRP-1 et le TIMP-1 dans les neurones corticaux d'embryons de souris.....	143
VII.2. Etude de la morphologie neuronale par immunofluorescence	143
VII.2.1. Marquages par immunofluorescence	143
VII.2.2. Analyse de la taille du réseau neuritique	145
VII.2.3. Analyse du volume des cônes de croissance.....	145
VIII. Etude de l'endocytose par immunofluorescence	145
VIII.1. Marquages par immunofluorescence	145
VIII.2. Analyse de l'endocytose	147
IX. Etude de la survie cellulaire	147
X. Analyses statistiques.....	147
RESULTATS.....	149
Partie I : Identification d'un nouveau récepteur du TIMP-1 : le récepteur LRP-1	151
Partie II : Etude <i>in silico</i> de la dynamique du TIMP-1.....	181
I. Analyse de Modes Normaux (NMA).....	185
II. Dynamique moléculaire	187
III. Identification de résidus impliqués dans le mouvement	189
Partie III : Production de mutants du TIMP-1.....	193
I. Génération des mutants du TIMP-1	195
II. Production du TIMP-1 et des mutants	197
III. Purification du TIMP-1 et des mutants	197

IV. Mesure de l'activité inhibitrice de MMPs du TIMP-1 et des mutants	199
Partie IV : Etude de l'interaction du TIMP-1 et des mutants avec les récepteurs LRP-1	203
I. Etude de l'interaction avec le récepteur LRP-1	205
I.1. Effets des mutants du TIMP-1 sur la morphologie neuronale.....	205
I.1.1. Etude du réseau neuritique.....	205
I.1.2. Etude du volume des cônes de croissance	205
I.2. Etude de la liaison des mutants du TIMP-1 au récepteur LRP-1.....	207
I.3. Etude de l'endocytose des mutants par LRP-1.....	209
Partie V : Etude de l'interaction du TIMP-1 et des mutants avec le récepteur CD63	215
I. Etude de l'interaction du TIMP-1 et des mutants avec le récepteur CD63	217
I.1. Etude de la survie des cellules MCF10A	217
I.2. Etude de l'interaction du TIMP-1 et des mutants avec CD63	219
II. Etude de l'interaction du TIMP-1 avec CD63.....	219
III.3.1. Etude de l'interaction du TIMP-1 avec le domaine EDII	219
III.3.2. Etude de l'interaction du TIMP-1 avec le domaine EDI	221
DISCUSSION	225
BIBLIOGRAPHIE	245

Liste des abréviations

ADAM : *A disintegrin and metalloproteinase*

ADAM-TS : *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*

ADN : Acide desoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AP-2 : *Adipocyte Protein-2*

APP : *Amyloid precursor protein*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

A β : peptides β amyloïdes

α 2M R : *α -2 macroglobuline receptor*

α 2M : α -2 macroglobuline

BCA : *Bicinchoninic acid*

BET : Bromure d'éthidium

bFGF : *basic fibroblast growth factor*

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BSA : *Bovine serum albumin*

CD44 : *Cluster Differentiation 44*

CD63 : *Cluster Differentiation 63*

CHO : *Chinese hamster ovary*

C-TIMP-1 : Domaine C-terminal du TIMP-1

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DCC : *Deleted in colorectal cancer*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DN^{ase} : *Désoxyribonucléase*

dNTP : Déoxynucléotides

DTT : Dithiothréitol

ECD : *Extracellular domain*

EDI : Domaine extracellulaire I de CD63

EDII : Domaine extracellulaire II de CD63
EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid
EEA-1 : *Early endosome antigen-1*
EGF : *Epidermal growth factor*
EGTA : *Ethylene glycol tetraacetic acid*
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMMPRIN : *Extracellular matrix metalloproteinase inducer*
EPO : Erythropoïétine
ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*
F12A : Substitution de la phénylalanine 12 en Alanine
FAK : *Focal adhesion kinase*
GFP : *Green fluorescent protein*
GPI : *Glycosylphosphatidylinositol*
GTP : *Guanosine triphosphate*
HPLC : *High performance liquid chromatography*
HRP : *Horseradish peroxidase*
ICD : *Intracellular domain*
IGF : *Insulin growth factor*
IgG : Immunoglobuline G
IL : Interleukine
IPTG : *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*
K47A : Substitution de la lysine 47 en Alanine
kDa : kiloDalton
LB : *Lysogeny Broth*
LDL : *Low density lipoprotein*
LRP : *Low density lipoprotein receptor related protein*
MAP kinase : *Mitogen activated protein kinase*
MCF10A : *Michigan Cancer Foundation 10A*
MCP-3 : *Monocyte chemoattractant protein-3*
MDA-MB-231 : *M.D. Anderson - Metastatic Breast - 231*
MEC : Matrice extracellulaire
MEK : *MAP ERK Kinase*

MMP : *Matrix metalloproteinase*

MT-MMP : *Membrane type matrix metalloproteinase*

MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NEM : *N-Ethylmaleimide*

NGF : *Nerve growth factor*

N-TIMP-1 : Domaine N-terminal du TIMP-1

p/v : poids/volume

PBS : *Phosphate buffered saline*

PBS-B : PBS-Biomérieux

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDB : *Protein Data Bank*

PDGF : *Platelet-derived growth factor*

PFA : Paraformaldéhyde

pH : Potentiel hydrogène

PIC : *Protease inhibitor cocktail*

RAP : *Receptor associated protein*

RECK : *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*

RNA : *ribonucleic acid*

SDF-1 : *Stromal cell-derived factor-1*

SDS : *Sodium dodécyl sulfate*

SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

ShRNA : *Short hairpin RNA*

SNC : système nerveux central

SVF : Sérum de veau fœtal

T2A : Substitution de la thréonine 2 en Alanine

T2G : Substitution de la thréonine 2 en Glycine

TBE : *Tris borate EDTA*

TBS : *Tris buffered saline*

TBS-T : TBS-Tween

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF α : *Transforming growth factor α*

TIMP : *Tissue inhibitor of metalloproteinases*

TNF α : *Transforming growth factor α*

TRK : *Tropomyosin receptor kinase*

TSP : Thrombospondine

v/v : volume/volume

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VEGF-R : *Vascular endothelial growth factor receptor*

VMD : *Visual Molecular Dynamics*

W105A : Substitution du tryptophane 105 en Alanine

Liste des tableaux

Tableau I : Les substrats des MMPs	40
Tableau II: Structure et classification des MMPs	42
Tableau III: Tableau récapitulatif des ligands connus de LRP-1.....	54
Tableau IV: Caractéristiques des quatre membres de la famille des TIMPs	72
Tableau V: Structures du TIMP-1 obtenues par RMN ou cristallographie	76
Tableau VI: Séquence des oligonucléotides contenant le ShRNA TIMP-1	116
Tableau VII: Séquence des amorces utilisées pour le clonage de la glycoprotéine CD63 dans le vecteur pQCXIP.....	120
Tableau VIII: Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.....	122
Tableau IX: Séquence des amorces utilisées pour le clonage du TIMP-1 et des mutants dans le vecteur p3XFLAG CMV14.....	124
Tableau X: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunoempreintes.....	130
Tableau XI: Substrats spécifiques des MMPs utilisés pour les tests fluorimétriques	132
Tableau XII: Peptides générés par synthèse chimique pour étudier l'interaction du TIMP-1 avec le domaine EDI de CD63.....	136
Tableau XIII: Séquence des amorces pour le clonage du domaine extracellulaire II de la glycoprotéine CD63 dans le vecteur pQe30	138
Tableau XIV: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunofluorescence.....	142
Tableau XV: Tableau regroupant les constantes d'inhibition (Ki) issues de l'équation de Morrison ...	200
Tableau XVI: Tableau représentant les constantes de dissociation du TIMP-1 et des mutants avec les domaines DII et DIV de la protéine LRP-1 déterminées par résonance plasmonique de surface	207

Liste des figures

Figure 1: Structure tridimensionnelle du domaine catalytique des MMPs. Exemple de la MMP-2.....	44
Figure 2: Schéma du mécanisme d'activation des MMPs	48
Figure 3: Schéma représentant le mécanisme d'activation de la MMP-2 par la MT1-MMP	48
Figure 4: Schéma représentant les différentes voies d'endocytose	50
Figure 5: Représentation schématique de la structure du récepteur LRP-1	52
Figure 6: Rôles des MMPs dans les cancers.....	60
Figure 7: Rôles des MMPs dans les maladies neurodégénératives.....	64
Figure 8: Schéma représentant le clivage de l'APP par les sécrétases α , β , et γ	66
Figure 9: Figure représentant les similitudes entre les quatre TIMPs humains.....	74
Figure 10: Représentation schématique de la structure secondaire du TIMP-1.....	76
Figure 11: Représentation schématique de la structure 3D du TIMP-1 mettant en évidence les différentes structures de la protéine.....	78
Figure 12: Nomenclature de l'interaction substrat protéase	82
Figure 13: Représentation schématique de l'interaction entre le TIMP-1 et le site catalytique des MMPs	82
Figure 14: Représentation schématique des résidus du TIMP-1 impliqués dans l'inhibition des MMPs.	82
Figure 15: Représentation schématique de la glycoprotéine CD44 et de ses variants.	86
Figure 16: Représentation schématique de l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur proMMP-9/CD44 dans les cellules UT-7.....	88
Figure 17: Représentation schématique de la structure des tétraspanines.	88
Figure 18: Schéma représentant les hétérodimères formés par l'association des différentes sous unités α et β des intégrines, leur conférant leur spécificité de substrat.....	90
Figure 19: Représentation schématique de la structure des sous-unités α et β des intégrines	90
Figure 20: Représentation schématique des voies de signalisation permettant l'activation du dimère d'intégrine	92
Figure 21: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β 1 et régulant l'apoptose.....	94
Figure 22: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β 1 et modulant la prolifération cellulaire.....	94
Figure 23: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β 1 et modulant la migration cellulaire dans les cellules souches neuronales humaines.	96
Figure 24: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β 1 induisant la TEM dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7.	96
Figure 25: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β 1 inhibant la différenciation ostéogénique dans les cellules souches mésenchymateuses humaines.	96
Figure 26: Schéma des différentes structures d'un cerveau d'embryon de souris au stade 18 jours ..	114
Figure 27: Schéma représentant le vecteur pLMP.....	116
Figure 28: Schéma du vecteur pQCXIP.....	120
Figure 29: Schéma représentant le vecteur p3XFLAG-CMV-14.	124
Figure 30: Schéma du vecteur pQe30	138
Figure 31: Représentation du mouvement du TIMP-1 issu du mode 7.....	184

Figure 32: Etude de la contribution énergétique des différents résidus du TIMP-1 décrit par le mode 7	184
Figure 33: Fluctuations atomiques des carbones α du TIMP-1 issues des simulations de dynamique moléculaire.....	187
Figure 34: Superposition de l'énergie de déformation sur l'histogramme de fluctuation atomique du TIMP-1 lors de la dynamique moléculaire	189
Figure 35: Localisation des résidus à muter dans la structure tridimensionnelle du TIMP-1	190
Figure 36: Représentation schématique des mutants du TIMP-1	194
Figure 37: Etude de l'expression et de la sécrétion du TIMP-1 et des mutants par immunoempreinte	196
Figure 38: Etude de l'expression du TIMP-1 et des mutants par immunofluorescence	196
Figure 39: Dissociation des complexes pro-MMP-9/TIMP-1 avant l'étape de purification	198
Figure 40: Analyse de la pureté du TIMP-1 et des mutants	198
Figure 41: Mesure de l'activité inhibitrice du TIMP-1 sauvage et des mutants vis-à-vis des MMP-1, -2, -3 et -9	200
Figure 42: Mesure de l'activité inhibitrice du TIMP-1 et des mutants vis-à-vis de la MT1 MMP	201
Figure 43: Effet des mutants du TIMP-1 sur le réseau neuritique.....	204
Figure 44: Effet des mutants du TIMP-1 sur le volume des cônes de croissance.....	206
Figure 45: Endocytose des mutants médiée par LRP-1 à 10 minutes.....	208
Figure 46: Histogramme représentant les coefficients de corrélation entre le TIMP-1 et le marqueur EEA1.....	209
Figure 47: Endocytose des mutants médiée par LRP-1 à 1 heure	210
Figure 48: Histogramme représentatif des coefficients de corrélation entre le TIMP-1 et le marqueur EEA1.....	211
Figure 49: Génération d'une lignée cellulaire MCF10A n'exprimant plus le TIMP-1	216
Figure 50: Effet du TIMP-1 et des mutants sur la viabilité de la lignée cellulaire MCF10A sh TIMP-1 .	216
Figure 51: Etude de l'interaction des mutants du TIMP-1 avec la glycoprotéine CD63	218
Figure 52: Schéma représentatif de la structure de la glycoprotéine CD63	218
Figure 53: Etude de l'expression du domaine EDII de CD63.....	220
Figure 54: Etude de la liaison du TIMP-1 au domaine EDI de CD63	221
Figure 55: Schéma représentatif des peptides chevauchants P1, P2 et P3 au sein de la séquence du domaine EDI de CD63.....	221
Figure 56: Etude de l'interaction du TIMP-1 avec les peptides P1, P2 et P3 issus du domaine EDI.....	222
Figure 57: Etude de la liaison du TIMP-1 au peptide EDI a.....	223
Figure 58: Etude de l'effet du N-TIMP-1 sur la morphologie neuronale.	232
Figure 59: Etude de l'interaction entre le TIMP-1 (wt) ou les mutants et la pro-MMP-9.....	238
Figure 60: Simulation de l'ancrage du domaine EDI dans la membrane plasmique	240
Figure 61: Représentation surfacique du TIMP 1 avec les 5 sites de liaison à forte probabilité pour le peptide P2	242

INTRODUCTION

Dans les organes et tissus, la matrice extracellulaire (MEC) assure la cohésion des cellules entre elles et régule la prolifération, la migration, la différenciation, l'adhérence et l'apoptose cellulaire (Bosman and Stamenkovic, 2003). D'un point de vue structural, la MEC est un environnement complexe formé par un réseau de protéines fibreuses telles que le collagène, protéine ubiquitaire permettant la résilience des tissus, ou l'élastine qui confère aux tissus leur élasticité. La MEC est également riche en glycosaminoglycanes, macromolécules glycosylées permettant de maintenir son hydratation. Cette matrice est également composée de glycoprotéines (fibronectine, vitronectine, laminines...) qui permettent une interaction directe entre les cellules et la matrice, de protéoglycanes liant de façon covalente les glycosaminoglycanes et enfin de protéines matricielles telles que les thrombospondine-1 et -2 et les tenascine-C et -X. Ces protéines sécrétées par les cellules de la MEC se lient aux récepteurs cellulaires et aux protéines matricielles (Bornstein and Sage, 2002; Mecham, 2012). La MEC constitue un réservoir nutritionnel pour les cellules et est impliquée dans les interactions avec les cellules. Il s'agit par conséquent d'une structure dynamique en perpétuel renouvellement impliquant des processus de synthèse et de dégradation. La dégradation des protéines de la MEC est assurée par des protéinases, telles que les sérine protéinases ou certaines cystéine protéinases (Bonnans et al., 2014). Cependant, les enzymes majoritairement impliquées dans le remodelage matriciel appartiennent à la famille des métalloprotéases. Cette famille protéique comporte les métalloprotéinases matricielles (MMPs), les métalloprotéinases contenant un domaine désintégrine (ADAMs) ainsi que celles couplées à des motifs thrombospondines (ADAM-TS) (Lu et al., 2011). Le clivage des protéines de la MEC permet la libération de fragments possédant une activité biologique et appelés matrikines et matricryptines (Ricard-Blum and Salza, 2014). La régulation de la dégradation matricielle est assurée par des inhibiteurs tissulaires spécifiques de ces MMPs, les TIMPs. En plus de leur activité inhibitrice de MMPs, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases matricielles (TIMPs) peuvent interagir de façon directe avec les cellules du microenvironnement et ainsi réguler différentes fonctions cellulaires (Brew and Nagase, 2010).

MMP	Nom	Substrat
Collagénases		
MMP-1	Collagénase-1	Collagène I, II, III, VII, VIII et X, gélatine, protéoglycane, téna-scine, entactine
MMP-8	Collagénase-2	Collagène I, II, III, V, VIII et X, gélatine, aggrécane
MMP-13	Collagénase-3	Collagène I, II, III, IV, IX, X et XIV, gélatine, téna-scine, fibronectine, aggrécane, ostéonectine
Gélatinases		
MMP-2	Gélatinase A	Collagène I, IV, V, VII, X, XI et XIV, gélatine, élastine, fibronectine, lamininé, aggrécane, versicane, ostéonectine, protéoglycane
MMP-9	Gélatinase B	Collagène IV, V, VII, X, XIV, gélatine, élastine, aggrécane, versicane, protéoglycane, ostéonectine
Stromélysines		
MMP-3	Stromélysine-1	Collagène III, IV, V et IX, gélatine, aggrécane, versicane, protéoglycane, téna-scine, fibronectine, laminine, ostéonectine
MMP-10	Stromélysine-2	Collagène II, IV, V, gélatine, caséine, aggrécane, élastine, protéoglycane
MMP-11	Stromélysine-3	Caséine, laminine, fibronectine, gélatine, collagène IV, transferrine
Membrane type		
MMP-14	MT1-MMP	Collagène I, II, III, caséine, élastine, fibronectine, vitronectine, tenascine, protéoglycane, laminine, entactine, pro-MMP-2, pro-MMP-13, CD44, ApoE
MMP-15	MT2-MMP	Tenascine, fibronectine, laminine, pro-MMP-2, perlecane, collagène I
MMP-16	MT3-MMP	Collagène III, gélatine, caséine, fibronectine, pro-MMP-2, laminine 1,
MMP-17	MT4-MMP	Gélatine, fibrine/fibrinogène, pro-TNF, ADAMTS4
MMP-24	MT5-MMP	Gélatine, pro-MMP-2, fibronectine, laminine 1, N-cadhérine
MMP-25	MT6-MMP	Gélatine, Collagène IV, fibronectine, fibrinogène/fibrine, vimentine, galectine-1
Matrilysines		
MMP-7	Matrilysine-1	Collagène IV et X, gélatine, aggrécane, protéoglycane, fibronectine, laminine, entactine, tenascine, caséine, transferrine, intégrine β 4, ostéonectine, élastine
MMP-26	Matrilysine-2	Collagène IV, fibrinogène, fibronectine, caséine
Autres		
MMP-12	Métalloélastase	Collagène IV, gélatine, élastine, caséine, laminine, protéoglycane, fibronectine, vitronectine, entactin
MMP-20	Enamelysine	Amelogénine
MMP-23	CA-MMP	Gélatine
MMP-27	CMMP	Gélatine, caséine
MMP-28	Epily-sine	Caséine
MMP-19		Collagène IV, gélatine, laminine, entactine, fibronectine, aggrécane
MMP-21	X-MMP	Gélatine, caséine

Tableau I : Les substrats des MMPs (d'après Rodríguez et al., 2007)

I. Les métalloprotéases matricielles (MMPs)

Les MMPs sont des endopeptidases de la superfamille des metzincines. Elles sont caractérisées par la présence d'un ion zinc stabilisé au sein de leur site actif grâce à des liaisons avec les résidus histidyles du motif HEXGHXXGXXHD. L'ion zinc et le résidu glutamate sont nécessaires à l'activité enzymatique. Les MMPs dégradent au moins un composant de la MEC. Elles sont sécrétées sous forme latente ou zymogène et maintenues inactives par coordination du Zn^{2+} avec un résidu cystéine. Le déplacement ou la protéolyse ménagée de leur pro-domaine libère leur site actif (Piperi and Papavassiliou, 2012).

La première MMP a été caractérisée en 1962 chez le têtard (Gross and Lapiere, 1962). Depuis, 23 MMPs humaines ont été identifiées et caractérisées.

I.1. Classification des MMPs

Les MMPs ont d'abord été classées selon leur spécificité de substrat, ce qui a permis d'établir cinq groupes: les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines et les MMPs transmembranaires (Tableau I).

Cependant, la découverte au fil des années de nouveaux substrats pour les différentes MMPs a amené un autre type de classification basée sur leur structure. Cette nouvelle classification répartit les MMPs en 8 groupes (Egeblad and Werb, 2002) : 5 groupes comprenant les MMPs sécrétées dans la MEC et 3 groupes pour les MMPs transmembranaires (Tableau II).

Le premier groupe comprend les MMPs à domaine minimal composé d'une séquence signal à l'extrémité N-terminale, d'un propeptide avec un groupement thiol liant le zinc et permettant de maintenir les MMPs dans leur forme inactive et d'un domaine catalytique (Gupta and Patil, 2012) (Tableau II.a).

Le second groupe est composé de MMPs à domaine homologue à l'hémopexine possédant à leur extrémité C-terminale un domaine hémopexine (Tableau II.b). Ce domaine est connecté au domaine catalytique par une région charnière nécessaire à la stabilité et à l'activité collagénolytique. La composition et la taille de cette région charnière varient selon les MMPs et influencent la spécificité de substrat (Knäuper et al., 1997). Le domaine hémopexine permet l'interaction des MMPs avec diverses molécules présentes à la surface des cellules (Intégrines, LRP-1...), les TIMPs et certains substrats des MMPs tels que le collagène, ... (Lafleur et al., 2006; Morrison and Overall, 2006; Patterson et al., 2001). Il est composé de quatre motifs protéiques répétés et de structure proche. Le premier et le dernier de ces motifs sont reliés par un pont disulfure.

Structure	Groupe	N°
<p>a/ MMPs à domaine minimal</p>	Matrilysine NC	MMP-7 MMP-26
<p>b/ MMPs à domaine homologue à l'hémopexine</p>	Collagénase Stromélysine Elastase NC NC NC NC	MMP-1, -8, -13 MMP-3, -10 MMP-12 MMP-27 MMP-19 MMP-20 MMP-27
<p>c/ MMPs gélatinases</p>	Gélatinase	MMP-2, -9
<p>d/ MMPs activables par la furine</p>	Stromélysine NC	MMP-11 MMP-28
<p>e/ MMPs à domaine similaire à la vitronectine</p>	NC	MMP-21
<p>f/ MMPs transmembranaire</p>	MT1-MMP MT2-MMP MT3-MMP MT5-MMP	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-24
<p>g/ MMPs ancrées par un GPI</p>	MT4-MMP MT6-MMP	MMP-17 MMP-25
<p>h/ MMP transmembranaire de type II</p>	NC	MMP-23 B

Tableau II: Structure et classification des MMPs (d'après Sternlicht and Werb, 2001; Visse and Nagase, 2003). Pre : Pré-domaine ; Pro : Pro-domaine, Cat : Domaine catalytique ; Zn : Ion Zinc catalytique ; Ch : Région Charnière ; Fn : Domaine similaire à la fibronectine ; Fu : Domaine de liaison à la furine ; Vn : Domaine similaire à la vitronectine ; TM : Domaine transmembranaire ; GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol ; CA : région riche en cystéine ; Ig like : Domaine similaire aux immunoglobulines ; SA : Signal d'ancrage ; NC : Non classifié dans la classification selon les substrats

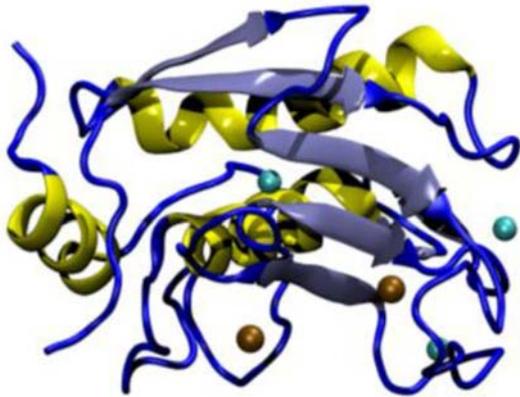
Le troisième groupe des MMPs comprend les gélatinases possédant des séquences riches en cystéines au sein de leur domaine catalytique (Tableau II.c). Ces séquences répétées sont similaires à celles de la fibronectine liant le collagène. Elles sont nécessaires pour la liaison et le clivage du collagène et de l'élastine (Murphy et al., 1994; Shipley et al., 1996).

Le quatrième groupe est composé des MMPs sécrétées et activables par la furine (Tableau II.e). Ces MMPs possèdent des motifs de reconnaissance pour la furine situés entre le propeptide et le domaine catalytique. Le clivage de ce site par la furine induit l'activation de ces MMPs dans le cytoplasme (Pei and Weiss, 1995; Remacle et al., 2006) (Tableau II.d). Ces motifs de reconnaissance pour la furine sont également retrouvés au sein des groupes 5, 6, 7 et 8.

La MMP-21 constitue à elle seule le 5^e groupe et possède un domaine similaire à la vitronectine. Cette région située en amont du site de reconnaissance à la furine permet d'influencer la liaison au substrat et aux TIMPs, de même que l'activation membranaire des zymogènes (Sternlicht and Werb, 2001).

Les groupes 6, 7 et 8 correspondent aux MMPs transmembranaires. Les MMPs du groupe 6 possèdent un domaine transmembranaire simple et une petite partie C-terminale cytosolique (Tableau II.f). Le groupe 7 correspond aux MMPs ancrées à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Cette localisation membranaire joue un rôle important dans l'activation protéolytique à la surface cellulaire (Itoh et al., 1998b; Kojima et al., 2000) (Tableau II.g). Le groupe 8 est composé uniquement de la MMP-23. Contrairement aux autres MMPs transmembranaires, le signal d'ancrage est localisé à son extrémité N-terminale. Elle est également caractérisée par un domaine riche en cystéine et un domaine de type immunoglobuline situé à l'extrémité C-terminale impliqué dans les interactions avec les cellules (Pei, 1999; Pei et al., 2000; Velasco et al., 1999) (Tableau II.h).

A



B

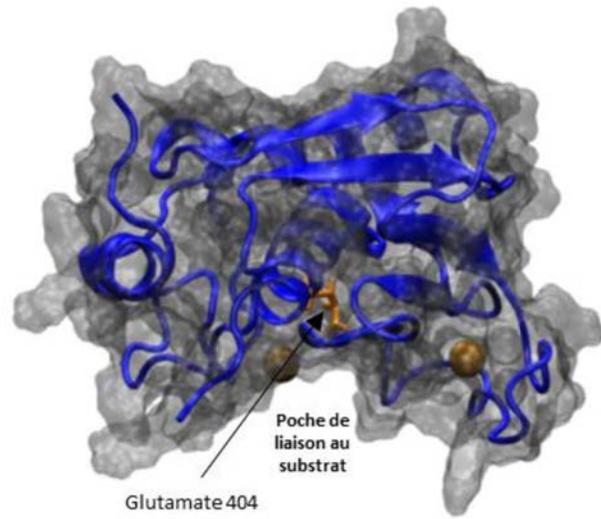


Figure 1: Structure tridimensionnelle du domaine catalytique des MMPs. Exemple de la MMP-2

A. Structure secondaire du domaine catalytique de la MMP-2, commune à tous les membres de la famille des MMPs (hélice α : jaune, brins β : gris, ions zinc : ocre, ions calcium : cyan).

B. Représentation surfacique du domaine catalytique de la MMP-2 mettant en évidence la poche de liaison au substrat et notamment le glutamate 404 (résidu orange) impliqué dans l'interaction des MMPs avec leurs substrats.

I.2. Structure tridimensionnelle des MMPs

De nombreuses données sur la structure tridimensionnelle des MMPs sont aujourd'hui disponibles et ont principalement été obtenues par cristallographie par diffraction des rayons X et résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces données concernent la structure de certaines MMPs sous forme inactive (pro-MMP-1 humaine (PDB : 1SU3) ; pro-MMP-2 humaine (PDB : 1CK7)), de certains domaines catalytiques (domaines catalytiques de la MMP-3 humaine (PDB : 1CQR), de la MMP-2 humaine (PDB : 1QIB), de la MMP-10 humaine (PDB : 1Q3A), ou de MMPs complexées à leurs inhibiteurs (Complexe MT1-MMP/TIMP-2 (PDB : 1BUV), complexe pro-MMP-2/TIMP-2 (PDB : 1GXD), domaine catalytique de la MMP-1 complexé avec le domaine inhibiteur du TIMP-1 (PDB : 2J0T), complexe MT1-MMP/TIMP-1 (PDB : 3MA2)). Ces données ont mis en évidence que le propeptide est composé de trois hélices α et que le domaine catalytique présente un repliement structural superposable dans toutes les MMPs. Le domaine catalytique des MMPs composé de 5 feuillets β et 3 hélices α , contient 2 ions zinc, un situé au sein du site catalytique et un second impliqué dans la structure, et jusqu'à trois ions calcium stabilisant la structure (Visse and Nagase, 2003)(Figure 1A). Les MT-1, -2, -3 et -5 MMPs possèdent 8 résidus supplémentaires entre le deuxième et le troisième brin β . Dans la MT1-MMP, ces résidus forment une boucle impliquée dans la fonction activatrice de la pro-MMP-2 (Lang et al., 2004). Les études sur la structure tridimensionnelle des MMPs ont également mis en évidence des zones hydrophobes à la surface des MMPs et notamment une poche dans laquelle le ligand se fixe. La profondeur de cette poche varie selon les MMPs et confère aux MMPs leur spécificité de substrat (Bode et al., 1999a)(Figure 1B). Les répétitions de type fibronectine présentes dans les MMPs du groupe 3 sont situées au sein de la boucle localisée entre le cinquième brin β et l'hélice du site catalytique et sont composées de deux brins β anti parallèles connectés par une courte hélice α et stabilisés par deux ponts disulfures. Le domaine hémopexine présente une structure d'hélice à quatre pales, avec un pont disulfure entre la première et la dernière pale (Nagase et al., 2006).

I.3. Régulation des MMPs

L'expression, la sécrétion et l'activité des MMPs varient en fonction des conditions physiopathologiques. Lors des phénomènes de cicatrisation ou dans certaines pathologies telles que l'arthrite, les cancers ou certaines maladies neurodégénératives, on observe une augmentation des taux d'ARNm et/ou protéiques des MMPs ainsi que de leur activité (Benson et al., 2013; Kazantseva et al., 2013; Mroczko et al., 2014). Les MMPs sont hautement régulées au niveau transcriptionnel, mais également au niveau de leur activation, de leur l'inhibition et de leur clairance (Sternlicht and Werb, 2001).

1.3.1. Régulation transcriptionnelle

A l'exception de la MMP-2 qui a une expression constitutive, les promoteurs des gènes codant les MMPs sont inductibles et possèdent à proximité du site d'initiation de leur transcription, des sites de liaison pour les facteurs de restriction AP-1 et PEA3 (Benbow and Brinckerhoff, 1997; Lohi et al., 2000).

De nombreux facteurs peuvent induire ou réprimer la transcription des gènes codant les MMPs tels que les esters de phorbol, des facteurs de croissance (EGF, bFGF, PDGF, TGF- α et NGF), des cytokines (IL-1 β , IL-6), des hormones (corticostéroïdes), les glycoprotéines membranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines appelées Basigines, le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), les protéines de la MEC, le stress cellulaire, ou encore le changement de phénotype cellulaire (Chakraborti et al., 2003; Han et al., 2001; Sternlicht and Werb, 2001; Toole, 2003). Cette régulation génique implique diverses voies de signalisation cellulaire. Certaines voies de signalisation peuvent avoir des effets antagonistes, comme la voie des MAP kinases qui activent ou répriment la transcription des MMPs en fonction du type cellulaire (Johansson et al., 2000; Westermarck and Kähäri, 1999).

1.3.2. Régulation post-transcriptionnelle

i. Stabilité des ARNm

Ce niveau de régulation modifie le temps de demi-vie de l'ARNm en le protégeant de l'action des ribonucléases. Par exemple, les ARNm de la MMP-13 sont stabilisés par le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) et les glucocorticoïdes, alors que le TGF- β (*Transforming Growth Factor*) les déstabilise (Delany et al., 1995; Rydziel et al., 1997). Les ARNm de la MMP-1 et -3 sont quant à eux stabilisés par les esters de phorbol et l'EGF (*Endothelial Growth Factor*) (Vincenti, 2001).

ii. Sécrétion des MMPs

Ce niveau de régulation permet de réguler la libération des MMPs dans le milieu extracellulaire. Par exemple, les MMP-8 et -9 sont synthétisées par les granulocytes en différenciation dans la moelle osseuse et sont stockées dans des granules spécifiques des neutrophiles circulants. Ce n'est qu'après activation de ces neutrophiles par des médiateurs inflammatoires que ces MMPs seront sécrétées (Hasty et al., 1990). Dans les macrophages, la plasmine et la thrombine sont capables d'augmenter la sécrétion de la MMP 12, sans modifier le taux d'ARNm, ce qui suggère également une régulation de la sécrétion de ces MMPs (Raza et al., 2000).

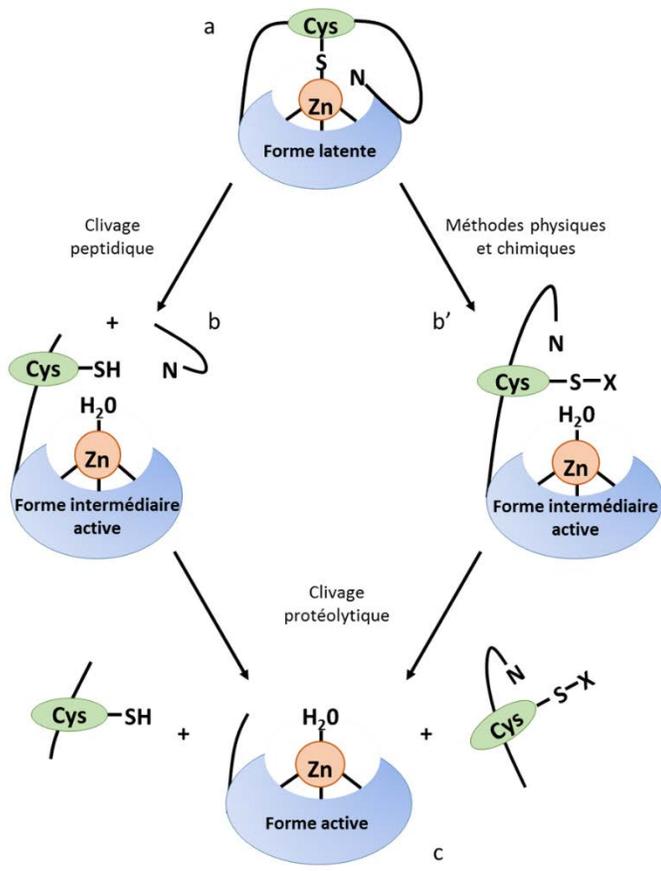


Figure 3: Schéma du mécanisme d'activation des MMPs (D'après Chakraborti et al., 2003)

La première étape d'activation correspond au clivage peptidique du pro-domaine des MMPs. Il peut être réalisé par des MMPs actives ou des protéases à sérine (b) ou par des méthodes physiques ou chimiques (b'). La seconde étape d'activation correspond au clivage protéolytique afin d'obtenir une forme active. Cette étape est réalisée par des MMPs actives (c).

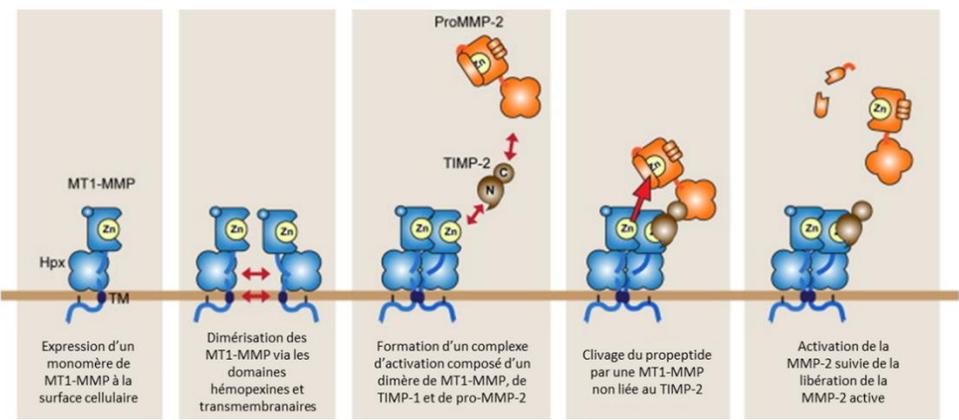


Figure 2: Schéma représentant le mécanisme d'activation de la MMP-2 par la MT1-MMP (d'après Itoh et al., 2015)

Le TIMP-2 se lie à une MT1-MMP. Une fois la pro-MMP-2 liée à ce complexe récepteur, une deuxième MT1-MMP va réaliser le clivage protéolytique permettant d'activer la MMP-2.

1.3.3. Régulation de l'activation des MMPs

Les MMPs sont sécrétées sous forme inactive, appelée zymogène. Cet état inactif est maintenu grâce à un résidu cystéyle situé au sein du motif consensus PRCGXPDV en position C-terminale du propeptide. Ce résidu lie l'atome de zinc situé dans le site actif de l'enzyme et empêche ainsi son activation (Figure 2a). La première étape d'activation des MMPs nécessite le clivage peptidique du pro-domaine. Ce clivage peut être réalisé par des MMPs actives ou par des protéases à sérine. Une réaction d'hydratation libère le groupe thiol de la MMP (Figure 2b). La déstabilisation du pro-domaine peut également être réalisée par des méthodes physiques (Traitement à pH acide et à température élevée) ou chimiques (SDS, NaSCN, métaux lourds Au(I), Hg(II), les composés organo-mercuriques, les oxydants tels que NaOCl, les composés disulfures tels que le glutathion (GSSG) et les agents alkylant le groupement SH tels que l'urée et le NEM (N-éthylmaléimide)) (Figure 2b') (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990).

La deuxième étape de l'activation des MMPs est un mécanisme commun à toutes les MMPs, excepté pour la MMP-2. Il correspond au clivage protéolytique du côté C-terminal de la séquence PRCGXPDV, par des enzymes activatrices telles que la MMP-3, ou par un clivage autolytique induisant une perte irréversible du résidu cystéyle (Figure 2.c).

La MMP-2 a un processus d'activation différent dû à sa résistance à l'action des protéases. Son activation se fait grâce à la MT1-MMP et le TIMP-2. Le TIMP-2 se lie à la MT1-MMP, formant ainsi un complexe non inhibiteur, agissant comme récepteur pour la pro-MMP-2. Ce complexe ternaire est ensuite localisé à proximité d'une autre MT1-MMP membranaire, qui va permettre le clivage protéolytique de la pro-MMP-2 et *in fine* son activation (Figure 3) (Bernardo and Fridman, 2003; Itoh, 2015; Lehti et al., 2002).

1.3.4. Régulation de l'activité des MMPs

L'inhibition de l'activité protéolytique des MMPs est réalisée grâce à des inhibiteurs endogènes. Parmi ces inhibiteurs, les inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs) forment des complexes stœchiométriques 1:1 avec les MMPs. Dans le plasma, les MMPs peuvent également être inhibées par l' α 2-macroglobuline. A la surface cellulaire, la glycoprotéine membranaire RECK (*Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*) inhibe la MT1-MMP et les MMP-2 et -9 (Oh et al., 2001). D'autres protéines telles que l'inhibiteur de sérine protéase TFPI-2 (*Tissue Factor Pathway Inhibitor-2*), ou des fragments issus de la dégradation protéique, par exemple le produit de clivage de la protéine *procollagen-C-terminal proteinase enhancer protein* par la plasmine, inhibent les MMPs mais ces résultats restent controversés (Herman et al., 2001; Mott et al., 2000).

Endocytose

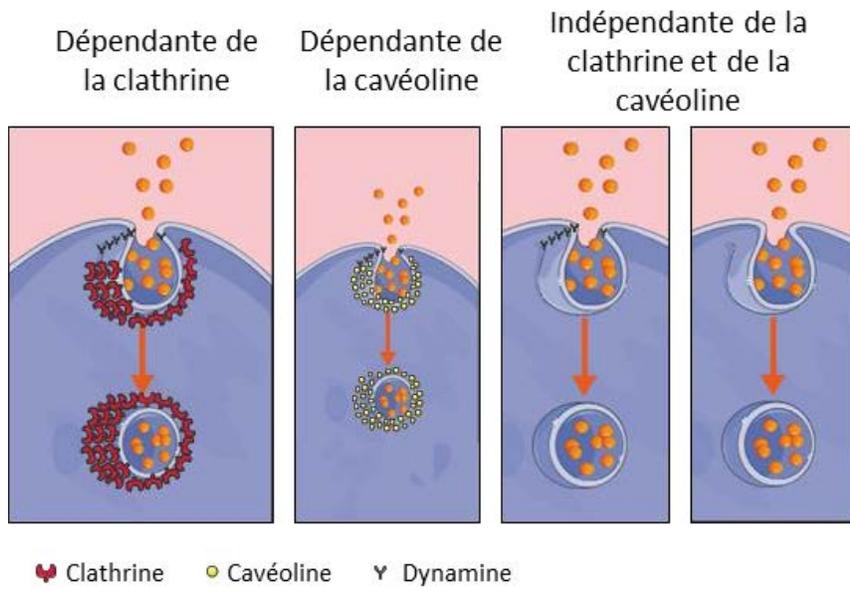


Figure 4: Schéma représentant les différentes voies d'endocytose (d'après Mayor and Pagano, 2007)

1.3.5. Régulation de la clairance des MMPs dans le milieu extracellulaire

L'activité protéolytique des MMPs peut être régulée de façon indirecte, par endocytose. En effet, ce processus va limiter la protéolyse matricielle en diminuant la quantité de MMPs ou de leurs inhibiteurs (TIMPs) présents dans le milieu extracellulaire (Emonard et al., 2005).

a. Le processus d'endocytose

L'endocytose correspond à une invagination de la membrane plasmique, formant ainsi une vésicule intracellulaire permettant soit le recyclage des composés endocytés à la surface des cellules, soit leur dégradation par les lysosomes. Il existe différents types d'endocytose, classés selon la composition de la membrane invaginée et les différents récepteurs impliqués (Doherty and McMahon, 2009) (Figure 4). Dans la plupart des processus d'endocytose, la dynamine, qui est une GTPase, intervient en permettant la constriction et la fission des vésicules (Sever et al., 2013). On distingue ensuite 2 voies majoritaires :

- L'endocytose dépendante de la clathrine se produit au niveau d'une zone de la membrane plasmique riche en clathrine. Cette voie peut être constitutive ou spécifique lorsqu'elle implique un récepteur transmembranaire. Lorsqu'un récepteur est impliqué, une protéine adaptatrice de type AP-2 (*adaptor protein-2*) va permettre l'endocytose en se liant à la fois à une clathrine et à une séquence YXXL (X : résidu polaire) présente dans la partie intracellulaire du récepteur (Li et al., 2000; Mishra et al., 2004). Une fois la membrane plasmique invaginée, les vésicules recouvertes de clathrine seront dirigées vers les endosomes précoces.

- L'endocytose dépendante de la cavéoline forme des vésicules au niveau de domaines riches en cholestérol (radeaux lipidiques) au sein desquels est présente la cavéoline. Dans ce type d'endocytose, les vésicules sont de forme ovoïde plutôt que sphérique. Les vésicules formées sont capables de fusionner afin de former des endosomes précoces ou des structures particulières appelées cavéosomes (Parton and Howes, 2010).

D'autres voies d'endocytose ont également été décrites, indépendantes de la clathrine ou de la cavéoline. Ces voies font appel à des protéines cargo et sont majoritairement dépendantes du cholestérol (Damm et al., 2005).

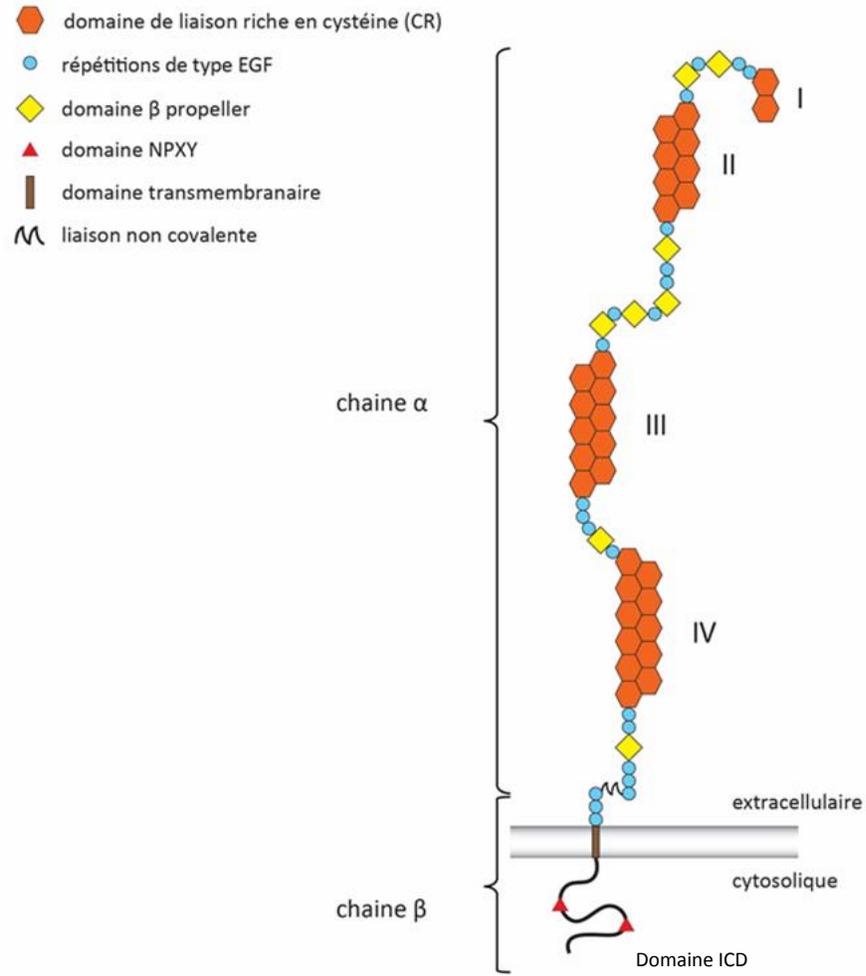


Figure 5: Représentation schématique de la structure du récepteur LRP-1 (d'après Emonard et al., 2014)

b. Endocytose des MMPs et de leurs inhibiteurs par le récepteur LRP-1

La clairance des MMPs et de leurs inhibiteurs est principalement assurée par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et implique principalement les récepteurs aux LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Emonard et al., 2005). Parmi ces récepteurs, il y a le récepteur LRP-1, connu sous le nom de récepteur de l' α 2-macroglobuline (α 2MR), récepteur de l'apolipoprotéine (APOER) ou CD91. Ce récepteur est composé d'une grande chaîne α extracellulaire de 515 kDa liée de façon non covalente à une petite chaîne β majoritairement intracellulaire de 85 kDa. La chaîne β possède un domaine transmembranaire à une seule traversée et un domaine intracellulaire (ICD) d'environ 100 acides aminés incluant 2 motifs NPXY nécessaires au processus d'endocytose et capables d'interagir avec différentes molécules adaptatrices et des protéines de signalisation. La chaîne α est exclusivement extracellulaire et est composée de régions riches en cystéine faisant apparaître 4 domaines de liaison aux ligands (DI à DIV) (Lillis et al., 2008) (Figure 5). Les domaines DII et DIV sont les domaines majoritairement impliqués dans la liaison des différents ligands (Neels et al., 1999; Willnow et al., 1994). Des études basées sur une structure cristallographique d'un domaine commun aux protéines de la famille LRP et du domaine III de la protéine RAP (*Receptor Associated Protein*), le ligand préférentiel de LRP, ont montré que l'interaction des ligands est commune aux membres de cette famille. Cette interaction se fait entre des résidus basiques du ligand et des résidus aspartyles des régions riches en cystéines et un ion calcium Ca^{2+} (Fisher et al., 2006b).

Plus d'une quarantaine de ligands de LRP-1 ont été identifiés (Tableau III) (Etique et al., 2013; Herz and Strickland, 2001). LRP-1 est capable de réguler par endocytose le taux extracellulaire des MMP-2, -9 et -13 (Emonard et al., 2005). L'endocytose des MMP-2 et -13 implique leur fixation préalable à des récepteurs situés à proximité de LRP-1 (Barmina et al., 1999; Emonard et al., 2004). L' α 2-macroglobuline complexée aux MMPs pouvant être endocyté par LRP-1 (Arandjelovic et al., 2005). D'autres complexes formés avec les MMPs sont endocytés via le récepteur LRP-1 : la thrombospondine-2 se lie à la MMP-2 et est ainsi endocytée (Yang et al., 2001). En revanche, pour la MMP-9, un site de fixation direct à LRP-1 a été identifié au sein de son domaine hémopexine (Van den Steen et al., 2006). LRP-1 est également capable d'endocyter les TIMP-1, -2 et -3. Leur fixation à LRP-1 peut être indirecte, sous la forme de complexe avec des pro-MMPs (ex : Pro-MMP-9/TIMP-1, Pro-MMP-2/TIMP-2), ou directe dans le cas des TIMP-2 et TIMP-3 (Emonard et al., 2004; Scilabra et al., 2013).

Ligand	Fonction biologique
ApoE Lipase lipoprotéique Lipase hépatique	Lipoprotéine de métabolisme et de transport
Facteur Ixa Facteur VIIIa Facteur VIIa/TFPI	Coagulation sanguine
Protéine activatrice des sphingolipides	
Protéine de zone de grossesse $\alpha 2M$	Inhibiteurs de Pan-protéase, infection
Complément C3	Infection
Inhibiteur C1	Régulation de l'activité C1r/C1s
Antithrombine III TFPI Cofacteur II de l'héparine	Régulation coagulation sanguine
Antitrypsine- $\alpha 1$	Régulation de l'enzyme neutrophile
APP	Rôle physiologique non clair
Thrombospondine 1	Activation TGF- β , Interaction matrice extracellulaire/cellule
Thrombospondine 2 Exotoxine 1 de <i>Pseudomonas</i>	Assemblage du collagène, Interaction matrice extracellulaire/cellule
Lactoferrine	Anti-bactérien
Rhinovirus	
RAP	Protéine chaperone
HSP-96	Protéine chaperone
Protéine Tat-HIV	Activation transcriptionnelle
tPA	Fibrinolyse, Fonction de signalisation nerveuse
(pro)uPA	Migration cellulaire et cicatrisation tissulaire
PAI-1	Régulation de l'activité tPA/uPA
tPA, uPA/PAI-1 uPA/PAI-2	
Précurseur de l'héparanase Procathepsine-D ADAMTS-5	Nombreuses activités biologiques
Elastase neutrophile	Protéase à sérine
(pro)MMP-2/TSP-1,-2 (pro)MMP-9 (pro)MMP-13	Protéases matricielles
TIMP-1 TIMP-2 TIMP-3	Inhibiteurs de MMPs et activités de type cytokine
(pro)MMP-2/TIMP-2 (pro)MMP-9/TIMP-1	

Tableau III: Tableau récapitulatif des ligands connus de LRP-1 (d'après Etique et al., 2013 et Herz and Strickland, 2001)

I.4. Activités biologiques des MMPs

L'activité protéolytique des MMPs permet l'activation ou l'inactivation autocrine ou paracrine de molécules de signalisation, l'altération des interactions cellules-cellules et cellules-matrice. Cette activité protéolytique peut également activer ou inhiber différents récepteurs membranaires et dégrader les protéines structurales de la MEC générant ainsi des fragments de molécules bioactifs, appelés matrikines (Ricard-Blum and Salza, 2014; Sternlicht and Werb, 2001). Parmi les substrats des MMPs, on retrouve des molécules structurales de la MEC (collagène, élastine, fibronectine,...), des protéines circulantes (α 2-macroglobuline, IL-1 β ,...) mais également des protéines présentes à la surface des cellules (E-cadhérine, CD44...) (Enghild et al., 1989; Ito et al., 1996; Lochter et al., 1997; Murphy et al., 1991a). L'activité protéolytique des MMPs aura pour conséquence des modifications du comportement cellulaire et notamment de la migration, de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose cellulaire (Sternlicht and Werb, 2001).

I.4.1. MMPs et migration cellulaire

Le clivage de certains composants de la MEC par les MMPs peut induire une perte d'adhérence cellulaire et favoriser le processus migratoire (Seiki, 2002; Vu and Werb, 2000). Par exemple, des kératinocytes cultivés sur un gel de collagène dont le site de clivage par les collagénases a été supprimé ne migrent plus. Ce résultat montre qu'une dégradation du collagène par les MMPs est nécessaire à la migration de ces cellules (Pilcher et al., 1997). De la même manière, la migration d'ostéoclastes cultivés en gel de collagène est inhibée par des inhibiteurs de MMPs à large spectre, le RP59794 et le BB 94 (Sato et al., 1998). Le clivage de la sous-unité γ 2 de la laminine 5, protéine composant les lames basales formée par l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques (α 3, β 3, et γ 2), par la MMP-2 démasque un site cryptique pro-migratoire (Giannelli et al., 1997).

La protéolyse de certaines protéines de surface cellulaire par les MMPs peut également contribuer à la migration des cellules. C'est le cas de la glycoprotéine CD44, protéine transmembranaire impliquée dans les processus d'adhérence à la matrice (Goodison et al., 1999). Ainsi, le clivage de l'ectodomaine de la glycoprotéine CD44 par la MT1-MMP induit un remaniement au niveau des contacts focaux et stimule la migration de nombreux types cellulaires (cellules de cancer mammaire, d'ostéosarcome et de cancer du pancréas) (Bonnans et al., 2014; Kajita et al., 2001).

Les MMPs peuvent également cliver certaines intégrines qui permettent, *via* leur interaction avec les protéines matricielles, de moduler les voies de signalisation intracellulaires FAK-Src induisant la

motilité cellulaire (Huttenlocher and Horwitz, 2011). Par exemple, la maturation de la sous unité αV des intégrines peut être induite par le clivage par la MT1-MMP (Ratnikov et al., 2002). En effet, certaines sous-unités α des intégrines ont besoin de ce clivage pour induire une signalisation intracellulaire (« Outside in ») (Berthet et al., 2000). L'hétérodimère $\alpha V \beta 3$ étant particulièrement impliqué dans la migration cellulaire, la maturation de la sous unité αV par la MT1-MMP induit une augmentation de la migration cellulaire (Ikari et al., 2000).

Le clivage par la MMP-2 de la chimiokine MCP-3 (*Monocyte chemoattractant protein-3*) liée au domaine hémapexine de la MMP-2, inhibe le flux calcique induit par MCP-3 nécessaire à l'attraction des monocytes (McQuibban et al., 2000). Le clivage par les MMPs des récepteurs DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) liés à la nétrine, protéine chimio-attractante impliquée dans le guidage axonal, inhibe ce processus dans des explants d'axones de moelle épinière (Galiko and Tessier-Lavigne, 2000). De nombreuses matrikines générées suite à la dégradation de la MEC par les MMPs sont impliquées dans la migration des cellules endothéliales et le processus d'angiogenèse associé (Bellon et al., 2004). Le clivage du plasminogène par les MMP-3, -7, -9 et -12 libère l'angiostatine, un fragment peptidique qui inhibe la migration des cellules endothéliales bloquant ainsi le processus d'angiogenèse (Lijnen et al., 1998; Patterson and Sang, 1997; Troyanovsky et al., 2001). A l'inverse, la dégradation de l'élastine par la MMP-2 et la MT1-MMP génère des fragments appelés κ -élastine augmentant la migration des cellules endothéliales et ainsi l'angiogenèse associée (Robinet et al., 2005).

1.4.2. MMPs et prolifération cellulaire

La MEC est un réservoir de facteurs de croissance dont la dégradation ou le clivage de leur récepteur peut moduler la prolifération cellulaire (Vu and Werb, 2000). Le clivage de l'IGFBP-3 (*Insulin like Growth Factor Binding Protein-3*), protéine séquestrant l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*), par les MMP-1, -2 et -3 libère l'IGF-1 stimulant la prolifération cellulaire (Fowlkes et al., 1994). Le clivage du pro-domaine du TGF- β par les MMP-2 et -9 libère sa forme active stimulant la prolifération cellulaire (Yu and Stamenkovic, 2000). De la même manière, le clivage de la décorine par les MMP-2, -3 et -7 permet la libération du facteur de croissance TGF- $\beta 1$ (Imai et al., 1997).

Les MMPs peuvent également avoir une action paracrine en activant directement des récepteurs à la surface cellulaire impliqués dans la prolifération cellulaire. Dans les cancers gastriques, une augmentation de l'activité de la MMP-2 conduit à une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses *via* la phosphorylation du récepteur de l'EGF (Gong et al., 2008). Dans les cellules vasculaires des muscles lisses,

la thrombine augmente la prolifération cellulaire *via* la libération d'un ligand, le HB-EGF (*Heparin Binding-EGF*) permettant d'activer le récepteur de l'EGF (Smiljanic et al., 2014).

I.4.3. MMPs et mort cellulaire

Les MMPs peuvent réprimer ou induire l'apoptose cellulaire (Mannello et al., 2005; Vu and Werb, 2000). Ainsi, la MMP-3 clive l' α -synucléine, une petite protéine de 14 kDa très abondante dans le système nerveux central (SNC), et génère une accumulation de peptides neurotoxiques capables d'induire l'apoptose cellulaire (Choi et al., 2011; El-Agnaf and Irvine, 2002). La translocation de la MMP-3 au niveau du noyau des cellules CHO induit un clivage des composants de la matrice nucléaire, l'apparition d'anomalies génétiques et épigénétiques et par conséquent l'apoptose de ces cellules (Si-Tayeb et al., 2006). A l'inverse, dans des lignées cellulaires de sarcomes et de carcinomes, les MMP-3 et -7 induisent la survie cellulaire et la résistance à la doxorubicine *via* le clivage du ligand Fas diminuant l'apoptose extracellulaire (Matsuno et al., 2001; Mitsiades et al., 2001).

Les MMPs peuvent également induire l'apoptose cellulaire en induisant une perte de contact des cellules avec la MEC *via* le processus d'anoïkis (Vu and Werb, 2000). La dégradation du collagène I par la MT1-MMP induit une perte d'adhérence cellulaire conduisant à la mort des cellules ostéoblastiques (Guo et al., 2004). La MMP-2 clive la protéine membranaire N-cadhérine, protéine impliquée dans les interactions intercellulaires, et induit la mort des cellules des ilots hépatiques (Hartland et al., 2009).

I.4.4. MMPs et différenciation cellulaire

Les MMPs jouent également un rôle important dans les processus de différenciation de nombreuses cellules. Ainsi, la MT1-MMP contrôle la différenciation ostéogénique des cellules souches mésenchymateuses notamment lors de l'invasion de ces cellules à travers une structure tridimensionnelle de collagène (Lu et al., 2010). Les MMP-1 et -13 régulent l'expression des marqueurs de différenciation des cellules ostéoblastiques MG63 par un mécanisme qui reste non identifié (Hayami et al., 2011). L'extinction des gènes codant pour les MMP-3 et -9 empêche la différenciation des cellules souches neurales en cellules migratoires *via* la sécrétion de la chimiokine SDF-1 (*Stroma cell-derived growth factor-1*) et du facteur de croissance VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Barkho et al., 2008).

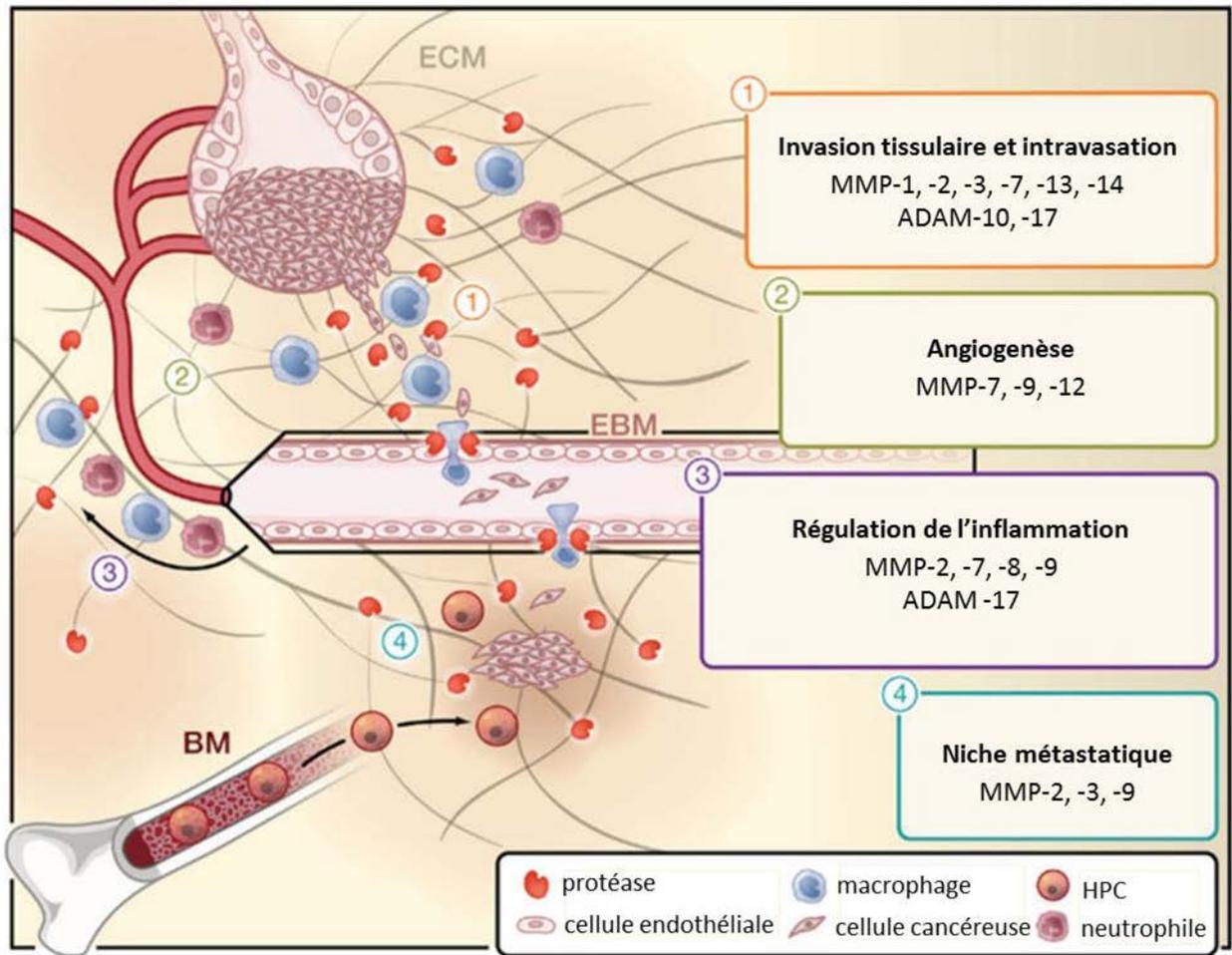


Figure 6: Rôles des MMPs dans les cancers (d'après Kessenbrock et al., 2010)

ECM : matrice extracellulaire, EBM : membrane basale endothéliale, BM : moelle osseuse

I.5. MMPs dans le contexte pathologique

Dans de nombreuses pathologies, l'expression, l'activation et l'activité des MMPs est dérégulée (Amălinei et al., 2010). Dans cette partie, nous focaliserons volontairement sur deux contextes pathologiques qui seront étudiés au cours de cette thèse : les cancers et les maladies neurodégénératives.

I.5.1. MMPs et cancers

Le rôle des MMPs dans les cancers est étudié depuis plus de 40 ans. En effet, dans cette pathologie on observe le plus souvent une augmentation de l'expression des MMPs et de leur activité protéolytique (Liotta et al., 1980). Les activités biologiques des MMPs référencées précédemment (partie I.4) sont donc pour la plupart dérégulées et vont, d'une façon générale, favoriser la croissance tumorale et la formation de métastases (Chang and Werb, 2001). Le rôle des MMPs dans les pathologies cancéreuses est complexe et varié car il module de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration et la survie des cellules tumorales ainsi que des cellules du stroma péri-tumoral. De plus, selon les types de cancers, les effets induits par une même MMP peuvent être pro- ou anti-tumoraux (Kessenbrock et al., 2010; Mannello et al., 2005) (Figure 6). Certains membres de la famille des MMPs (MMP-3, -8, -9, -12, -19 et -26) peuvent même se comporter comme des suppresseurs de tumeur (Decock et al., 2011).

La prolifération des cellules tumorales est un processus majeur dans le développement tumoral. Les cellules tumorales acquièrent le plus souvent la capacité de proliférer en absence de signaux prolifératifs mais également une insensibilité aux signaux antiprolifératifs. Les MMPs vont participer activement à ce phénomène en modulant la biodisponibilité et la fonctionnalité de ces signaux. Par exemple, la MMP-9 est capable d'interagir avec la glycoprotéine CD44 à la surface des cellules cancéreuses et d'induire le clivage du TGF- β permettant la libération de sa forme active impliquée dans la prolifération des cellules cancéreuses (Massagué, 2008; Yu and Stamenkovic, 2000). Les MMP-2 et -14 sont également des activateurs du TGF β par clivage protéolytique (Mu et al., 2002).

L'échappement des cellules tumorales à la mort cellulaire programmée est une autre caractéristique des cellules cancéreuses et favorise l'augmentation du volume tumoral et la résistance aux traitements anti-cancéreux. L'activité enzymatique des MMPs interfère avec l'induction de l'apoptose dans les cellules malignes en participant notamment au clivage de ligands ou de récepteurs qui transduisent des signaux pro-apoptotiques. Ainsi, dans les cancers mammaires, la MT1-MMP inhibe l'apoptose induite par le collagène de type I en le dégradant (Maquoi et al., 2012). Dans différentes lignées de cellules cancéreuses, la MMP-7 clive le ligand du récepteur d'apoptose Fas et empêche ainsi sa liaison

à la surface des cellules cancéreuses traitées à la doxorubicine pouvant diminuer l'impact de la chimiothérapie (Mitsiades et al., 2001).

La progression tumorale nécessite la mise en place d'un réseau vasculaire dédié qui va permettre l'oxygénation et la nutrition des cellules tumorales ainsi que leur dissémination métastatique (Nishida et al., 2006). Ce processus d'angiogenèse nécessite une protéolyse de la MEC ainsi qu'une dérégulation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales via la libération de molécules pro- ou anti-angiogéniques (Stetler-Stevenson, 1999). Les MMPs jouent un rôle essentiel dans ces mécanismes et des souris déficientes pour la MMP-2 et la MMP-9 présentent une forte diminution de l'angiogenèse et de la vasculogenèse tumorale (Itoh et al., 1998a; Masson et al., 2005). Une des explications à ce phénomène est que dans de nombreux cancers, la MMP-9 est une protéine clef du "switch" angiogénique car elle permet de libérer le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) soit par clivage de la liaison entre le VEGF et les composants de la MEC, soit par clivage du VEGF, libérant ainsi son domaine de liaison au récepteur VEGFR (Bellon et al., 2004; Deryugina and Quigley, 2010). Certaines MMPs vont à l'inverse avoir tendance à inhiber l'angiogenèse. Par exemple, l'endostatine, molécule à propriété anti-angiogénique, est générée par le clivage du collagène de type XVIII par les MMP-3, -7, -9, -13, et -20. De la même façon, la dégradation de la chaîne $\alpha 3$ du collagène de type IV par la MMP-9 libère la tumstatine qui va se lier à l'intégrine $\alpha\beta 3$ et inhiber l'angiogenèse (Hamano et al., 2003; Maeshima et al., 2001).

L'angiogenèse et la vasculogenèse tumorale vont favoriser la dissémination métastatique c'est-à-dire le passage de cellules issues de la tumeur primaire dans la circulation sanguine pour aller former une tumeur secondaire dans un site anatomiquement distant. Dans un premier temps, les cellules se séparent de la masse tumorale primaire puis migrent à travers la lame basale et la MEC de l'épithélium tumoral. Les cellules migrent ensuite à travers la membrane basale de l'endothélium présent autour des vaisseaux sanguins afin de permettre l'étape d'intravasation dans le vaisseau sanguin. Lors du passage dans la circulation sanguine, les cellules tumorales subissent une transition épithélio-mésenchymateuse permettant aux cellules épithéliales d'acquérir un phénotype mésenchymateux, avec une modulation de l'adhérence cellulaire. Les MMPs vont jouer un rôle à tous les niveaux de ce processus et la surexpression des MMPs est généralement corrélée à la dissémination métastatique (Radisky and Radisky, 2010). Une surexpression de la MMP-2 va par exemple permettre le clivage de la E-cadhérine entraînant une perte d'interaction entre les cellules épithéliales favorisant ainsi la dissémination métastatique (Grieve and Rabouille, 2014). Des études récentes utilisant la microscopie à haute résolution multimodale ont montré l'importance du remodelage de la MEC dans la dissémination métastatique et notamment la protéolyse péri-cellulaire réalisée par la MMP-14. En effet, celle-ci facilite le passage à travers la matrice d'une seule

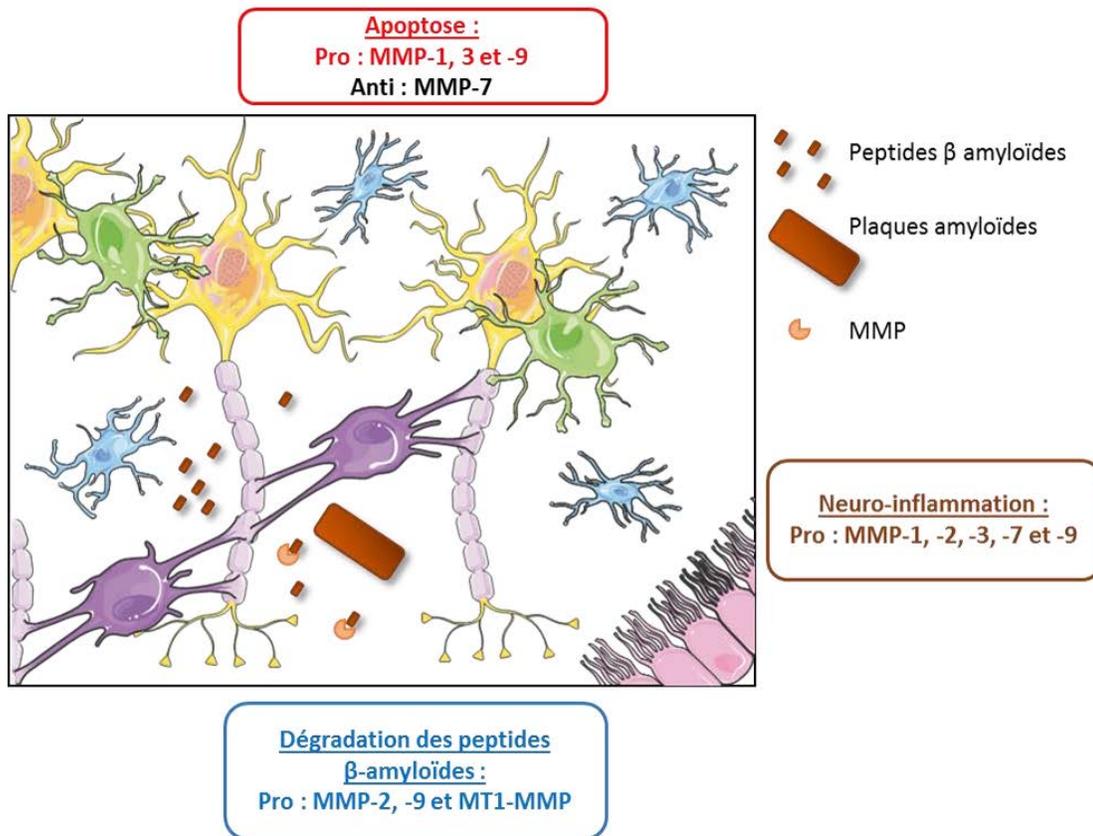


Figure 7: Rôles des MMPs dans les maladies neurodégénératives (d'après Rivera et al., 2004)

cellule puis la migration collective des cellules tumorales pour permettre l'invasion du stroma (Wolf et al., 2007). Un certain nombre d'enzymes protéolytiques dégradant la MEC, comme les MMP-1, -2 et -13, sont également impliquées dans ce processus. Au niveau des poumons, il a été montré que les MMP-3 et -10 augmentent la perméabilité des vaisseaux sanguins et favorisent l'intra et l'extravasation des cellules tumorales (Huang et al., 2009). Enfin, la MMP-9 s'avère critique pour la formation de la niche métastatique (Kaplan et al., 2005). Ce rôle est très probablement lié à sa capacité à libérer le VEGF supportant ainsi l'angiogenèse (Bergers et al., 2000). La MMP-9 permet également la libération du facteur soluble Kit-ligand qui va permettre le recrutement de cellules souches et progénitrices issues de la moelle osseuse (Heissig et al., 2002). Ces cellules vont jouer un rôle important dans ce contexte de niche métastatique (Kaplan et al., 2005)

Les cellules du stroma tumoral vont également participer activement au développement de la tumeur. Des études récentes établissent un lien fort entre l'activité des MMPs et certaines cellules du stroma. Par exemple, la MMP-11, exprimée par les adipocytes du stroma tumoral induit une dédifférenciation adipocytaire permettant l'accumulation de cellules fibroblastiques non tumorales. Ces cellules vont favoriser la survie cellulaire et la progression tumorale (Motrescu et al., 2008).

1.5.2. MMPs et maladies neurodégénératives

Au niveau du SNC, les MMPs sont impliquées dans de nombreux processus tels que la réparation tissulaire et la dégradation de la barrière hématoencéphalique (BHE). Selon les pathologies du SNC, les MMPs vont avoir un rôle pro-ou anti-apoptotique, induire la neuro-inflammation ou permettre la dégradation des peptides β -amyloïdes (Figure 7) (Kim and Joh, 2012; Rivera et al., 2004).

La sclérose en plaques est une maladie auto-immune du SNC caractérisée par une démyélinisation des gaines de myéline entourant les axones des cellules nerveuses, induisant la perte des fonctions motrices et cognitives. Cette démyélinisation est une conséquence de la dégradation de la BHE et de la migration trans-endothéliale des leucocytes activés (Ortiz et al., 2014). Les MMP-2, -7 et -9 participent à la dégradation de la BHE et permettent ainsi le recrutement de lymphocytes T CD4+ spécifiques qui sécrètent des anticorps dirigés contre les composants des gaines de myéline. De plus, ces MMPs favorisent la migration de monocytes et macrophages à travers la micro-vascularisation cérébrale, ce qui est considéré comme une étape critique de l'inflammation dans la sclérose en plaque. (Martino et al., 2002). Ces MMPs sont présentes en plus grande quantité dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de sclérose en plaques (Avolio et al., 2003; Cossins et al., 1997; Fainardi et al., 2006).

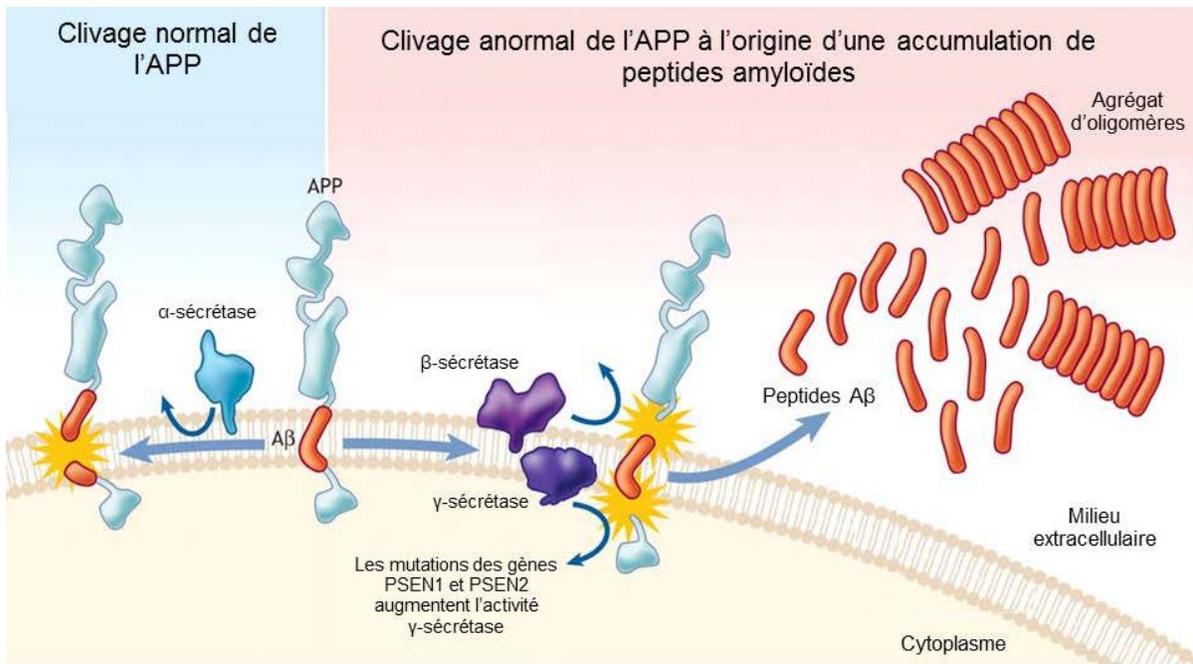


Figure 8: Schéma représentant le clivage de l'APP par les sécrétases α , β , et γ (d'après Patterson et al., 2008)

La maladie de Parkinson est liée à la perte de fonction des neurones dopaminergiques (Samii et al., 2004). Dans les neurones des patients atteints de cette maladie, la MMP-3 clive l' α -synucléine, une protéine présente au niveau des terminaisons présynaptiques, et libère des fragments formant des agrégats à l'origine des corps de Lewy (Choi et al., 2011; Sung et al., 2005). Dans un modèle animal de la maladie de Parkinson, il a été montré que la MMP-3 est également impliquée dans la dégradation de la BHE permettant l'infiltration de cellules immunitaires à l'origine de la neuro-inflammation (Chung et al., 2013).

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative induisant la mort des neurones de l'hippocampe, lieu de la mémoire et du repérage spatio-temporel, puis s'étend au reste du SNC. Cette maladie est caractérisée par la formation de plaques amyloïdes induisant un stress oxydatif et provoquant une réaction inflammatoire entraînant la mort neuronale (Allan Butterfield, 2002; Armstrong, 2009; Axelsen et al., 2011). Ces plaques résultent du dépôt de peptides β -amyloïdes ($A\beta$) issus du clivage de la protéine précurseur transmembranaire APP (*Amyloid Precursor Protein*). Trois protéases sont impliquées dans le clivage de l'APP, l' α -, la β -, et la γ -sécrétases. En conditions physiologiques, la voie majoritaire est la voie non amyloïdogénique. L' α -sécrétase clive l'APP et libère un fragment soluble de l'APP induisant une neuroprotection vis-à-vis des stimuli pro-apoptotiques et du stress excitotoxique. En conditions pathologiques, la voie majoritaire est la voie amyloïdogénique, correspondant au clivage de l'APP par les β - et γ -sécrétases et libérant des peptides amyloïdes formant des agrégats à l'origine des plaques séniles (Figure 8) (Storey and Cappai, 1999). Les MMPs, et plus particulièrement les MMP-2 et -9 ainsi que la MT1-MMP sont capables de dégrader les peptides $A\beta$ afin de diminuer la formation de plaques amyloïdes (Backstrom et al., 1996; Liao and Van Nostrand, 2010; Py et al., 2014; Saido and Leissring, 2012). Une autre protéine, la protéine Tau et est impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Cette protéine a pour rôle physiologique la stabilisation des microtubules axonaux grâce à l'interaction avec la tubuline. Dans cette pathologie, on observe une hyperphosphorylation de la protéine intracellulaire Tau formant des agrégats dans le milieu intracellulaire (Huang and Jiang, 2009). De plus, la protéine Tau peut également être sécrétée dans le milieu extracellulaire *via* des vésicules spécifiques appelées ectosomes (Dujardin et al., 2014). La dégradation de la protéine Tau dans le milieu extracellulaire par la MMP-9 génère des fragments endocytés par les neurones et qui présentent une capacité d'agrégation supérieure à la protéine Tau non clivée augmentant ainsi la neurodégénérescence (Nübling et al., 2012).

I.6. MMPs et stratégies thérapeutiques

L'implication des MMPs dans de nombreuses pathologies étant bien établie, des stratégies thérapeutiques basées sur leur inhibition ont été envisagées depuis une vingtaine d'années (Baranger et al., 2014; Steinman et al., 1998; Vandenbroucke and Libert, 2014).

Dans la fin des années 1990, une première génération d'inhibiteurs de MMPs a été synthétisée avec un groupe hydroxamate permettant de chélater le zinc catalytique (Browner et al., 1995). De nombreux inhibiteurs ont ainsi été développés, tels que le Marimastat et le Batimastat. Cependant, les essais cliniques réalisés ont montré de nombreux effets secondaires tels que des inflammations tissulaires (en cas d'injection), des raideurs musculo-squelettiques et des douleurs au niveau des tendons et des articulations dus à la non spécificité de ces inhibiteurs vis-à-vis des MMPs (Rothenberg et al., 1999).

La seconde génération d'inhibiteurs de MMPs, développée quelques années plus tard, possède un groupement sulfonamide améliorant la solubilité et ainsi leur délivrance (Fisher and Mobashery, 2006; Hu et al., 2007). Cependant, le manque de spécificité de ces inhibiteurs, tels que le Cipemastat vis-à-vis des MMPs a conduit à un arrêt des essais cliniques en raison d'effets secondaires trop importants (Fingleton, 2008).

Les laboratoires pharmaceutiques qui tentent de développer de nouveaux inhibiteurs de MMPs se focalisent désormais sur l'amélioration de leur spécificité vis-à-vis des MMPs. La caractérisation structurale des sites actifs a aidé à la mise au point de nouveaux inhibiteurs (Rao, 2005). La nature du groupement de liaison au zinc permet notamment de moduler la sélectivité des inhibiteurs vis-à-vis des MMPs (Agrawal et al., 2008). Le Prinomastat, un inhibiteur spécifique des MMP-2, -3, -9, -13 et -14 a atteint la phase III d'essai clinique dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules. Cependant, cet inhibiteur n'améliorant pas la chimiothérapie, les essais cliniques ont été abandonnés (Bissett et al., 2005). Un inhibiteur spécifique des MMP-2 et -9, le SB-3CT, a également été développé (Forbes et al., 2009). Les essais réalisés sur des lésions cérébrales traumatiques chez le rat ont montré un effet protecteur du SB-3CT au niveau du comportement ainsi qu'au niveau des neurones hippocampiques, suggérant une potentielle utilisation thérapeutique de cet inhibiteur sur les lésions cérébrales humaines (Gu et al., 2005; Jia et al., 2014).

L'utilisation d'inhibiteurs de MMPs dans le traitement des maladies neurodégénératives nécessite le passage de la BHE afin d'avoir une bonne délivrance de médicaments et de limiter les effets secondaires (Baranger et al., 2014). Afin de permettre le passage de la BHE, il a été envisagé de fixer des molécules thérapeutiques sur un peptide se fixant sur les récepteurs aux LDL (Malcor et al., 2012; Vlieghe and Khrestchatisky, 2010, 2013).

Une autre stratégie thérapeutique consiste à viser les inhibiteurs tissulaires des MMPs et plus particulièrement le TIMP-1. Par exemple, l'ajout à l'extrémité C-terminale d'un glycosylphosphatidylinositol (GPI), permet l'ancrage du TIMP-1 à la membrane cellulaire. L'incubation de cellules de fibrosarcome avec ce TIMP-1-GPI diminue la prolifération et l'angiogenèse tumorale et potentialise le traitement à la doxorubicine (Bao et al., 2014). Dans les cellules de mélanome, le TIMP-1-GPI augmente l'apoptose induite par la protéine Fas suite à un traitement hyperthermique (Djafarzadeh et al., 2009). Ce variant du TIMP-1 accélère également la cicatrisation lorsqu'il est incubé avec des kératinocytes épidermiques (Djafarzadeh et al., 2014).

Une autre stratégie a consisté au développement de variants du TIMP-1 présentant une capacité inhibitrice de MMPs supérieure à celle du TIMP-1 naturel. Différents variants du TIMP-1 ont été générés par substitution d'acides aminés entraînant une augmentation de l'inhibition des MMPs (Nagase and Brew, 2002; Wei et al., 2003). Ces inhibiteurs sont de bons outils pour l'étude de l'activité biologique de MMPs spécifiques. Cependant, les stratégies thérapeutiques basées sur le TIMP-1 ont été limitées du fait du large spectre d'action du TIMP-1 et notamment depuis l'identification de l'interaction du TIMP-1 avec différents complexes récepteurs membranaires, et de ses activités biologiques délétères associées (Baker et al., 2002; Ries, 2014).

	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Localisation chromosomique	Xp 11.3 – 11.23	17q23 – 17q25	22q12-1 – 22q13-2	3p25
Expression	inductible	constitutive	inductible	inductible
Acides aminés forme mature (+ peptide signal)	184 (23)	194 (26)	188 (23)	196 (29)
Masse moléculaire	28,5 kDa	21 kDa	22 à 27 kDa	22 kDa
Sites de N-glycosylation	2	0	1	0
Localisation	soluble	soluble / surface cellulaire	MEC	soluble / surface cellulaire
Inhibition faible des MMPs	MT-1, -2, -3, -5 MMP et MMP-19	MT-1 MMP	MT-3 MMP	aucune
Inhibition des ADAMs	ADAM 10	ADAM-12	ADAM-10, -12, 17, -19 et ADAMTS-4 et -5	aucun
Liaison aux pro-MMPs	pro-MMP-9	pro-MMP-2	pro-MMP-2 et -9	pro-MMP-2
Protéines de liaison à la surface cellulaire	CD63 Pro-MMP-9/CD44	intégrine $\alpha 3\beta 1$ LRP-1	VEGFR2, Angiotensine-IIR, EFEMP1, LRP-1	Non déterminé

Tableau IV: Caractéristiques des quatre membres de la famille des TIMPs (d'après Lambert et al., 2004, Brew et al., 2010 et Murphy et. al 2011)

II/ La famille des inhibiteurs tissulaires de MMPs (TIMPs)

II.1. Structure

Les 4 membres de la famille des TIMPs ont une chaîne peptidique composée de 184 à 194 acides aminés avec une masse moléculaire variant de 21 à 34 kDa. Ces protéines sont organisées en 2 domaines, un domaine N-terminal d'environ 125 acides aminés et un domaine C-terminal d'environ 65 acides aminés. Chacun de ces domaines possède 6 cystéines conservées formant 3 ponts disulfures permettant d'obtenir la conformation caractéristique de ces protéines, formée de 6 boucles (Williamson et al., 1990). Parmi les 4 TIMPs, seuls les TIMP-1 et -3 possèdent des sites de N-glycosylation (Apte et al., 1995; Kim et al., 2012) (Tableau IV).

Les différents TIMPs présentent un pourcentage d'homologie de séquence allant de 35 à 50 % (Figure 9 A). Des alignements de séquences entre les différents TIMPs montrent que les régions hautement conservées sont majoritairement retrouvées dans le domaine N-terminal, notamment pour les 22 premiers acides aminés. La séquence consensus VIRAK, située en position 18 à 22, est par exemple conservée chez les quatre membres et son rôle n'est toujours pas élucidé (Douglas et al., 1997). D'autres résidus tels que les tryptophanes W133, W174 et W203 sont également hautement conservés entre les quatre TIMPs. Il a été montré que certains de ces résidus sont impliqués dans la sécrétion du TIMP-2 (Ukaji et al., 2014). La structure tridimensionnelle des 4 TIMPs est hautement conservée et superposable. Une homologie de séquence protéique plus importante pour les TIMP-2 et -4 est observée sur l'alignement de séquences (Figure 9 A) et se situe au niveau des boucles des domaines N- et C-terminaux (Figure 9 B).

II.2. Expression et régulation

Les gènes des TIMP-1, -3, et -4 sont situés dans les introns des gènes de la synapsine -1, -3 et -2 respectivement, avec une orientation inverse. Les synapsines sont une famille multigénique de phosphoprotéines spécifiques des neurones, permettant la régulation de la libération des neurotransmetteurs. Les analyses phylogénétiques ont montré que cette localisation des gènes des TIMPs remonte aux Drosophiles (*Drosophila melanogaster*), suggérant un fort lien entre ces deux familles géniques. Cependant, l'importance de cette localisation n'a pas été mise en évidence (Pohar et al., 1999). Le gène codant le TIMP-2 se trouve au sein du premier intron du gène *Differential display clone 8* (DDC8), impliquant un épissage alternatif de ces deux gènes (Jaworski et al., 2007). L'expression des gènes des TIMP-1, -3 et -4 est inductible par diverses cytokines et facteurs de croissance alors que le gène du TIMP-2

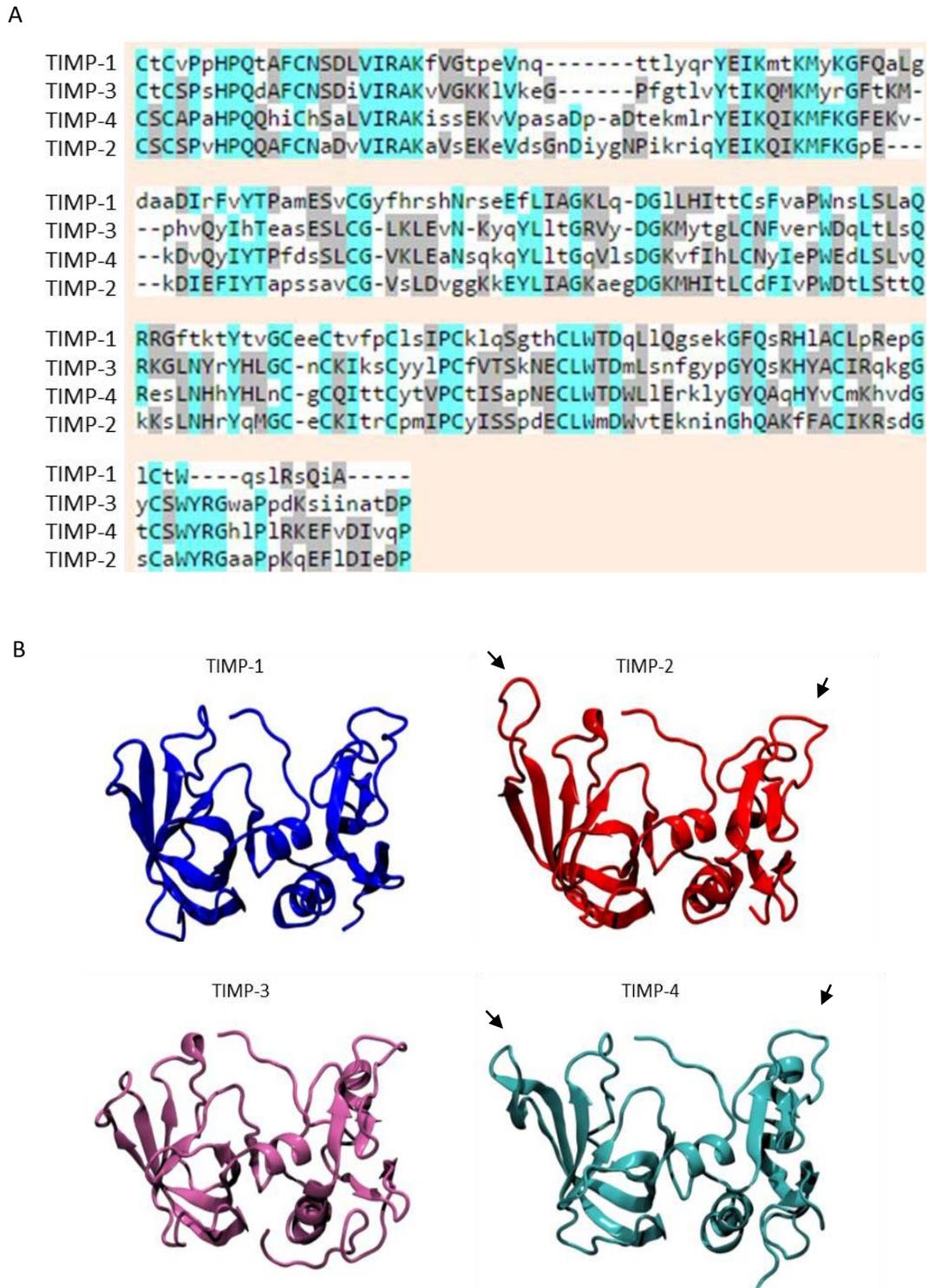


Figure 9: Figure représentant les similitudes entre les quatre TIMPs humains.

A. Alignement des séquences des 4 TIMPs humains (n° d'accèsion Uniprot : TIMP-1 : P01033, TIMP-2 : P16035, TIMP-3 : P35625 TIMP-4 : Q99727). Résidus conservés entre les 4 membres : Bleu ; Mutations autorisées : gris

B. Représentation tridimensionnelle des 4 TIMPs. Les structures des TIMPs 3 et 4 sont des structures obtenues par modélisation par homologie. Les boucles des domaines N- et C-terminaux des TIMP-2 et -4 sont indiquées par des flèches.

est exprimé de façon constitutive. Les TIMP-1 et -2 sont exprimés dans la majorité des tissus. Les TIMP-3 et -4 ont des expressions plus restrictives. En effet, le TIMP-3 est majoritairement présent au niveau des membranes basales des yeux et des reins. Le TIMP-4 n'est présent qu'au niveau du cœur, des reins, des ovaires, du pancréas, du colon, des testicules, du cerveau et du tissu adipeux (Murphy, 2011).

II.3. Rôles biologiques

D'un point de vue fonctionnel, les TIMPs sont principalement décrits en tant qu'inhibiteurs de MMPs et d'ADAMs. Les TIMP-2, -3 et -4 n'ont pas de spécificité d'inhibition vis-à-vis des MMPs (Tableau IV) (Brew and Nagase, 2010; Nagase et al., 2006; Visse and Nagase, 2003).

Il est aujourd'hui bien établi que les TIMPs possèdent également des activités biologiques indépendantes de leur activité inhibitrice de MMPs en conditions physiopathologiques régulant différents processus, tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que l'apoptose (Chirco et al., 2006; Lambert et al., 2004). Des études avec des souris KO pour les différents TIMPs ont mis en évidence ces rôles physiopathologiques. L'inactivation du gène du TIMP-1 induit des altérations de la stéroïdogénèse et du cycle reproducteur murin suggérant que cette protéine est impliquée dans la régulation de la reproduction chez la souris. Les souris KO TIMP-1 présentent également des dysfonctionnements cardiaques, principalement au niveau du ventricule gauche, ainsi qu'un défaut d'apprentissage et de mémoire (Brew and Nagase, 2010). Les souris KO TIMP-2 présentent des altérations neuronales et musculaires à l'origine de dysfonctionnements moteurs. Une inactivation du gène du TIMP-3 chez la souris induit une augmentation du volume pulmonaire ainsi qu'une augmentation de l'apoptose durant le remodelage mammaire (Fata et al., 2001). Ces effets sont principalement dus à la diminution de l'inhibition des MMPs, suggérant que le TIMP-3 est un régulateur important des MMPs impliquées dans les phénomènes de dégradation matricielle. De plus, le TIMP-3 est apparu comme un régulateur clef du TNF- α et du TGF- β *via* l'inhibition de l'ADAM-17 lors des réponses inflammatoires, et présente un rôle protecteur vis-à-vis du diabète de type 2 en régulant le clivage du TNF α (Mohammed et al., 2004). Les souris KO TIMP-4 n'ont aucun problème de développement, mais sont plus sensibles à l'infarctus du myocarde, suggérant que le TIMP-4 a un rôle majoritairement cardiaque. Cependant, ces effets sont reversés par un inhibiteur de MMPs, indiquant qu'ils sont liés à l'activité inhibitrice de MMPs du TIMP-4 (Koskivirta et al., 2010).

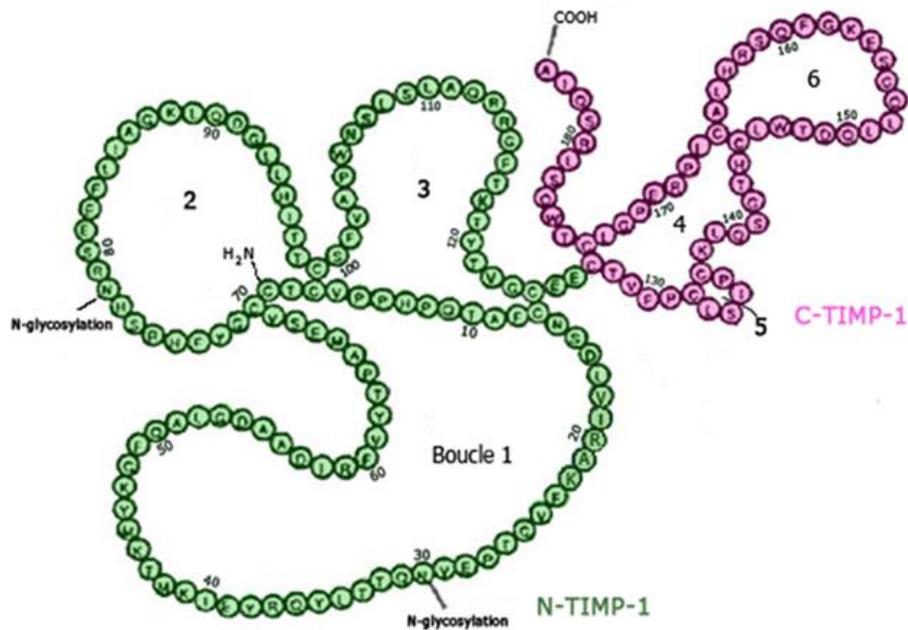


Figure 10: Représentation schématique de la structure du TIMP-1 avec les boucles formées

Schéma permettant de mettre en évidence les 6 boucles le composant et permettant son organisation en 2 domaines: le N-TIMP-1 (en vert) et le C-TIMP-1 (en rose).

Référence PDB	Type expérimental	Résolution	Caractéristiques
2J0T	Cristallographie	2,54 Å	Domaine catalytique de la MMP-1 en complexe avec le domaine inhibiteur du TIMP-1
1O09	RMN		Domaine catalytique de la MMP-3 en complexe avec le domaine N-terminal du TIMP-1
1D2B	RMN		Domaine inhibiteur de MMPs, N-TIMP-1
1UEA	Cristallographie	2,80 Å	MMP-3 en complexe avec le TIMP-1
3V96	Cristallographie	1,90 Å	Domaine catalytique de la MMP-10 en complexe avec le TIMP-1
3MA2	Cristallographie	2,05 Å	MT1-MMP en complexe avec le TIMP-1

Tableau V: Structures du TIMP-1 obtenues par RMN ou cristallographie

II.4. Le TIMP-1

II.4.1. Structure

Le TIMP-1 est le premier membre de la famille des TIMPs à avoir été caractérisé. C'est une glycoprotéine de 207 acides aminés, possédant un peptide signal de 23 acides aminés, permettant sa sécrétion dans la MEC. Sa masse moléculaire est de 28,5 kDa. De plus, le TIMP-1 possède deux sites de N-glycosylation sur les asparagines localisées en position 30 et 78 de la protéine mature. Cependant, l'absence de N-glycosylation ne semble pas perturber l'activité MMP-inhibitrice du TIMP-1 (Caterina et al., 1998). Récemment, il a été montré qu'une glycosylation aberrante du TIMP-1 est associée à une perte d'inhibition vis-à-vis des MMPs et contribue à l'augmentation du potentiel invasif des cellules de cancer du colon (Kim et al., 2012b).

Le TIMP-1 possède 12 cystéines liées entre elles par 6 ponts disulfures et formant 6 boucles impliquées dans la structure tridimensionnelle de la protéine. Les boucles 1 à 3 forment le domaine N-terminal (N-TIMP-1) de 126 acides aminés, et les boucles 4 à 6 le domaine C-terminal (C-TIMP-1) de 58 acides aminés (Figure 10).

Le domaine N-terminal est impliqué dans l'inhibition des MMPs (Murphy et al., 1991b) et le domaine C-terminal est impliqué dans la liaison avec certaines formes zymogènes des MMPs (Nagase et al., 2006). Des expériences de RMN et de cristallographie ont permis d'obtenir des données structurales pour les deux domaines du TIMP-1 (Tableau V). Le domaine N-terminal du TIMP-1 présente un repliement similaire à celui des membres de la famille des protéines OB (protéines de liaison aux oligonucléotides et oligosaccharides) (Murzin, 1993). Il s'agit d'un tonneau β déformé, composé de 5 brins β (référencés de A à F) présentant une topologie de type Clé Grecque. Le TIMP-1 contient également 3 hélices α , deux situées dans le domaine N-terminal et une dans le domaine C-terminal, formant ainsi une interface entre les deux domaines du TIMP-1. Le domaine C-terminal est composé d'une paire de brins β parallèles, connectés par une boucle et suivis par une hélice α , et d'une paire de brins β antiparallèles reliés par une épingle β (Figure 11).

II.4.2. Expression et régulation du TIMP-1

Le TIMP-1 est exprimé dans de nombreux types cellulaires tels que les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, les ostéoblastes, les chondrocytes, les cellules de muscle lisse ainsi que dans plusieurs types de cellules tumorales. Il est également exprimé dans les lignées de cellules myéloïdes, érythroïdes et mégacaryoblastiques mais pas dans les lignées lymphoïdes. C'est une protéine sécrétée et

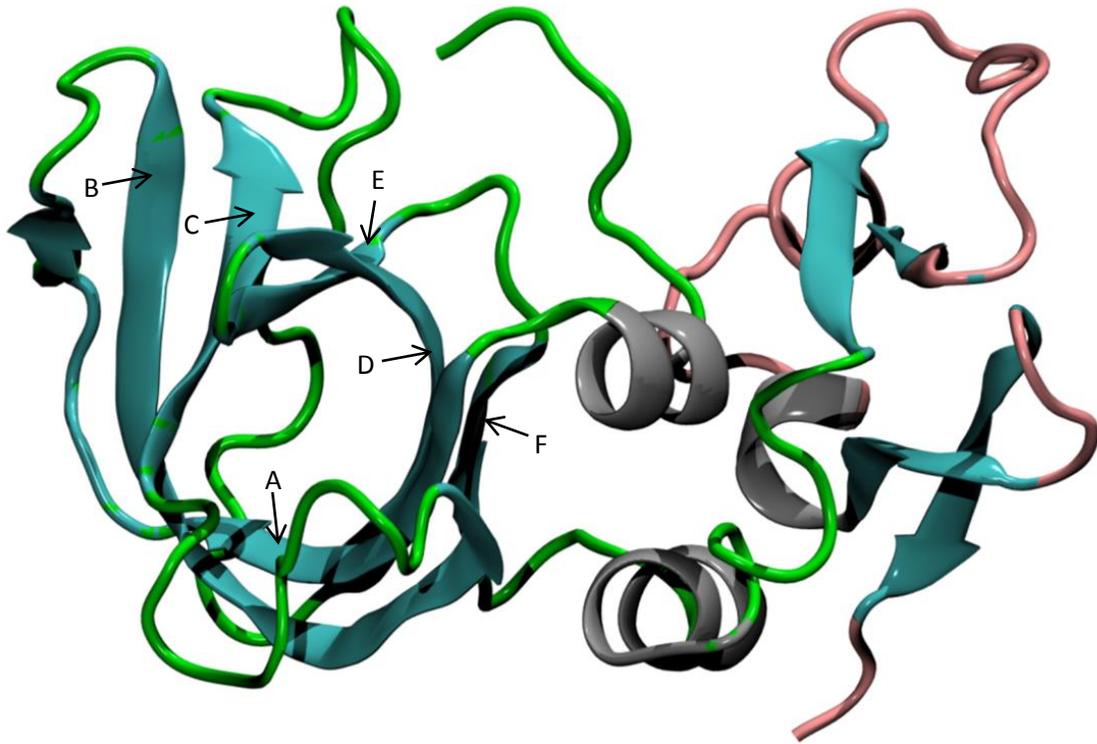


Figure 11: Représentation schématique de la structure 3D du TIMP-1 mettant en évidence les différentes structures de la protéine.

Le domaine N- terminal : vert, domaine C-terminal : rose, Brins β : bleus, dont les brins A à F permettant la formation du tonneau β déformé à la topologie de clef grecque, Hélices α : grises.

sa concentration dans le sérum humain en condition physiologique est de l'ordre de 2,5 à 4 nM (Manicourt et al., 1994).

Le gène du TIMP-1 est composé de 6 exons, le premier étant transcrit mais pas traduit. Il présente des caractéristiques des gènes de ménage telles que l'absence de TATA box, pouvant expliquer le niveau d'expression basal du TIMP-1. Cependant, l'expression de ce gène est également inductible grâce à la présence de multiples sites d'initiation de la transcription (Edwards et al., 1992). La régulation transcriptionnelle du gène du TIMP-1 se fait grâce à la fixation d'éléments cis-régulateurs au niveau de la région promotrice du gène et de l'intron 1. Le promoteur comporte dix séquences consensus SP1, six séquences consensus AP1, six séquences consensus PEA3, douze séquences consensus AP2 et cinq CCAAT box (Clark et al., 1997). Un nouvel élément cis-régulateur, UTE-1 (Upstream TIMP-1 element), a été identifié en aval des sites AP1 et PEA3. Cet élément lie une protéine nucléaire de 30 kDa pouvant être un variant d'épissage ou le produit de dégradation de la protéine RUNX2 (Bertrand-Philippe et al., 2004; Trim et al., 2000).

L'activation de la transcription du gène du TIMP-1 peut se faire par différents stimuli extérieurs tels que des facteurs de croissance (PDGF, EGF, TGF β 1), des cytokines (IL-1, IL-1 β et l'IL-6) (Roeb et al., 1994; Sato et al., 1990), le sérum et les esters de phorbol (Phorbol 12 myristate 13 acetate, PMA) (Kordula et al., 1992). L'érythropoïétine (Epo) a été décrite comme induisant l'expression et la sécrétion du TIMP-1 dans la lignée érythroleucémique humaine UT-7 dépendante de l'Epo et dans les progéniteurs érythroïdes CD34+ isolés à partir de sang de cordon ombilical (Kadri et al., 2000). Plus récemment, la leptine, une hormone sécrétée par le tissu adipeux, a été montrée comme étant impliquée dans l'activation de la transcription *via* un mécanisme dépendant de SP-1/pSTAT3 (Lin et al., 2006).

III. Activités biologiques du TIMP-1

Le TIMP-1 possède des activités biologiques variées pouvant être liées à l'inhibition des MMPs ou indépendantes de l'inhibition des MMPs et passant par des complexes récepteurs membranaires (Lambert et al., 2004).

III.1. Activité inhibitrice de MMPs

Le TIMP-1 est capable d'inhiber la grande majorité des MMPs. Cependant, il est le seul TIMP à posséder une spécificité d'inhibition. En effet, s'il inhibe la quasi-totalité des MMPs solubles, à l'exception de la MMP-19, il inhibe en revanche très faiblement les MMPs transmembranaires et notamment les MT-1, -3 et -5 MMPs.

III.1.1. Interaction TIMP-1 / MMPs

L'inhibition des MMPs par le TIMP-1 se fait par interaction non covalente directe entre les 2 protéines selon un rapport stœchiométrique 1:1 (Bode et al., 1999b). C'est principalement le domaine N-terminal qui est impliqué dans l'inhibition des MMPs. En effet, en l'absence du domaine C-terminal, le domaine N-terminal conserve sa structure tridimensionnelle et sa capacité à inhiber les MMPs, excepté pour l'ADAM-10 (Rapti et al., 2008). L'affinité du N-TIMP-1 vis-à-vis des MMP-1, -2 et -3 est cependant 6 à 8 fois plus faible que l'affinité du TIMP-1 sauvage suggérant que le domaine C-terminal pourrait également être impliqué dans l'interaction avec les MMPs (Huang et al., 1996; Williamson et al., 1994). En effet, une étude montre que le domaine C-terminal du TIMP-1 présente des zones de contact avec les MMPs et qu'une délétion d'une partie de ce domaine altère la liaison du TIMP-1 à la MMP-2 (Caterina et al., 1998). La production du domaine C-terminal ne permet pas d'obtenir une bonne conformation tridimensionnelle ce qui limite l'étude de sa fonction (Bódi et al., 2003).

Dans le domaine N-terminal, deux régions ont été identifiées comme étant impliquées dans l'inhibition des MMPs : la première est composée des résidus ¹C-T-C-V-P-P⁶, formant un bras chélatant le zinc catalytique des MMPs, et la seconde région correspond à la boucle formée par les résidus ⁶⁶M-E-S-V-C⁷⁰. En effet, les boucles formées par les ponts disulfures C1 - C70 et C3 - C99, ainsi que la présence d'une proline en cinquième position de ces boucles permet de rendre les résidus 66 à 70 accessibles pour une interaction avec les MMPs (Figure 13) (Huang et al., 1997; Nagase et al., 1997).

Les domaines catalytiques des MMPs possèdent des sites actifs, appelés sous-sites, interagissant avec les substrats ou les inhibiteurs tels que le TIMP-1. Ces sous-sites sont situés de part et d'autre de

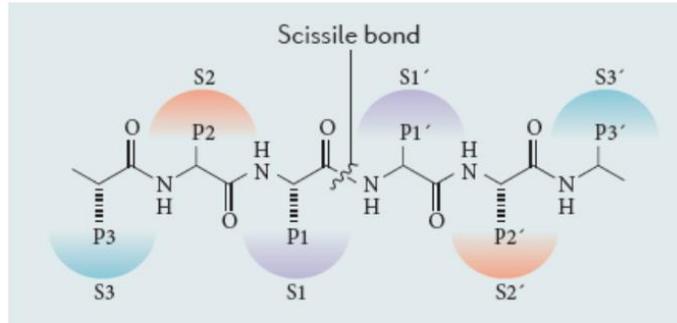


Figure 13: Nomenclature de l'interaction substrat protéase (d'après Vandenbroucke and Libert, 2014)

Les sites de liaison enzymatiques (P) sont en contact direct avec les sites de liaison du substrat (S). Les sites S_n sont situés du côté N-terminal du zinc catalytique et les sites S_n' du côté C-terminal.

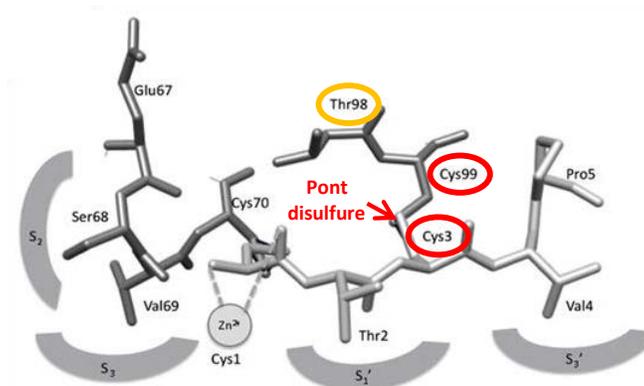


Figure 12: Représentation schématique de l'interaction entre le TIMP-1 et le site catalytique des MMPs.

La threonine 98 est entourée en jaune. Les cysteine 3 et 99 impliquées dans un pont disulfure sont entourées en rouge (d'après Brew and Nagase, 2010)

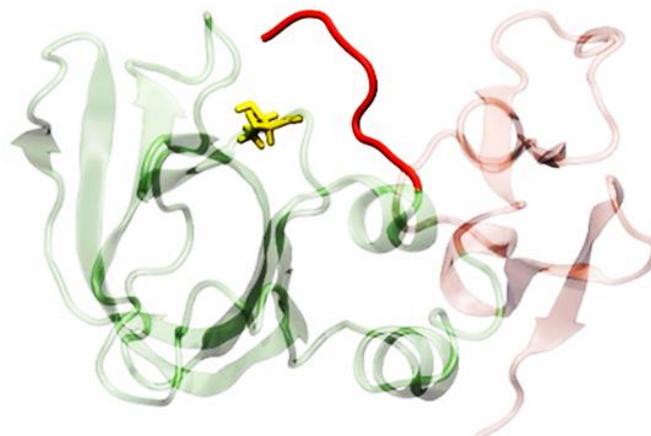


Figure 14: Représentation schématique des résidus du TIMP-1 impliqués dans l'inhibition des MMPs.

Les résidus 1 à 6 (en rouge) forment le bras permettant de chélater le zinc catalytique des MMPs. La thréonine 98 est représentée en jaune.

l'ion zinc catalytique (Figure 12). Ceux situés côté gauche de cet ion sur le schéma sont appelés S1, S2, S3, ... et ceux localisés à droite de cet ion sont nommés S1', S2', S3',... (Overall, 2001).

Les résidus 1 à 5 du TIMP-1 forment un bras capable de s'insérer au sein des sous-sites S'1 et S'3 des MMPs. Le résidu cystéine 1 se trouve à proximité du zinc catalytique de la MMP, bloquant ainsi le site catalytique de la MMP. Les résidus thréonine 2 et valine 4 sont en contact avec les sous-sites S'1 et S'3 (Gupta and Patil, 2012) (Figure 13 et 14).

La réalisation de quinze substitutions de la thréonine 2 a montré que sa taille, sa charge électrostatique et la polarité de sa chaîne latérale jouent un rôle important dans la sélectivité vis-à-vis des MMPs. En effet, lorsque cette thréonine est mutée en alanine (Mutant T2A), la constante d'inhibition de ce mutant est 17 fois plus importante vis-à-vis de la MMP-1 que de la MMP-3 (Meng et al., 1999). Le mutant T2G présente une perte d'inhibition de 50% vis-à-vis des MMP-1, -2 et -3, alors qu'il ne perturbe pas l'inhibition de la MMP-9 (Meng et al., 1999).

La thréonine 98 du TIMP-1 est également importante pour la sélectivité du TIMP-1 vis-à-vis des différentes MMPs. En effet, le mutant T98L devient un puissant inhibiteur de la MMP-19, -14 et -24, métalloprotéases qui ne sont pas inhibées par le TIMP-1 sauvage (Lee et al., 2003, 2004). Plus récemment, des études de dynamique moléculaire ont mis en évidence que la mutation de la thréonine 98 induit une modification de la flexibilité protéique, à l'origine du changement d'interaction du TIMP-1 avec la MT1-MMP (Grossman et al., 2010) (Figure 13 et 14). Le TIMP-1 est également capable d'interagir avec la forme zymogène de la MMP-9 (Olson et al., 1997). Cependant, aucune donnée cristallographique sur ce complexe n'existe à l'heure actuelle. Cette interaction semble stabilisée grâce aux domaines C-terminaux du TIMP-1 et de la pro-MMP-9 (Murphy et al., 1991b).

III.1.2. Effets biologiques associés

En inhibant l'activité protéolytique des MMPs, le TIMP-1 est un régulateur des activités biologiques associées à ces enzymes (Cf. Introduction 1.4). De plus, l'activation des MMPs se faisant principalement par d'autres MMPs, l'inhibition de l'activité de certaines MMPs peut entraîner une diminution en cascade de l'activité de l'ensemble des MMPs (Chakraborti et al., 2003). En conditions physiologiques, l'équilibre TIMPs/MMPs permet de réguler l'activité inhibitrice des MMPs et de maintenir l'homéostasie tissulaire (Hijova, 2005). Il a été montré qu'une dérégulation de ce ratio était impliquée dans différentes pathologies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, ... (Gardner and Ghorpade, 2003; Hamacher et al., 2004; Hijova, 2005).

L'inhibition des MMPs par le TIMP-1 est également impliquée dans différentes pathologies, telles que l'arthrite, l'athérosclérose, la progression tumorale et les maladies neurodégénératives.

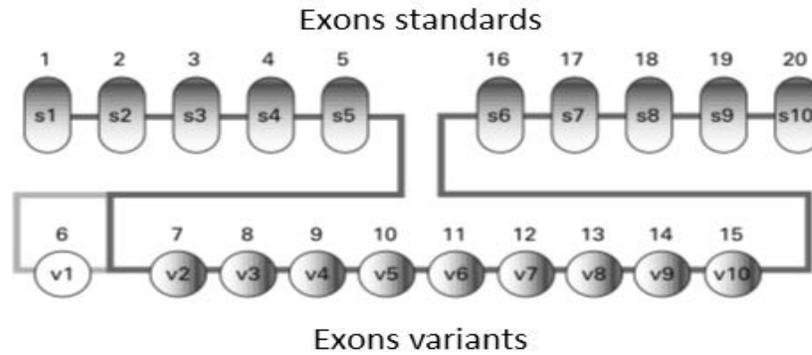
Le TIMP-1, *via* l'inhibition des MMPs, va ainsi pouvoir moduler la prolifération et la migration cellulaire, l'invasion, l'apoptose, ainsi que des processus biologiques tels que l'angiogenèse et la plasticité neuronale (Kerrigan et al., 2000; Murphy et al., 2002). Par exemple, le TIMP-1 stimule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-435 *via* l'inhibition des MMPs. Cet effet passe par l'activation des voies de signalisation MEK, p38 et PI3-kinase (Porter et al., 2004). La capacité invasive des cellules MDA-MB-231 est dépendante de la MMP-9 et l'inhibition de cette MMP par le TIMP-1 induit une diminution des capacités invasives de cette lignée cellulaire (Farina et al., 2011). L'inhibition de la MMP-2 par le TIMP-1 bloque le clivage de la VE-cadhérine conduisant à une diminution de la migration des cellules endothéliales et une diminution de l'angiogenèse tumorale (Akahane et al., 2004).

Dans le SNC, le TIMP-1 est très faiblement exprimé alors que les MMPs le sont très largement (Crocker et al., 2004). L'intégrité de la BHE est la première ligne de défense du système nerveux. De nombreuses études montrent l'implication des MMPs, et plus particulièrement des MMP-2 et -9, dans la rupture de la BHE lors d'un processus neuropathologique (Asahi et al., 2001; Graesser et al., 2000). Ainsi, il a été montré dans des modèles expérimentaux d'encéphalomyélite auto-immune (modèle expérimental de la sclérose en plaques) que le TIMP-1 limite l'expansion de la lésion créée par les MMP-1, -2, -3, -7 et -9 (Gijbels et al., 1994). Dans un modèle murin transgénique de démyélinisation spontanée, une surexpression de la MMP-3 apparaît plusieurs mois avant l'apparition de la maladie. Dans les souris issues du croisement de cette lignée murine avec une lignée de souris surexprimant le TIMP-1, on observe une atténuation des signes cliniques de la maladie (D'Souza et al., 2002). Dans la maladie d'Alzheimer, les MMPs jouent un rôle protecteur de par leur capacité à dégrader les peptides β -amyloïdes qui sont à l'origine de la formation des plaques séniles (Yan et al., 2006). Une augmentation de l'expression de la protéine TIMP-1 induit donc une accumulation des plaques séniles *via* l'inhibition de la MMP-9 (Ridnour et al., 2012).

III.2. TIMP-1 et activités indépendantes de l'inhibition des MMPs

En plus de ses activités inhibitrices de MMPs, le TIMP-1 possède des activités biologiques indépendantes de l'inhibition des MMPs. On parle alors de fonction cytokine du TIMP-1 (Ries, 2014). Cette fonction passe par la fixation du TIMP-1 à des complexes récepteurs membranaires. A ce jour, deux complexes récepteurs ont été identifiés, un complexe formé par la glycoprotéine CD44 et la pro-MMP-9

A



B

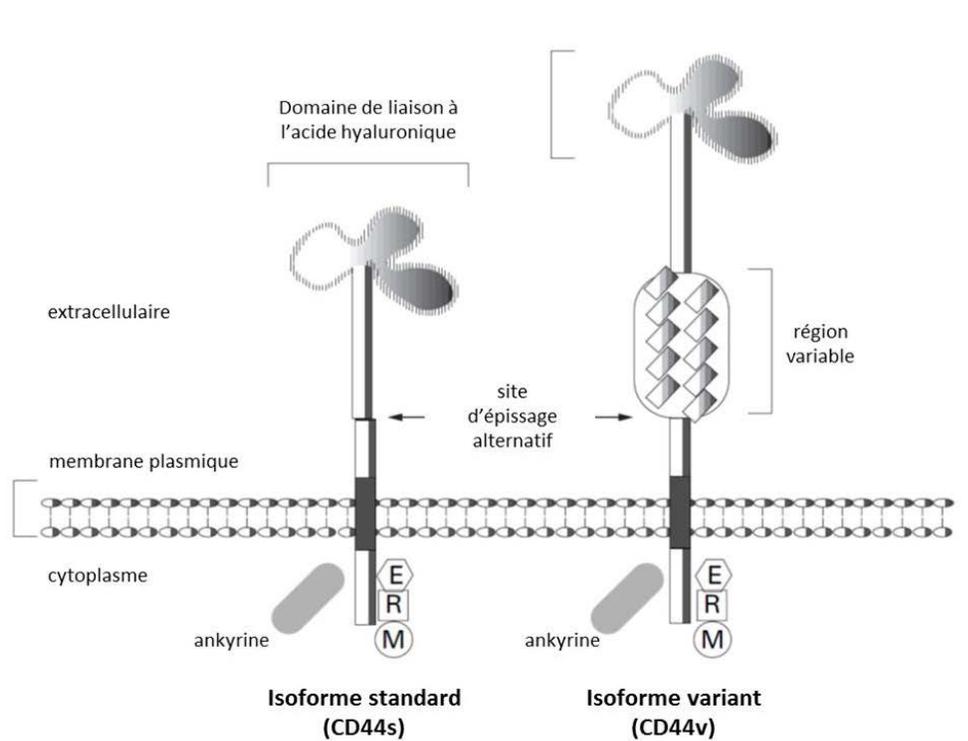


Figure 15: Représentation schématique de la glycoprotéine CD44 et de ses variants.

A : Schéma du gène codant la glycoprotéine CD44 avec les exons standards (s1 à s10), permettant la synthèse de la forme CD44 standard (CD44s). La transcription des exons variants, permet selon l'épissage alternatif des exons variants situés entre les exons standards 5 et 6, la synthèse des isoformes variants de CD44 (CD44v).

B : Structure protéique des isoformes standards et variants de CD44. La liaison de l'acide hyaluronique se fait au niveau de l'extrémité N-terminale extracellulaire. L'interaction avec les molécules du cytosquelette se fait au niveau du domaine intracellulaire ERM (*Ezrin, Radixin, Moesin*) (d'après Goodison et al., 1999)

et un autre composé de la glycoprotéine CD63 et de la sous-unité β 1 des intégrines (Jung et al., 2006; Lambert et al., 2009).

III.2.1. Le complexe récepteur CD44 / pro-MMP-9

III.2.1.1. La glycoprotéine CD44

La protéine CD44 est une glycoprotéine membranaire de type I avec un seul domaine transmembranaire. Cette protéine est exprimée par de nombreux types cellulaires tels que les kératinocytes, les chondrocytes, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules hématopoïétiques et les cellules neuronales. Sa masse moléculaire est comprise entre 85 et 200 kDa, selon les isoformes. En effet, l'ARNm de la glycoprotéine CD44 peut subir un épissage alternatif au niveau des exons 6 à 15 (exons dits variants) générant ainsi une multitude de variants (Figure 15). Par ailleurs, la protéine peut subir une succession de modifications post-traductionnelles (N- et O-glycosylations) (Goodison et al., 1999).

La forme standard de CD44 est exprimée de manière ubiquitaire en conditions physiologiques et pathologiques, alors que ses variants sont moins exprimés dans les tissus sains. Dans les pathologies cancéreuses, la surexpression des formes standard (CD44s) et variantes (CD44v) est corrélée à la progression tumorale et à la dissémination métastatique grâce à l'activation de voies de signalisation cellulaire régulant la survie des cellules cancéreuses (Bourguignon et al., 2014; Naor et al., 2008).

Le ligand majoritaire de CD44 est l'acide hyaluronique (St. John et al., 1990) mais d'autres protéines de la MEC telles que l'ostéopontine, les collagènes et certaines MMPs telles que la MMP-9 ou encore la MT1-MMP se lient également à CD44 (Chetty et al., 2012; Isacke and Yarwood, 2002; Weber et al., 1997).

III.2.1.2. La pro-MMP-9

La MMP-9, une glycoprotéine de 92 kDa possédant 3 sites de N-glycosylation, est exprimée par de nombreux types cellulaires (Van den Steen et al., 2002) et est surexprimée dans de nombreuses pathologies sous ses formes zymogène et active (St-Pierre et al., 2004). La localisation extracellulaire de la pro-MMP-9 permet d'une part son activation par d'autres protéases et d'autre part son interaction avec

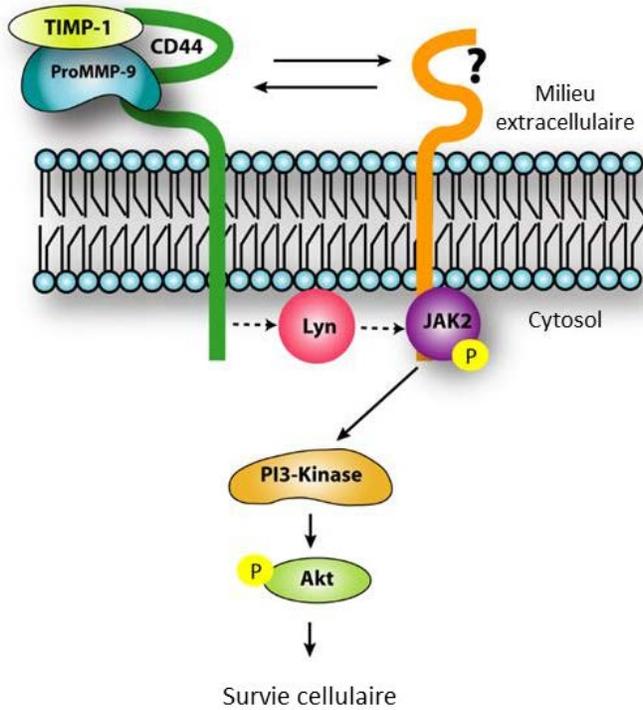


Figure 16: Représentation schématique de l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur proMMP-9/CD44 dans les cellules UT-7 (d'après Bridoux et al., 2013).

Le TIMP-1 s'associe à la forme zymogène de la MMP-9 en interaction avec la glycoprotéine CD44. La formation de ce complexe membranaire induit l'activation de la voie de signalisation Lyn/JAK2/PI3-kinase/Akt, et augmente la survie des cellules érythroleucémiques UT7. Un troisième partenaire membranaire pourrait être impliqué dans ce complexe protéique.

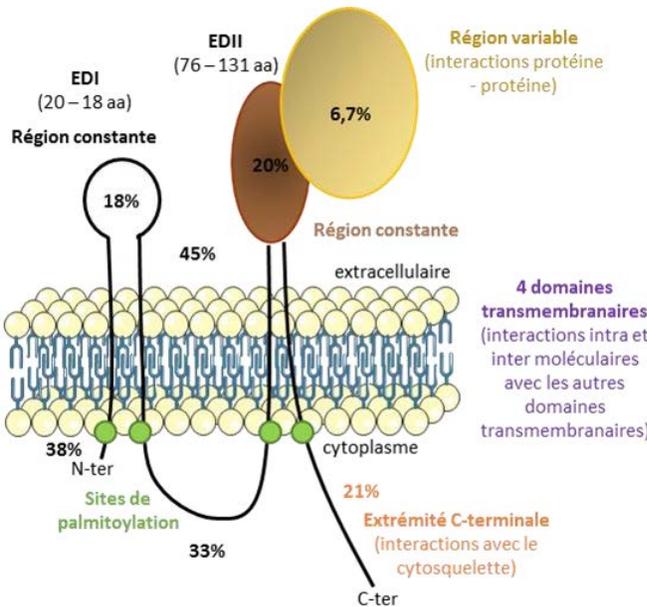


Figure 17: Représentation schématique de la structure des tétraspanines (d'après Stipp et al., 2003).

Schéma représentant la structure commune aux différents membres de la famille des tétraspanines. Les valeurs de pourcentage représentent les homologies de séquences entre les quatre tétraspanines CD9, CD81, CD151 et TM4SF2/A15.

diverses protéines (TIMP-1,...) dont certains récepteurs membranaires (CD44, les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 5\beta 5$) (Bauvois, 2012; Lambert et al., 2009). Ainsi, indépendamment de ses activités enzymatiques, la pro-MMP-9 est capable de réguler de nombreux processus cellulaires et notamment dans les contextes pathologiques où elle est surexprimée (Bauvois, 2012).

III.2.1.3. Signalisation cellulaire et effets biologiques associés

En absence de CD44, le domaine C-terminal du TIMP-1 a été décrit comme capable d'interagir avec le domaine hémapexine de la pro-MMP-9 (Nagase et al., 2006). C'est également ce domaine hémapexine qui semble être impliqué dans l'interaction entre la pro-MMP-9 et la glycoprotéine CD44 (Redondo-Muñoz et al., 2008).

La notion de complexe-récepteur du TIMP-1 pour l'association pro-MMP-9/CD44 a été décrite pour la première fois dans notre laboratoire pour la lignée érythroleucémique UT-7. Dans ces cellules, il a été montré que le TIMP-1, indépendamment de son activité inhibitrice de MMPs, i) se lie à un complexe récepteur membranaire formé par la pro-MMP-9 et la glycoprotéine CD44 (Lambert et al., 2009), ii) est capable d'induire la survie cellulaire en activant la voie de signalisation cellulaire JAK2/Pi 3-kinase/Akt/Bad (Lambert et al., 2003), et iii) active la protéine tyrosine kinase Lyn en amont de JAK2 (Bridoux et al., 2013). De façon intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques de MMPs ou d'anticorps bloquant l'activité de la MMP-9 bloque la fixation du TIMP-1 au complexe pro-MMP-9/CD44, ce qui montre que le site d'interaction du TIMP-1 sur la pro-MMP-9 est proche de son site catalytique (Figure 16) (Lambert et al., 2009).

III.2.2. Le complexe récepteur CD63 / Intégrine $\beta 1$

III.2.2.1. La glycoprotéine CD63

La glycoprotéine CD63 (*Cluster Differentiation 63*) appartient à la famille des tétraspanines. Chez les mammifères, cette famille est composée de plus de 30 membres caractérisés par une structure commune. Les tétraspanines possèdent quatre traversées transmembranaires formées par des hélices α (Figure 17). La première boucle extracellulaire (ED1) de la glycoprotéine CD63 est de petite taille (19 acides aminés) et est conservée entre les différents membres. La seconde boucle extracellulaire (EDII), plus grande (101 acides aminés), possède une région constante et une région variable impliquée dans les interactions protéine-protéine. Les extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires et le domaine C-terminal est impliqué dans les interactions avec le cytosquelette. Le domaine ED2 possède trois sites

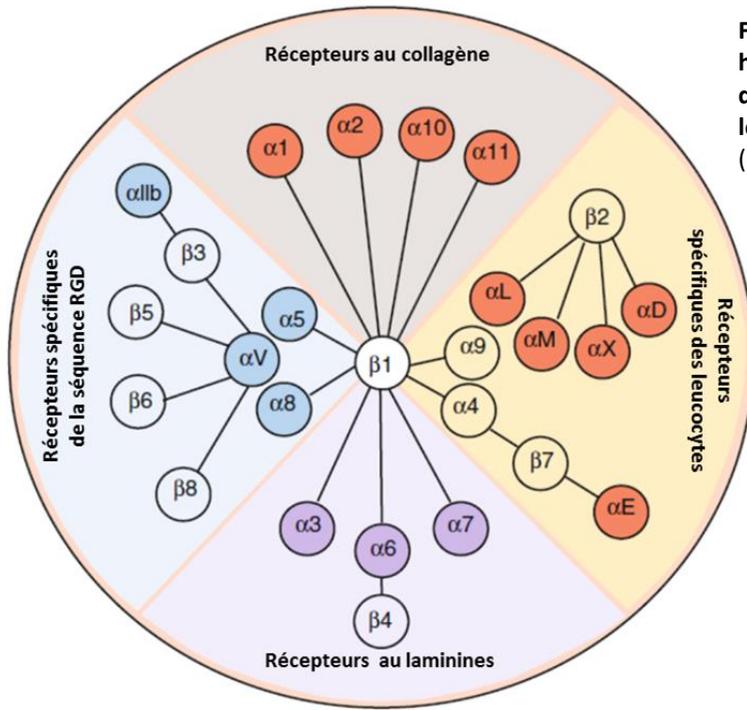


Figure 18: Schéma représentant les hétérodimères formés par l'association des différentes sous unités α et β des intégrines, leur conférant leur spécificité de substrat (d'après Ruoslahti, 1996).

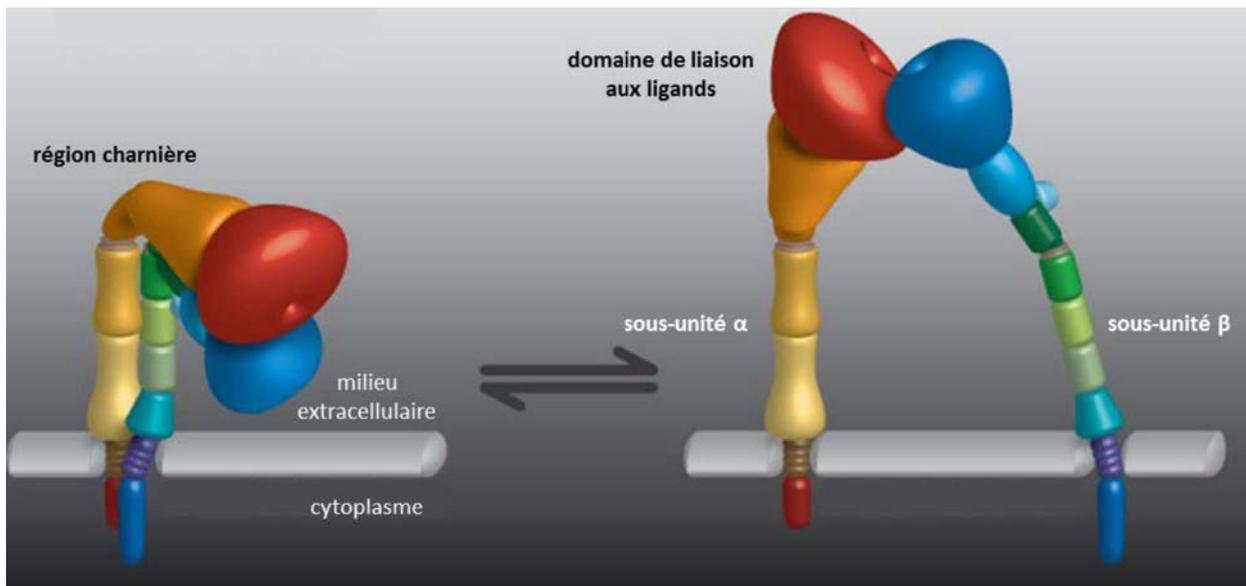


Figure 19: Représentation schématique de la structure des sous-unités α et β des intégrines (Adam Byron)

de N-glycosylation. Selon le degré de glycosylation, la masse moléculaire varie entre 25 et 55 kDa (Metzelaar et al., 1991).

Le processus de palmitoylation est nécessaire à l'interaction entre les différentes tétraspanines ainsi qu'avec d'autres protéines telles que les intégrines (Stipp et al., 2003). Les différents membres de la famille des tétraspanines interagissent entre eux au niveau de micro-domaines membranaires, appelés micro-domaines enrichis en tétraspanines (MET). Ces interactions permettent aux tétraspanines de moduler de nombreux processus physiopathologiques tels que la prolifération, l'adhérence et la migration (Levy and Shoham, 2005). Les interactions des tétraspanines avec les intégrines sont également bien caractérisées et modulent l'adhérence cellulaire (Yunta and Lazo, 2003). Ces interactions se font majoritairement avec la sous-unité $\beta 1$ des intégrines. Cependant, des interactions avec la sous-unités $\alpha 3$ ont été identifiées (Berditchevski et al., 1996; Yauch et al., 2000). CD63 est localisé à la membrane plasmique au niveau des MET mais est également présent au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes. L'extrémité C-terminale de CD63 contient une séquence YXX \emptyset (\emptyset correspondant à un acide aminé hydrophobe) permettant l'endocytose grâce à la fixation de la protéine cargo AP-2 (Pols and Klumperman, 2009). L'interaction de CD63 avec d'autres protéines membranaires telles que la MT1-MMP, induit leur endocytose et leur dégradation ou leur recyclage (Takino et al., 2003).

III.2.2.2. La sous-unité $\beta 1$ des intégrines

Chez les vertébrés, la famille des intégrines regroupe 24 hétérodimères formés par 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . Ces protéines sont impliquées dans les interactions cellules / MEC et cellules / cellules et contrôlent majoritairement l'adhérence et la migration cellulaire (Barczyk et al., 2010). L'assemblage des différentes sous-unités α et β confère aux intégrines leur spécificité de substrat (Ruoslahti, 1996) (Figure 18).

Chaque sous-unité d'intégrine est composée d'un grand domaine extracellulaire d'environ 80 à 150 kDa, d'une seule traversée transmembranaire en hélice α et d'une courte chaîne intracellulaire (à l'exception de la sous-unité $\beta 4$). La partie extracellulaire des sous-unités α et β présente un domaine globulaire N-terminal permettant l'interaction avec les ligands. Les sous-unités α et β sont reliées par des liaisons non covalentes. Les domaines des intégrines sont reliés par des régions charnières permettant la flexibilité de ces protéines (Figure 19 et 20) (Srichai and Zent, 2010).

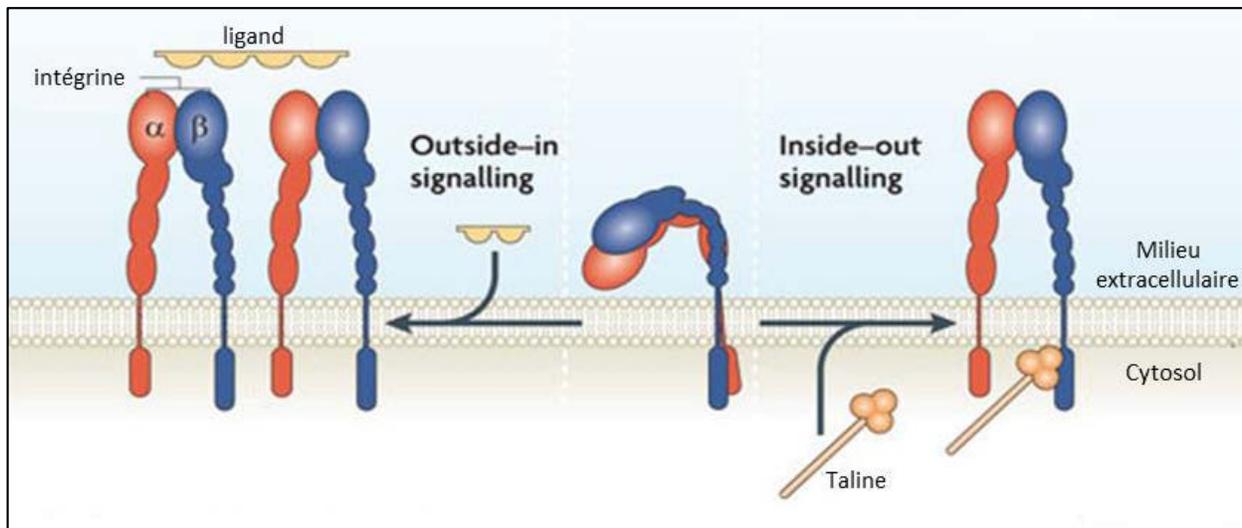


Figure 20: Représentation schématique des voies de signalisation permettant l'activation du dimère d'intégrine (d'après Avraamides et al., 2008).

Au centre : la forme inactive, repliée. À gauche : la signalisation *outside-in* qui, en réponse à la fixation d'un ligand extracellulaire va activer le dimère. À droite : la signalisation *inside-out* qui va activer le dimère d'intégrine suite au recrutement de la taline au niveau intracellulaire de la sous unité β .

Les intégrines doivent subir une étape d'activation afin d'être fonctionnelles. Un premier mode d'activation peut se faire au niveau de leur domaine intracellulaire, appelée "*inside-out*". Cette activation permet à l'intégrine de se déplier et de rendre son domaine N-terminal accessible aux ligands. La liaison des ligands se fait au niveau du domaine extracellulaire N-terminal grâce à trois séquences consensus et aboutit à la formation des complexes focaux permettant l'adhérence et la migration cellulaire (Campbell and Humphries, 2011):

- la séquence RGD, présente par exemple sur la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène
- la séquence GFOGER, retrouvée dans les collagènes (O étant une hydroxyproline)
- la séquence LDV permettant la reconnaissance des ICAM (*Intracellular Cell Adhesion Molecule*) et VCAM (*Vascular Cell Adhesion Molecule*)

L'intégrine peut être activée par phosphorylation par un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) ou par association avec une protéine cytoplasmique, la taline (Figure 20, gauche) (Ginsberg et al., 2005; Teoh et al., 2012).

Un second mode d'activation des intégrines se fait par activation de voies de signalisation intracellulaires *via* un mécanisme appelé "*outside-in*" après fixation de substrats au niveau du domaine extracellulaire des intégrines. Cette interaction permet d'induire un changement conformationnel et ainsi l'exposition de séquences présentes au sein du domaine intracellulaire impliquées dans le recrutement des protéines permettant la formation de plaques d'adhérence (Figure 20, droite) (Askari et al., 2009; Avraamides et al., 2008; Srichai and Zent, 2010).

En plus d'interagir entre elles, les intégrines peuvent s'associer avec d'autres protéines membranaires, telles que les tétraspanines. Ces interactions peuvent se faire avec un hétérodimère $\alpha\beta$ ($\alpha3\beta1$), ou uniquement avec la sous-unité $\beta1$ (Berditchevski and Odintsova, 1999; Brakebusch and Fässler, 2005). La sous-unité $\beta1$ possède 5 isoformes résultant d'un épissage alternatif. L'isoforme 1 est exprimée dans de nombreux types cellulaires tandis que les quatre autres présentent des expressions plus spécifiques (Van der Flier et al., 1995; Languino and Ruoslahti, 1992). Cette sous-unité des intégrines est importante pour les interactions cellules-cellules et cellules-MEC (Tanjore et al., 2008). L'intégrine $\beta1$ est importante dans le développement de nombreux cancers et des études ont montré qu'une surexpression de la sous-unité $\beta1$ était corrélée à un mauvais pronostic pour la survie des patients (Dingemans et al., 2010). De plus, cette intégrine est impliquée dans la transition des cellules tumorales en dormance et la dissémination métastatique *via* l'activation de la protéine FAK (Shibue and Weinberg, 2009). Le profil d'expression de l'intégrine $\beta1$ est donc étudié en tant que marqueur tumoral et cible thérapeutique (Barkan and Chambers, 2011, 2011; Dingemans et al., 2010; Taherian et al., 2011).

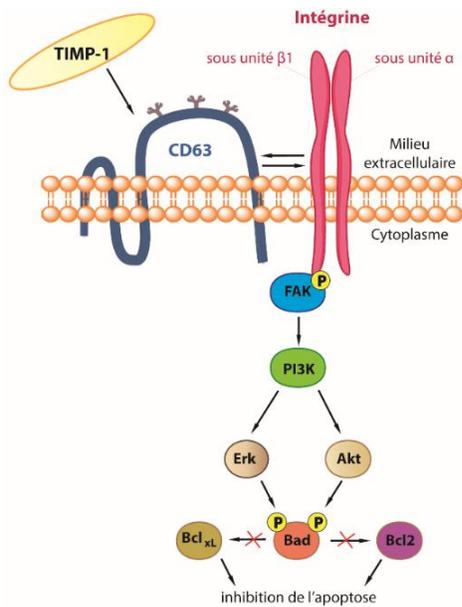


Figure 21: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β1 et régulant l'apoptose (d'après Ries, 2014).

Le TIMP-1 s'associe à la glycoprotéine CD63, permettant le recrutement de la sous-unité β1 des intégrines en hétérodimère avec une sous-unité α. L'activation de la voie de signalisation FAK/PI3-Kinase, puis des protéines de signalisation Erk ou Akt permet de déclencher la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad, permettant ainsi de maintenir les protéines anti-apoptotiques Bcl_{xL} et Bcl2 dans leur conformation active.

A Cellules épithéliales mammaires

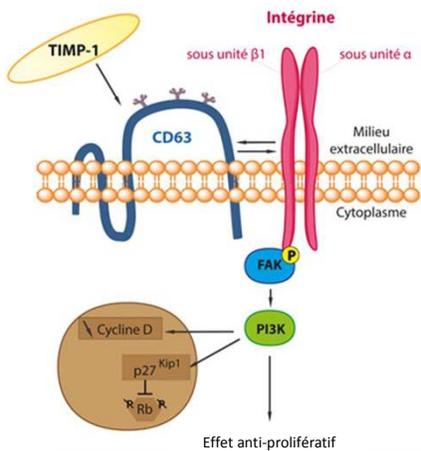
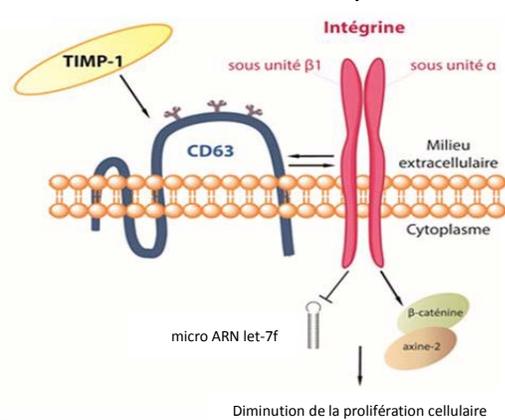


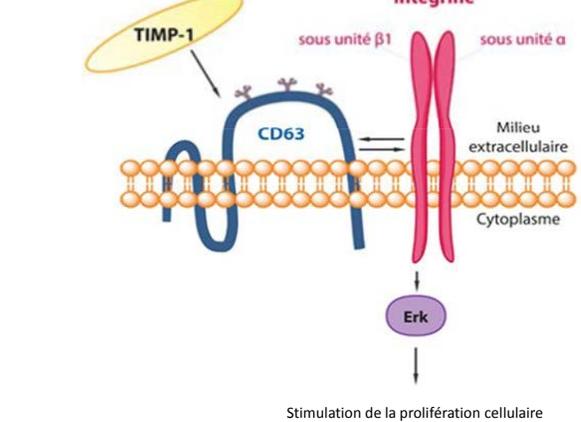
Figure 22: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β1 et modulant la prolifération cellulaire (d'après Egea et al., 2012; Taube et al., 2006).

L'interaction du TIMP-1 avec la glycoprotéine CD63 permet le recrutement de la sous-unité β1 des intégrines et l'activation de diverses voies de signalisation cellulaire, régulant la prolifération cellulaire dans différents types cellulaires.

B Cellules souches mésenchymateuses



C Cellules de carcinome pulmonaire



III.2.2.3. Signalisation cellulaire et effets biologiques associés

Le complexe récepteur CD63/intégrine $\beta 1$ a été caractérisé pour la première fois dans la lignée cellulaire mammaire MCF10A par la méthode du double hybride (Jung et al., 2006). Une fois le TIMP-1 lié à CD63, cette dernière interagit avec l'intégrine $\beta 1$ associée à une sous unité α ($\alpha 3$, 4, 5 ou 6) (Ries, 2014). Le TIMP-1 permet le maintien de la sous-unité β dans sa conformation active, de façon dépendante de CD63. Depuis la découverte de ce complexe en 2006, les effets du TIMP-1 passant par ce récepteur ont été étudiés dans différents types cellulaires. De nombreuses voies de signalisations ainsi que différents processus cellulaires ont été identifiés.

a. Récepteur CD63/Intégrine $\beta 1$ et activité anti-apoptotique

Dans les cellules épithéliales mammaires humaines MCF10A, l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/Intégrine $\beta 1$ induit la survie cellulaire (Jung et al., 2006). Ces effets passent par l'activation de voies de signalisation intracellulaires impliquant les protéines de la famille Bcl-2 (Li et al., 1999). L'activation de la voie de signalisation FAK/PI3-Kinase, puis des protéines de signalisation Erk ou Akt permet de déclencher la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad, permettant ainsi de maintenir les protéines anti-apoptotiques Bcl_{xL} et Bcl₂ dans leur conformation active (Figure 21) (Liu et al., 2003). En plus de cette voie d'apoptose intrinsèque, le TIMP-1 est également capable d'inhiber la voie apoptotique extrinsèque liée à la protéine TRAIL (*Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand*) par l'activation de la voie FAK/PI3-kinase (Liu et al., 2005).

b. Récepteur CD63/Intégrine $\beta 1$ et activité mitogénique

Dans les cellules épithéliales mammaires MCF10A, la fixation du TIMP-1 au complexe récepteur CD63/intégrine $\beta 1$ inhibe la prolifération cellulaire (Taube et al., 2006). Cet effet résulte d'un blocage du cycle cellulaire en phase G1 dû à une diminution de la cycline D1, protéine permettant l'entrée dans le cycle cellulaire, ainsi qu'une surexpression de la protéine p27^{Kip1}, inhibiteur du cycle cellulaire en phase G1 (Figure 22 A). Un effet similaire a été identifié dans les cellules souches mésenchymateuses humaines issues de moelle osseuse. La liaison du TIMP-1 au complexe CD63/intégrine $\beta 1$ réprime l'expression du micro-ARN let-7f ciblant l'axine 2 qui peut alors maintenir la β -caténine dans sa conformation inactive, et ainsi diminuer la prolifération cellulaire (Figure 22 B) (Egea et al., 2012).

Dans les cellules cancéreuses pulmonaires murines, le TIMP-1 possède à l'inverse un effet prolifératif. En effet, une étude montre qu'une extinction du gène codant le TIMP-1 induit une diminution

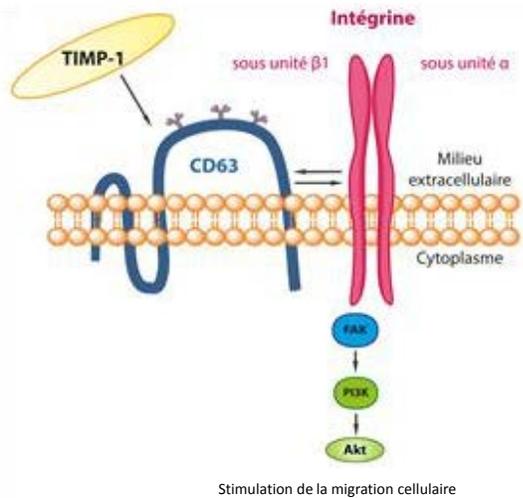


Figure 23: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β1 et modulant la migration cellulaire dans les cellules souches neuronales humaines.

Dans les cellules souches neuronales, l'interaction du TIMP-1 avec la glycoprotéine CD63 permet le recrutement de la sous-unité β1 des intégrines et l'activation de la voie de signalisation cellulaire FAK/PI3-Kinase/Akt induisant la migration cellulaire.

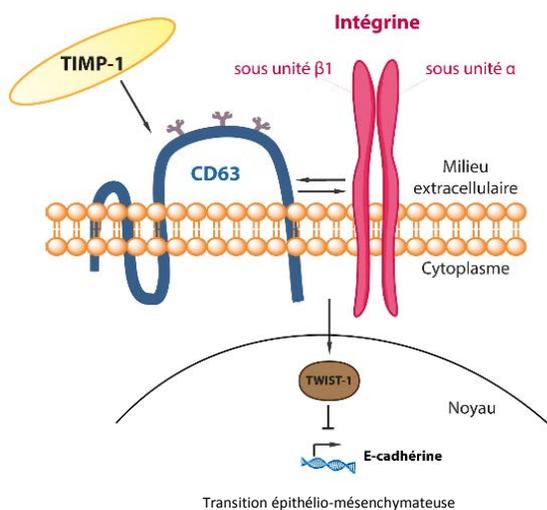


Figure 24: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β1 induisant la TEM dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7.

Dans les cellules cancéreuses mammaires, l'interaction du TIMP-1 avec la glycoprotéine CD63 induit l'expression du facteur TWIST-1, réprimant la transcription du marqueur épithélial E-cadhérine.

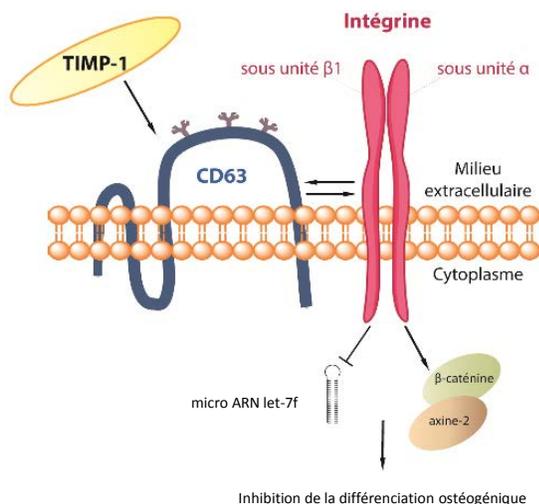


Figure 25: Schéma représentant l'interaction du TIMP-1 avec le complexe récepteur CD63/intégrine β1 inhibant la différenciation ostéogénique dans les cellules souches mésenchymateuses humaines.

Dans les cellules souches mésenchymateuses humaines, l'interaction du TIMP-1 avec la glycoprotéine CD63 induit une répression de la voie de signalisation Wnt/β-caténine et inhibe la différenciation ostéogénique.

de la prolifération tumorale. Cette régulation se fait grâce à la fixation du TIMP-1 sur le complexe CD63/intégrine β 1 et l'activation de la voie de signalisation Erk (Figure 22 C) (Xia et al., 2012).

c. Récepteur CD63/Intégrine β 1 et migration cellulaire

Dans les cellules souches neuronales humaines, le TIMP-1 agit comme une molécule chimio-attractante. Dans ces cellules, la fixation du TIMP-1 au complexe CD63/intégrine β 1 active la voie FAK/PI3-kinase/Akt entraînant une augmentation du nombre de contacts focaux ainsi qu'une réorganisation des fibres d'actine et de la vinculine stimulant ainsi la migration cellulaire (Figure 23) (Lee et al., 2014).

d. Récepteur CD63/Intégrine β 1 et différenciation cellulaire

Dans la lignée cellulaire épithéliale mammaire MCF10A, la surexpression du TIMP-1 induit des changements au niveau de la morphologie cellulaire, de l'adhérence, du remodelage du cytosquelette et de la mobilité, caractéristiques d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ces effets se traduisent par une diminution de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine et une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine, vimentine, et fibronectine (D'Angelo et al., 2014). Ces effets sont dus à l'interaction du TIMP-1 avec CD63, induisant l'expression du facteur de transcription TWIST-1, impliqué dans la répression de la transcription de la E-cadhérine (Figure 24) (Vesuna et al., 2008).

Dans les cellules souches mésenchymateuses humaines, il a également été démontré que le TIMP-1 empêche la différenciation ostéogénique *via* sa liaison au complexe CD63/intégrine β 1 (Egea et al., 2012). Cet effet passe par une régulation négative de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Figure 25).

III.2.3. Les complexes récepteurs du TIMP-1 non identifiés et activités biologiques associées.

De nombreuses études décrivent des effets biologiques du TIMP-1 indépendants de sa capacité à inhiber les MMPs, cependant les récepteurs impliqués dans la transduction de ces effets n'ont pas été identifiés.

i. TIMP-1 et activité érythroïde potentialisante

Le TIMP-1 a été caractérisé en tant que protéine potentialisant les effets de l'EPO sur la prolifération de progéniteurs érythroïdes humains normaux et de lignées cellulaires érythroleucémiques humaine et murine. Un récepteur potentiel d'une masse moléculaire de 32 kDa a été identifié mais aucune étude complémentaire n'a permis de caractériser le récepteur impliqué (Avalos et al., 1988; Gasson et al., 1985).

ii. TIMP-1 et migration cellulaire

Le TIMP-1 diminue la migration cellulaire grâce à la stimulation de l'expression de la protéine phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue*) dans les cellules endothéliales dermiques. Cette phosphatase déphosphoryle les protéines FAK et paxilline ayant pour conséquence un remodelage du cytosquelette (Akahane et al., 2004).

A l'inverse, la migration cellulaire est augmentée lorsque le TIMP-1 est surexprimé dans les cellules hépatiques canines MDCK mais aucun récepteur n'a été caractérisé (Jung et al., 2012).

iii. TIMP-1 et différenciation cellulaire

Le TIMP-1 joue un rôle important dans la différenciation de nombreux types cellulaires. Dans les cellules érythroleucémiques humaines UT-7 et murines 32D ainsi que dans des progéniteurs de la lignée érythroïde CD34+, le TIMP-1 induit une différenciation hématopoïétique. Cette différenciation résulte de l'activation de la voie de signalisation intracellulaire p38 α MEKK1/MEK6 et de la caspase-3 (Dassé et al., 2007). Dans les cellules UT-7, le complexe récepteur pro-MMP-9/CD44 induit la survie cellulaire, on peut donc supposer que ce complexe récepteur soit impliqué dans la différenciation de ces cellules.

Le TIMP-1 induit une TEM en augmentant l'expression des protéines de la TEM et en modifiant les propriétés migratoires et invasives des cellules hépatiques canines MDCK. La surexpression du TIMP-1 dans cette lignée cellulaire induit une dépolarisation cellulaire ainsi qu'une diminution de la mortalité cellulaire au centre des sphéroïdes. Les facteurs de transcription SLUG, TWIST, ZEB-1 et -2 sont surexprimés et sont à l'origine d'une diminution de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine et de la surexpression des marqueurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, la fibronectine et la vimentine. De plus, la surexpression du TIMP-1 induit une augmentation de l'expression de la MT1-MMP. Même si l'implication du complexe CD63/intégrine β 1 a été supposée par les auteurs de cette étude, cela n'a pas pu être démontré du fait de l'absence d'anticorps reconnaissant le CD63 canin (Jung et al., 2012).

Les cellules centroblastiques peuvent se différencier en cellules plasmiques sous l'action du TIMP-1 qui induit une augmentation de l'expression de l'interleukine-10 et une activation de CD40 (Guedez et al., 2001).

Enfin, au niveau du SNC, le TIMP-1 est capable d'induire une différenciation des oligodendrocytes (Moore et al., 2011).

iv. TIMP-1 et croissance neuritique

Il a été montré que le TIMP-1 entraîne la réduction du réseau neuritique au sein de neurones corticaux d'embryons de souris. Ces effets impliquent en partie l'inhibition des MMPs. Cependant les résultats de cette étude suggèrent également l'implication d'une voie indépendante de l'inhibition des MMPs et d'un complexe récepteur d'origine inconnue (Ould-yahoui et al., 2009).

IV. Le rôle du TIMP-1 en contexte pathologique

Le TIMP-1 participe au développement de différentes pathologies et pourrait de ce fait constituer un biomarqueur important (Gardner and Ghorpade, 2003; Grunnet et al., 2013; Holten-Andersen et al., 1999; Würtz et al., 2008). Dans cette partie, nous nous focaliserons sur le rôle du TIMP-1 dans les cancers et les maladies neurodégénératives qui ont été plus spécifiquement étudiées au cours de cette thèse.

IV.1. TIMP-1 et cancer

Le TIMP-1 est surexprimé dans de nombreux types de cancers tels que les cancers mammaires et du colon et le mélanome (Airola et al., 1999; Holten-Andersen et al., 1999; Wu et al., 2008). D'une façon générale cette surexpression du TIMP-1 est corrélée à un mauvais pronostic vital (Aaberg-Jessen et al., 2009; Kuvaja et al., 2007; Ma et al., 2014; Terpos et al., 2010). A ce titre, le TIMP-1 est considéré comme biomarqueur des cancers gastriques et mammaires (Grunnet et al., 2013; Wang et al., 2006; Würtz et al., 2008). Cependant, le rôle du TIMP-1 dans les cancers est complexe puisqu'il exerce des effets pro- et anti-tumoraux (Hornebeck et al., 2005). Cette complexité résulte en partie du double rôle du TIMP-1 qui est à la fois un inhibiteur de MMPs, enzymes dont les activités biologiques dans les cancers sont à la fois pro et anti-tumorales (Cf. Introduction I.4), et une cytokine capable de se lier à différents complexes récepteurs membranaires et de modifier le comportement cellulaire (Cf. Introduction III.2).

Dans les carcinomes hépatocellulaires, la surexpression du TIMP-1 inhibe l'activité protéolytique de la MMP-2 et limite le développement de métastases (Wang et al., 2012). Une étude sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 révèle la complexité d'action du TIMP-1 car, *in vivo*, cette protéine diminue la dissémination métastatique mais augmente le volume tumoral (Bigelow et al., 2009). Le TIMP-1 diminue le potentiel métastatique des carcinomes hépatiques alors qu'à l'inverse il augmente la dissémination du cancer du colon (Min et al., 2012; Ree et al., 1997; Seubert et al., 2014; Wang et al., 2012). Dans un contexte tumoral, le TIMP-1 promeut l'accumulation de fibroblastes associés au cancer, qui sont des cellules non tumorales permettant de favoriser le développement tumoral (Gong et al., 2013).

Dans les cancers, le TIMP-1 joue également un rôle important de par sa capacité à moduler l'efficacité des traitements anti-tumoraux. Par exemple, l'administration de TIMP-1 peut potentialiser les traitements anti-tumoraux, tels que la doxorubicine, en diminuant la prolifération cellulaire et en augmentant la sensibilité du fibrosarcome au traitement (Bao et al., 2014). A l'inverse, une étude réalisée sur 173 patientes atteintes d'un cancer mammaire métastatique montre que la réponse à une chimiothérapie est nulle quand la concentration de TIMP-1 est élevée au niveau de la tumeur primaire tandis que cette réponse est de 50 % lorsque le taux de TIMP-1 est faible (Schrohl et al., 2006). De plus,

des études *in vitro* montrent que des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 exposées au TIMP-1 ont perdu leur sensibilité à l'apoptose induite par le Paclitaxel, un antimétabolite utilisé en chimiothérapie (Wang et al., 2010). Des cellules de fibrosarcome issues de poumon de souris déficientes pour le gène codant le TIMP-1 sont plus sensibles à l'apoptose induite par trois traitements chimiothérapeutiques, l'Etoposide, le Cytosar et la Vincristine, suggérant une résistance aux traitements chimiothérapeutiques induite par le TIMP-1 (Davidsen et al., 2006). Ces résultats peuvent s'expliquer en partie par le fait que dans les cancers mammaires et colorectaux, le TIMP-1 induit l'expression des protéines kinases CDK2a, CDK1, PLK1 et ATM, impliquées dans l'hyperphosphorylation des topoisomérases cibles de certains agents chimiothérapeutiques (Bjerre et al., 2013; Hekmat et al., 2013).

IV.2. TIMP-1 et maladies neurodégénératives

Une augmentation de l'expression de TIMP-1 est observée dans certaines maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer (Kouwenhoven et al., 2001; Lorenzl et al., 2002). Cette surexpression du TIMP-1 est due à une surexpression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 α , IL-6) augmentant ainsi l'expression du TIMP-1 afin de réguler l'activité des MMPs (Szymocha et al., 2000). Des modèles de lésion du SNC, et plus précisément une excitotoxicité (mort neuronale induite par choc osmotique) reposent sur une injection locale d'ion kaïnate reproduisant les effets du glutamate et mimant les phénomènes cellulaires retrouvés dans les maladies neurodégénératives. Dans ce modèle, une augmentation de l'expression du TIMP-1 au niveau des neurones et des astrocytes suggère une implication de cette protéine dans les événements cellulaires précoces impliqués dans la réorganisation tissulaire et la neuroprotection (Rivera et al., 1997).

Dans la sclérose en plaques, le niveau protéique de la MMP-9 est élevé, alors que l'expression du TIMP-1 est faible. Ainsi, l'inhibition de la MMP-9 par le TIMP-1 est moins importante qu'en condition physiologique et serait la cause de l'augmentation de l'activité protéolytique des MMPs et de l'évolution chronique de la maladie (Lee et al., 1999). Dans un modèle animal expérimental de la sclérose en plaques, une extinction du gène codant le TIMP-1 conduit à une augmentation de la dégradation de la gaine de myéline, accompagnée d'une augmentation de l'infiltration des lymphocytes et une accumulation des macrophages. Cette étude suggère que l'expression de TIMP-1 par les astrocytes induit une réponse cytoprotectrice atténuant la lésion de la gaine de myéline en régulant l'infiltration des cellules immunitaires (Crocker et al., 2006). Dans la maladie d'Alzheimer, le TIMP-1 inhibe la MMP-9, et par conséquent réduit sa capacité à dégrader les peptides A β et induit l'accumulation de ces peptides formant les plaques séniles (Ridnour et al., 2012).

V. But du travail

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire « Signalisation et Récepteurs Matriciels » (SiRMa) qui fait partie de l'UMR CNRS/URCA n°7369 « Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire » (MEDyC). La thématique principale de cette unité porte sur l'étude des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire en conditions physiopathologiques. Cette unité est divisée en trois équipes dont les approches sont transdisciplinaires et appliquées à la modulation de la progression tumorale et aux phénomènes de vieillissement de la MEC. Le groupe de travail dans lequel j'ai réalisé ma thèse s'intéresse à la régulation de l'activité des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et de leurs inhibiteurs endogènes (TIMPs) par le phénomène d'endocytose impliquant le récepteur LRP-1 dans les cancers.

La matrice extracellulaire joue un rôle architectural et physiologique dans tous les tissus et organes. Elle est soumise à un renouvellement perpétuel et sa dégradation est principalement assurée par des enzymes protéolytiques, notamment les MMPs. Ces MMPs sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques. Elles participent notamment à la progression tumorale en régulant l'angiogenèse, les processus d'invasion et de dissémination métastatique en favorisant la résistance à certains traitements anticancéreux. Elles participent également au développement de certaines maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer où elles modulent la formation des plaques séniles. L'inhibition des MMPs par leurs inhibiteurs naturels et notamment le TIMP-1 ne suffit pas à limiter le développement de ces pathologies.

Ces observations peuvent être expliquées par le fait que le TIMP-1 possède des activités biologiques indépendantes de l'inhibition des MMPs. Ces activités cytokiniques passent par sa liaison à différents complexes récepteurs activant des voies de signalisation intracellulaires conduisant à la différenciation, la prolifération et/ou l'inhibition de l'apoptose. La modulation de ces activités cellulaires peut favoriser le développement de pathologies. Deux récepteurs du TIMP-1 ont à ce jour été identifiés : i) le complexe récepteur formé par la glycoprotéine CD63 et l'intégrine β 1 dans les cellules épithéliales mammaires MCF10A, et ii) le complexe récepteur composé de la pro-MMP-9 et la glycoprotéine CD44 dans les cellules érythroleucémiques UT-7.

Les activités cytokiniques font du TIMP-1 une protéine d'intérêt dans le développement de stratégies thérapeutiques. En effet, il pourrait être intéressant de bloquer spécifiquement les effets du TIMP-1 passant par sa fixation aux différents récepteurs tout en conservant sa capacité à inhiber les MMPs. Le développement de tels outils pharmacologiques nécessite l'identification de nouveaux récepteurs du TIMP-1, la caractérisation de l'interaction du TIMP-1 avec ses différents récepteurs, et l'identification des régions, domaines et résidus du TIMP-1 impliqués dans ses différentes activités biologiques.

Dans ce contexte, le but de ce travail de thèse est i) d'identifier le récepteur du TIMP-1 dans les cellules du système nerveux central, ii) de caractériser son interaction avec ses différents récepteurs en étudiant la dynamique intrinsèque du TIMP-1 et iii) d'identifier des résidus et domaines impliqués dans ces interactions.

MATERIEL ET METHODES

I. Etude *in silico* du TIMP-1

Les études *in silico* ont été menées en collaboration avec le plateau de Modélisation Moléculaire Multi-échelle (P3M) de la Maison de la Simulation de Champagne-Ardenne et plus particulièrement avec le Docteur Nicolas Belloy et le Professeur Manuel Dauchez.

I.1. Analyse des modes normaux

Les données structurales du TIMP-1 ont été extraites de la structure PDB 1UEA correspondant au complexe formé par le TIMP-1 et le domaine catalytique de la MMP-3. A l'aide du logiciel CHARMM, les atomes d'hydrogènes ont été ajoutés et la structure a été soumise à 1000 pas de minimisation en *Steepest Descent* et 50 000 pas avec l'algorithme *Newton-Raphson*.

Les analyses de modes normaux ont été appliquées à la structure minimisée obtenue dans le logiciel R en utilisant le module Bio3d (Grant et al., 2006). Le champ de force « calphax » a été utilisé car il permet la prise en compte de constantes de forces spécifiques pour les ponts disulfures et les éléments de structures secondaires comme les hélices α et les feuilletts β . Les figures représentant les mouvements de grandes amplitudes du TIMP-1 ont été générées en utilisant le logiciel Pymol (Schrödinger, New-York, USA).

Les différents modes ont été analysés en termes de fluctuations atomiques quadratiques moyennes et en termes d'énergie de déformation dans l'environnement R/Bio3d.

I.2. Dynamique moléculaire

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées à partir de la structure minimisée du TIMP-1 dans un solvant explicite (TIP3P) et sur un intervalle de temps de 100 ns. Nous avons utilisé le logiciel NAMD 2.9 avec le champ de forces CHARMM27 et dans l'ensemble NPT (nombre de particules, pression et température constante) à 1 atmosphère, 298 Kelvins et avec une évaluation des interactions à longue portée jusqu'à un seuil de 11 Å (Phillips et al., 2005). Un pas d'intégration de 2 fs a été utilisé et les énergies et coordonnées de chaque atome ont été sauvegardées toutes les 5 ps pour une analyse ultérieure. La simulation a été couplée à un bain de Langevin et à un barostat de type Nosé-Hoover pour contrôler la température et la pression. L'ensemble des calculs de dynamique moléculaire a été effectué au Centre de Calcul ROMEO de la Maison de la Simulation de Champagne-Ardenne.

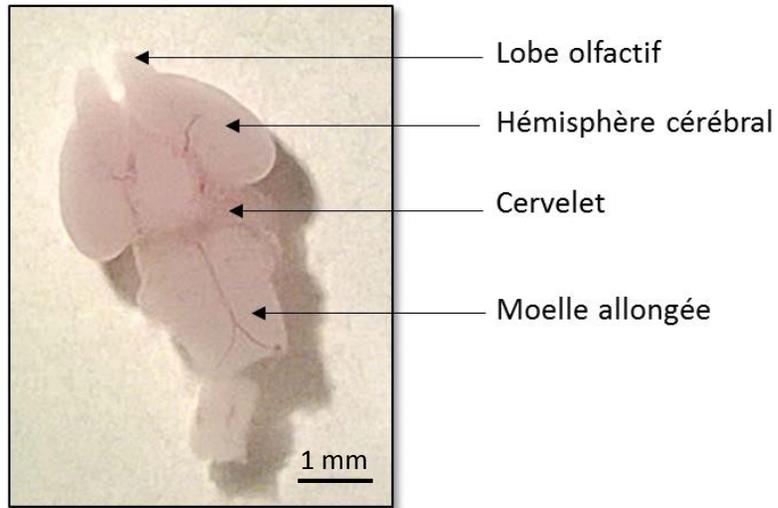


Figure 26: Schéma des différentes structures d'un cerveau d'embryon de souris au stade 18 jours

Les neurones sont extraits à partir des hémisphères cérébraux

II. Lignées cellulaires et culture primaire

II.1. Culture primaire de neurones corticaux d'embryons de souris (E18)

Le prélèvement des neurones corticaux d'embryons de souris est réalisé en accord avec les réglementations du comité éthique. Des souris Swiss femelles à 18 jours de gestation sont endormies à l'aide d'isoflurane (Abbvie, Rungis, France) et les placentas contenant les embryons au stade embryonnaire 18 jours sont placés dans un milieu de dissection froid (HBSS 1X (Invitrogen, distribué par Life technologies, Saint-Aubin, France) contenant 0,5% (p/v) de glucose (Sigma-Aldrich)). Après décapitation des embryons, les cerveaux sont prélevés, le cervelet est éliminé et seuls les hémisphères gauche et droit sont conservés. Les lobes olfactifs et les méninges sont également enlevés sous une loupe binoculaire (Figure 26).

Les cortex isolés de six embryons sont ensuite rassemblés puis une dissection enzymatique est réalisée pendant 9 minutes à 37°C dans du milieu HBSS contenant 0,1% (v/v) de trypsine (Invitrogen) et 10 µg/ml de DNase I (*Désoxyribonucléase I*) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Un lavage par décantation avec un milieu de culture contenant du sérum (MEM α , pyruvate 1 mM, 0,6% (p/v) glucose et 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Invitrogen)) est réalisé afin d'inhiber l'action de la trypsine. On réalise ensuite un second lavage avec du milieu HBSS sans trypsine puis une étape de dissociation mécanique par aspiration avec des cônes de taille de plus en plus petite dans un volume de 2,5 mL de milieu HBSS contenant 5 µg/mL de DNase I. Les neurones sont ensuite centrifugés (1250 g, température ambiante, 5 minutes) et le culot cellulaire est remis en suspension dans le milieu de culture avec sérum. L'ensemencement des neurones se fait dans une plaque 6 puits préalablement recouverte avec 10 µg/mL de poly-lysine (Sigma-Aldrich) à raison de $1,5 \cdot 10^6$ cellules par puits, ou sur des lamelles de verre préalablement recouvertes avec 1 mg/mL de poly-lysine à raison de $1,5 \cdot 10^5$ cellules par lamelle. Les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5% (v/v) de CO₂. Une heure trente après ensemencement, le milieu de culture est remplacé par un milieu défini (Milieu neurobasal, 2% (v/v) de supplément B27, glutamine 2,5 mM (Invitrogen) et glutamate 25 µM) (Sigma-Aldrich). Les neurones sont maintenus en culture pendant 48 à 96 heures.

II.2. La lignée cellulaire CHO

La lignée cellulaire CHO est une lignée de cellules ovariennes de hamster chinois qui ont la propriété d'être facilement transfectables. Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu DMEM F12 (Dulbecco Modified Eagle's Medium) contenant 10% (v/v) de SVF (Invitrogen) à 37°C dans une atmosphère à 5% (v/v) de CO₂ et 90% (v/v) d'humidité.

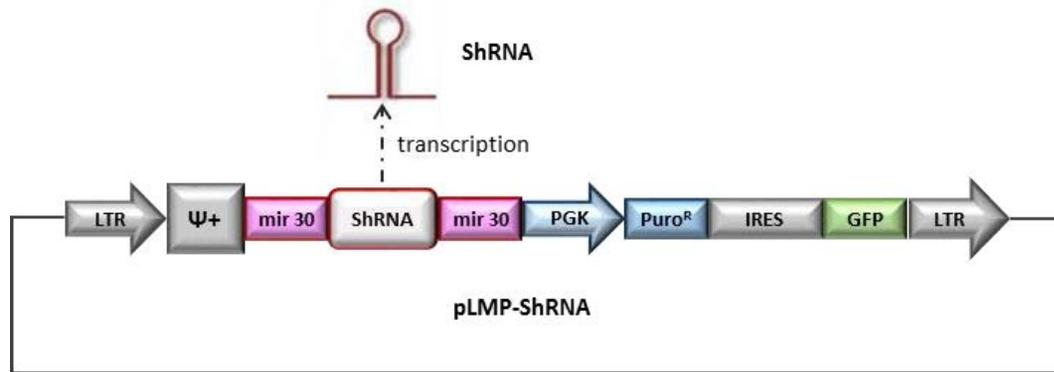


Figure 27: Schéma représentant le vecteur pLMP

Ce vecteur comporte des séquences 3' et 5' LTR qui bordent un signal d'encapsidation ($\Psi+$), les séquences mir30 encadrant le ShRNA, un promoteur PGK ainsi qu'un gène de résistance à la puromycine, une séquence IRES et un gène codant la GFP

Amorces	Séquences
shRNA TIMP-1	Sens 5'- TCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG GCACA GTGTTCCCTGTTTATTAGTGAAGCCACAGATGTAATAACAGG GAAACTGTGC ATGCCTACTGCCTCGG -3'
	Anti-sens 5'- AATCCGAGGCAGTAGGCAT GCACAGTGTTCCTGTTTAT TACATCTGTGGCTTCACTAATAACAGGGAAACTGTGC GCG CTCACTGTCAACAGCAATATACCTTC -3'
shRNA contrôle	Sens 5'- TCGAGAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCG CCAGTCGCCATT ATAATGCAATAGTGAAGCCACAGATGTTGCATTATAATGGCG ACTGTTGCCTACTGCCTCGG -3'
	Anti-sens 5'- AATCCGAGGCAGTAGGCA ACAGTCGCCATTATAATGCAA TACATCTGTGGCTTCACTATTGCATTATAATGGCGACTGGCG CTCACTGTCAACAGCAATATACCTTC-3'

Tableau VI: Séquence des oligonucléotides contenant le ShRNA TIMP-1

Les nucléotides complémentaires du shRNA TIMP-1 sont colorés en rouge et les nucléotides constituant la boucle sont colorés en vert

II.3. La lignée cellulaire MCF10A

La lignée MCF10A a été achetée auprès de l'*American Tissue Culture Collection* (MCF10A CRL-10317, ATCC, Molsheim, France). Il s'agit de cellules épithéliales mammaires saines immortalisées par culture prolongée (849 jours) en milieu faiblement concentré en calcium (Soule et al., 1990). Elles sont cultivées à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules par flasque de 75 cm² dans du milieu DMEM F12 contenant 10% (v/v) de sérum de cheval fœtal, glutamine 2 mM (Invitrogen), 5 µg/ml d'insuline, 0,5 µg/ml d'hydrocortisone, 2 ng/ml d'EGF et 0,1 µg/ml de toxine cholérique (Sigma-Aldrich) à 37°C en atmosphère humide et en présence de 5% (v/v) de CO₂.

II.4. La lignée cellulaire MCF10A déficiente en TIMP-1

La lignée MCF10A déficiente en TIMP-1 a été générée par transfection stable du vecteur pLMP contenant un shRNA dirigé contre l'ARNm du TIMP-1. Une lignée MCF10A exprimant un shRNA spécifique d'aucun ARNm humain a également été générée (Buache et al., 2011).

II.4.1. Clonage du shRNA dirigé contre le TIMP-1 dans le vecteur pLMP

Le vecteur d'expression utilisé pour exprimer le shRNA TIMP-1 et le shRNA contrôle est le vecteur pLMP (Buache et al., 2011). Il possède une séquence 5'-LTR contenant un promoteur permettant une expression constitutive du shRNA. La séquence permettant la formation du shRNA est bordée par des séquences identiques à celles du miRNA mir30. Ces séquences permettent d'augmenter l'efficacité du processus d'interférence ARN. On trouve également un promoteur P_{PGK} permettant l'expression d'un gène de résistance à la puromycine ainsi que d'une séquence IRES qui permet la traduction d'une GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Figure 27). De plus, ce vecteur possède une origine de répllication bactérienne et un gène de résistance à l'ampicilline pour permettre son amplification dans la souche *Escherichia coli*.

Deux oligonucléotides contenant la séquence du shRNA TIMP-1 et deux oligonucléotides contenant la séquence du shRNA contrôle ont été synthétisés par la société Eurogentec (Tableau VI). Chaque couple d'oligonucléotides est hybridé par incubation pendant 5 minutes à 100°C, puis 5 minutes à 70°C, 3 minutes à 37°C, et 10 minutes à 25°C dans un tampon "d'*annealing*" (Tris HCl 40 mM pH 7,5, MgCl₂ 20 mM, NaCl 50 mM). L'hybridation des deux oligonucléotides génère un ADN double brin présentant des extrémités cohésives XhoI et EcoRI aux extrémités gauche et droite respectivement.

Le vecteur pLMP est linéarisé par les enzymes de restriction EcoRI (Takara, distribué par Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) et Xho I (Takara) dans le tampon H 1X (Tris-HCl 50 mM (pH7.5), MgCl₂ 10 mM, Dithiothreitol 1 mM) (Takara). La ligation des oligonucléotides hybridés avec le vecteur linéarisé se fait dans un volume final de 10 µL avec un rapport vecteur-insert de 1:3. Le milieu réactionnel contient 5 unités de ligase T4 (Fermentas, distribué par Thermo scientific) et 1 µL de tampon de ligation 10X (Tris-HCl 400 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM (pH 7,8 à 25 °C) (Fermentas). Après 1 heure d'incubation à 22°C, la ligase est inactivée pendant 10 minutes à 65°C. Les plasmides pLMP contenant le shRNA TIMP-1 ou le shRNA contrôle sont transformés dans des bactéries DH5α rendues compétentes au laboratoire. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB solide en présence d'ampicilline (50 µg/ml) après une incubation d'une nuit à 37°C. Les colonies sont ensuite repiquées sur boîte quadrillée numérotée afin d'analyser les différents clones obtenus.

II.4.2. Transfection stable et sélection

Les cellules MCF10A sontensemencées dans une plaque 6 puits à raison de 2,5.10⁵ cellules par puits et incubées pendant 18 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite transfectées avec le plasmide pLMP shRNA TIMP-1 ou shRNA Contrôle à l'aide de lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec un rapport lipofectamine/ADN de 5:2. Ainsi, deux microgrammes d'ADN plasmidique sont dilués dans 250 µL d'Opti-MEM (Life Technologies) et 5 µL de Lipofectamine 2000 sont dilués dans 250 µL d'Opti-MEM. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante l'ADN est ajouté à la Lipofectamine pour permettre la formation des complexes ADN/lipofectamine puis la solution est incubée 20 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté délicatement dans chaque puits. Après 48 heures d'incubation à 37°C, le milieu de culture est remplacé par du milieu DMEM F12 contenant 10% (v/v) de SCF, glutamine 2 mM (Invitrogen), 5 µg/mL d'insuline, 0,5 µg/mL d'hydrocortisone, 2 ng/mL d'EGF, 0,1 mg/mL de toxine cholérique (Sigma-Aldrich) et 0,5 µg/mL de puromycine. Ce milieu permet de sélectionner les cellules MCF10A ayant incorporé le plasmide dans leur génome et exprimant ainsi de façon stable le shRNA TIMP-1 ou contrôle. Les cellules sont maintenues en culture dans ce même milieu à raison de 5.10⁶ cellules par flasque de 75 cm², à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5% (v/v) de CO₂.

II.5. La lignée cellulaire CHO surexprimant CD63

La lignée CHO surexprimant la glycoprotéine CD63 a été générée par transfection stable du vecteur pQCXIP contenant l'ADNc complet du gène humain de CD63.

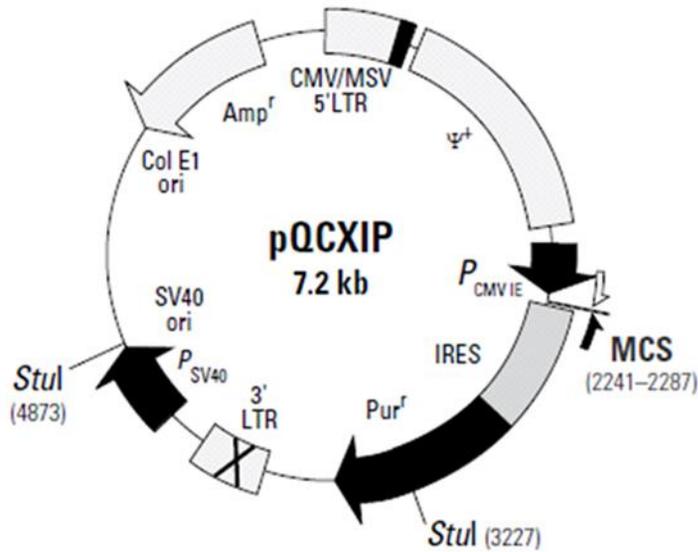


Figure 28: Schéma du vecteur pQCXIP.

Ce vecteur comporte des séquences 3' et 5' LTR qui bordent un signal d'encapsidation (Ψ^+), un promoteur de type CMV (P_{CMV}), une cassette de clonage (MCS), une séquence IRES et un gène de résistance à la puromycine ($Puro^r$). Il contient également une origine de réplication bactérienne (col E1 ori) et un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r).

Amorces	Séquences
Sens	5'-ATATAGATCTAGGCCCGGCAGCCAT-3'
Anti-sens	5'-ATATCAATTGATGGTGATGGTGATGGTGCATCACCTCGTA-3'

Tableau VII: Séquence des amorces utilisées pour le clonage de la glycoprotéine CD63 dans le vecteur pQCXIP

Les sites de restriction pour les enzymes BglII et MfeI sont représentés en bleu et vert respectivement. La séquence permettant de coder 6 histidines à l'extrémité C-terminale de la protéine est représentée en rouge

II.5.1. Clonage du CD63 dans le vecteur pQCXIP

Le vecteur d'expression utilisé pour exprimer la protéine CD63 est le vecteur rétroviral pQCXIP (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) d'origine eucaryote qui possède la capacité de se répliquer dans les bactéries. Il possède une séquence LTR (*Long Terminal Repeat*) permettant une expression constitutive des gènes en aval de ce promoteur, tel que le gène codant le signal d'encapsulation. Il possède également un promoteur CMV en amont d'un site multiple de clonage permettant l'insertion du gène à surexprimer. Ce promoteur permet une expression constitutive forte du transgène ainsi que l'expression d'un gène de résistance à la puromycine localisé en aval d'une séquence IRES. Enfin, ce vecteur possède une origine de réplication bactérienne ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline permettant respectivement son amplification et sa sélection dans la souche bactérienne *E. coli* (Figure 28).

La séquence de l'ADNc de CD63 a été obtenue *via* un vecteur commercial (Bioscience LifeSciences, Cambridge, Grande-Bretagne). Elle a été amplifiée par PCR à l'aide du couple d'amorce présenté dans le Tableau VII permettant l'ajout de sites de restriction MfeI et BglII de part et d'autre de l'ADNc et l'ajout d'un tag 6 Histidines à l'extrémité C-terminale de la protéine mature. Le volume réactionnel final de 20 μ L contenait 1 ng d'ADN plasmidique, 1 μ M de chaque amorce (Eurogentec), 4 μ L de tampon High Fidelity 5X (Finnzymes, distribué par Fisher scientific, Illkirch, France), 500 mM dNTP, et 0,4 unité d'ADN polymérase de type Phusion (Finnzymes). Le premier cycle est composé de 30 secondes de dénaturation à 98°C, puis de 30 secondes d'hybridation à 55°C. La polymérisation se fait pendant 1 minute 30 à 72°C. Ce cycle est répété 24 fois. Enfin, un dernier cycle de 5 minutes à 72°C est réalisé de façon à permettre l'élongation de tous les brins d'ADN partiellement synthétisés.

Les produits de PCR sont analysés et séparés sur gel d'agarose à 1% (p/v) dans le tampon TBE 0,5 X contenant 0,5 μ g/mL de BET. La taille des produits de PCR est évaluée à l'aide des marqueurs de taille (100 pb DNA ladder plus, GR3, Euromedex, Souffelweyersheim, France). La bande d'intérêt à 735 pb est découpée et purifiée par chromatographie échangeuse d'anions à l'aide d'un kit de purification *Nucleospin extract II* selon le protocole du fournisseur. Cette séquence est ensuite digérée par l'enzyme BglII (Takara) dans le tampon H 1X (Tris-HCl 50 mM (pH7,5), MgCl₂ 10 mM, Dithiothreitol 1 mM, NaCl 100 mM) (Takara) pendant 45 minutes à 37°C. Après purification, une seconde digestion est réalisée avec l'enzyme MfeI (New England Biolabs, Evry, France) dans le tampon CutSmart 1X (Potassium Acetate 50 mM, Tris-acetate 20 mM, Magnesium Acetate 10 mM, 100 μ g/ml BSA, pH 7.9) (New England Biolabs) pendant 45 minutes à 37°C. Le vecteur pQCXIP est linéarisé par les enzymes EcoRI (Takara) et BamHI (Takara) dans le tampon K 1X (Tris-HCl 20 mM (pH8.5), MgCl₂ 10 mM, dithiothreitol 1 mM, KCl 100 mM) (Takara), pendant 1 heure à 37°C.

Amorces		Séquences
F12 -> A12	Sens	5'-CCACCCACAGACGGCC GC CTGCAATCCGACCTCG -3'
	Anti-sens	5'- CGAGGTCGGAATTGCAG GC GGCCGTCTGTGGGTGG -3'
K47 -> A47	Sens	5'- GATGACCAAGATGTAT GC AGGGTTCCAAGCCTTAGGG -3'
	Anti-sens	5'- CCCTAAGGCTTGAACCCT GC ATACATCTTGGTCATC -3'
W105 -> A105	Sens	5'- GCAGTTTTGTGGCTCCC GC GAACAGCCTGAGCTTAGC -3'
	Anti-sens	5'- GCTAAGCTCAGGCTGTTC GC GGGAGCCACAAAAGTGC -3'
T2 -> G2	Sens	5'- CAGCAGGGCCTGC GG CTGTGTCCCACCC -3'
	Anti-sens	5'- GGGTGGGACACAG CC GCAGGCCCTGCTG -3'

Tableau VIII: Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée

Les nucléotides permettant de substituer la phénylalanine 12, la lysine 47 et le tryptophane 105 par des alanines sont représentés en rouge

Après purification des produits de digestion, la séquence du CD63 est insérée par ligation dans le vecteur pQCXIP. La ligation a lieu dans un volume final de 10 μ L contenant un rapport vecteur-insert de 1 : 3, 5 unités de ligase T4 (Fermentas) et 1 μ L de tampon de ligation (Fermentas). Après une incubation d'une nuit à 4°C, la ligase est inactivée 5 minutes à 70°C et les produits de ligation sont digérés par les enzymes EcoRI et BamHI (Takara) dans le tampon K 1X (Takara) pendant 1 heure à 37°C afin de linéariser les vecteurs refermés sur eux-mêmes. Après inactivation de ces enzymes par chauffage pendant 15 minutes à 65°C, une transformation par choc thermique des produits de ligation est réalisée dans les bactéries DH5 α rendues compétentes au laboratoire. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB solide en présence d'ampicilline (50 μ g/ml) une nuit à 37°C. Les colonies sont ensuite repiquées sur boîte quadrillée numérotée afin d'analyser les différents clones obtenus. Chaque clone est ensuite séquencé par la société Beckman Coulter Genomics (Tekeley, Royaume-Uni) afin de vérifier la présence du cDNA de CD63 dans le vecteur PQCXIP ainsi que l'absence de mutation.

II.5.2. Transfection stable et sélection

Les cellules CHO sontensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 2.10^5 cellules par puits dans 2 mL de milieu DMEM F12 contenant 10% (v/v) de SVF (Invitrogen). Les cellules sont transfectées à l'aide de lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec un rapport lipofectamine/ADN 5:2. Le protocole utilisé est identique à celui décrit pour les cellules MCF10A (cf II.4.2). Les cellules sont sélectionnées pendant 15 jours dans le milieu DMEM F12 contenant 10% (v/v) de SVF et 0,5 μ g/mL de puromycine (Sigma-Aldrich). Les cellules sont maintenues en culture dans ce milieu à 37°C, en atmosphère humide et en présence de 5% (v/v) de CO₂.

III. Production et purification du TIMP-1 et de ses mutants

III.1. Mutagenèse dirigée

Les quatre mutants du TIMP-1 (F12A, K47A, W105A et T2G) ont été générés par mutagenèse dirigée à partir de l'ADNc du TIMP-1 contenu dans le vecteur pCMV6-TIMP-1 commercialisé par la société Origene (distribué par Clinisciences, Nanterre, France). La mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du kit *Quick change II Site directed mutagenesis* (Agilent technologies, Les Ulis, France) selon le protocole fourni par le fabricant. Les différentes amorces utilisées pour réaliser les mutations sont présentées dans le Tableau VIII. Les vecteurs pCMV6-TIMP-1 contenant les différents mutants ont été séquencés par la société Beckman Coulter Genomics afin de vérifier la présence des mutations.

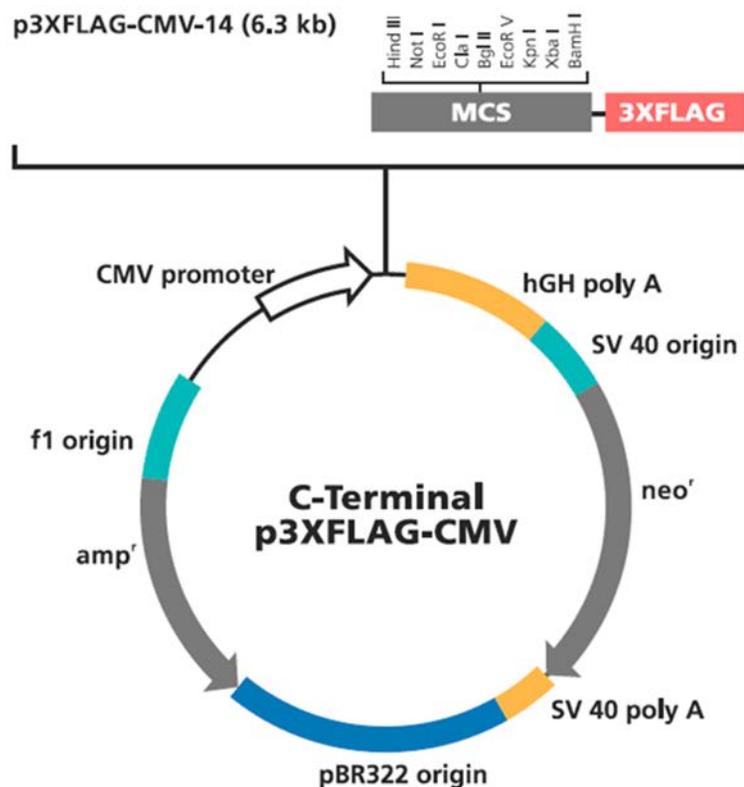


Figure 29: Schéma représentant le vecteur p3XFLAG-CMV-14.

Ce vecteur comporte une origine de réplication f1 (*f1 origin*), et un promoteur de type CMV (*CMV promoter*) en amont du site multiple de clonage (MCS). La séquence codant pour le tag 3XFLAG est retrouvée en aval du MCS. Le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^R) permet de réaliser une sélection en milieu procaryote, et le gène de résistance à la néomycine (neo^R) permet une sélection en milieu eucaryote.

Amorces	Séquences
Sens	5'-TACAGAATTCCACCATGGCCCC-3'
Anti-sens	5'-GAGAGCTAGCGGCTATCTGGGACC-3'

Tableau IX: Séquence des amorces utilisées pour le clonage du TIMP-1 et des mutants dans le vecteur p3XFLAG CMV14

Les sites de restriction pour les enzymes EcoRI et NheI sont représentés en bleu et vert respectivement. L'ATG est représenté en rouge.

III.2. Clonage dans le vecteur p3XFLAG CMV14

Le vecteur d'expression choisi pour exprimer le TIMP-1 et ses mutants est le vecteur d'expression p3XFLAG-CMV-14 (Sigma-Aldrich). Ce vecteur de 6,3 kb possède une origine de réplication bactérienne ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline permettant respectivement son amplification et sa sélection dans la souche bactérienne *E. coli*. Ce vecteur possède un promoteur de type CMV en amont du site d'insertion du transgène ce qui permet une forte expression de celui-ci dans des cellules eucaryotes. Il possède également un gène de résistance à la néomycine permettant d'exercer une pression de sélection et de favoriser son intégration dans le génome des cellules eucaryotes et ainsi de générer des cellules stablement modifiées. Enfin, le vecteur p3XFLAG-CMV-14 possède trois séquences en tandem en aval du site multiple de clonage et codant la séquence en acides aminés suivante : D-Y-K-D-H-D-D-Y-K-D-H-D-D-Y-K-D-D-D-D. Lorsque le cadre de lecture est conservé, cette séquence de 2,73 kDa appelée "tag" 3XFLAG est fusionnée à l'extrémité C-terminale de la protéine codée par le transgène (Figure 29).

L'ADNc du TIMP-1 sauvage et des différents mutants contenus dans le vecteur pCMV6-TIMP-1 ont été amplifiées par PCR à l'aide d'amorces dégénérées afin d'introduire des sites de restriction compatibles avec le site multiple de clonage du vecteur (Tableau IX).

Le volume réactionnel final (20 μ L) de la PCR comporte 4 μ L de tampon High Fidelity 5X (Finnzymes, distribué par Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France), 10 mM de dNTPs, 0,5 μ M de chacune des 2 amorces (Eurogentec, Angers, France), 1 ng d'ADN plasmidique et 0,02 U/ μ L d'ADN polymérase haute-fidélité de type Phusion (Finnzymes). La PCR est composée d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, puis de 23 cycles comprenant 10 secondes de dénaturation à 98°C et 30 secondes d'hybridation/polymérisation à 72°C. Une extension finale de 5 minutes à 72°C est réalisée. Les produits PCR sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% (p/v) dans le tampon TBE 0,5X (Tris 45 mM, Acide borique 45 mM, EDTA 1 mM pH8) contenant 0,5 μ g/ml BET. La taille des produits de PCR est évaluée à l'aide d'un marqueur de tailles (100 pb DNA ladder plus, GR3, Euromedex, Souffelweyersheim, France).

Les séquences amplifiées sont ensuite purifiées par chromatographie échangeuse d'anions à l'aide d'un kit de purification *Nucleospin Extract II* (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) selon le protocole fourni par le fabricant. Ces séquences sont digérées dans le tampon Multicore 1X (Tris-acétate 25 mM, pH 7,5 à 37°C, acétate de potassium 100 mM, acétate de magnésium 10 mM, DTT 1 mM) (Promega, Charbonnières-les-bains, France) pendant 1h à 37°C par les couples d'enzymes de restriction EcoRI et NheI. En parallèle, le vecteur p3XFLAG-CMV-14 est linéarisé par digestion avec les enzymes EcoRI et XbaI (Promega) dans le tampon Multicore 1X (25 mM Tris-acétate, pH 7,5 à 37°C, acétate de potassium 100 mM, acétate de magnésium 10 mM, DTT 1 mM). Après purification des produits de digestion, les séquences sont insérées par ligation dans le vecteur p3XFLAG-CMV-14.

La réaction a lieu dans un volume final de 10 μ L contenant un rapport vecteur-insert de 1:3, 5 U de ligase T4 (Fermentas, distribué par Thermo Fisher Scientific) et 1 μ L tampon de ligation 10X (Tris-HCl 400 mM, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 5 mM (pH 7,8 à 25°C) (Fermentas). Après une incubation d'une nuit à 4°C, la ligase est inactivée pendant 5 minutes à 70°C et les produits de ligation sont digérés par l'enzyme XbaI (Promega) dans le tampon Multicore 1X (Promega) pendant 1h à 37°C pour linéariser les vecteurs refermés sur eux-mêmes. Après inactivation de l'enzyme par chauffage 15 minutes à 65°C, une transformation par choc thermique des produits de ligation est réalisée dans des bactéries DH5 α rendues compétentes au laboratoire. Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB solide (Lysogeny Broth : 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levures, 5 g/L de NaCl, 18 g/L agar) en présence d'ampicilline (50 μ g/ml) une nuit à 37°C. Les colonies sont ensuite repiquées sur boîte quadrillée numérotée afin d'analyser les différents clones obtenus.

L'analyse des différents clones est réalisée à partir de cultures bactériennes de clones positifs. L'ADN plasmidique est extrait grâce au kit NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel) selon le protocole du fournisseur. L'ADN plasmidique est ensuite digéré 1 h à 37°C par le couple d'enzymes BamHI et HindIII (Promega) dans le tampon E 1X (Tris HCl 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 7,5) (Promega) afin d'extraire les inserts. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v). Les clones présentant les profils électrophorétiques attendus ont été séquencés par la société Beckman Coulter Genomics.

III.3. Production et purification du TIMP-1 et des mutants

Les cellules CHO sont ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 2.10^5 cellules par puits dans 2 mL de milieu DMEM F12 contenant 10% (v/v) de SVF (Invitrogen). Les cellules sont transfectées avec les différents vecteurs à l'aide de lipofectamine 2000 (Invitrogen) en utilisant un rapport lipofectamine/ADN de 5:2. Le protocole utilisé est identique à celui décrit pour les cellules MCF10A (Cf. Matériel et Méthodes II.4.2). Les cellules sont sélectionnées pendant 15 jours dans le milieu DMEM F12 contenant 10% (v/v) de SVF (Invitrogen) et 0,5 μ g/mL de néomycine (Sigma-Aldrich).

Les cellules CHO exprimant de façon stable le TIMP-1 et les mutants sont mises en culture pendant 48 heures en boîte de 150 cm² à raison de 1.10^7 cellules par boîte dans le milieu DMEM F12 supplémenté avec 10% (v/v) de SVF et 0,5 μ g/mL de néomycine. Après trois lavages avec du tampon PBS (KH₂PO₄ 1,7 mM, KCl 2,6 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM), le milieu de culture est remplacé par 20 ml de milieu DMEM F12 sans SVF. Après 48h d'incubation, le milieu est récupéré puis centrifugé (10 000 g, 4°C, 20 minutes). Le surnageant est récupéré, son pH est ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution d'HCl 5 N et d'EDTA 10 mM sont ajoutés afin de dissocier les complexes MMPs : TIMPs (Murphy et al., 1989). Après une incubation d'1 h à 37°C, le pH est ajusté à 7,4 à l'aide d'une solution de NaOH 5 N. Le TIMP-1 ainsi que les mutants sont purifiés par chromatographie d'affinité grâce à la résine *ANTI-FLAG M2 Affinity gel* (Sigma-Aldrich) composée de billes d'agarose sur lesquelles sont fixées des IgG murines anti-FLAG.

La capacité protéique de la résine est de 0,6 mg/mL. La résine est tout d'abord lavée 3 fois avec la solution de glycine 0,1 M pH 3,5, puis équilibrée par 3 lavages successifs avec du tampon TBS (Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Les milieux équilibrés à pH 7,4 (20 mL) sont incubés avec 100 µL de résine sous agitation pendant 3h à 4°C. Après centrifugation (1 000 g, 4°C, 1 minute), la résine est lavée cinq fois avec du tampon TBS. L'élution du TIMP-1 et des mutants est réalisée par choc acide en ajoutant 2 mL de solution de glycine 0,1 M pH 3,5. Après centrifugation (1 000 g, 4°C, 1 minute), le surnageant est récupéré et placé dans un tube contenant 50 µL de solution Tris (Tris 1M, pH 8) afin de rétablir le pH à 7,4.

Selon la concentration protéique et le tampon dans lequel les protéines sont éluées, les protéines purifiées sont concentrées et/ou dialysées. La concentration est réalisée par centrifugation sur Vivaspin avec une membrane possédant un seuil de coupure de 10 kDa (Sartorius, Aubagne, France). La dialyse est réalisée à l'aide de cassettes (membrane avec pores de 10 kDa) (Life Technologies) avec des bains de PBS permettant l'échange de tampon.

III.4. Quantification du TIMP-1 et évaluation du taux de pureté

La quantification des protéines purifiées est réalisée à l'aide d'un kit Elisa *Quantikine Human TIMP-1* dirigé contre le domaine C-terminal du TIMP-1, invariant entre les mutants (R&D Systems, Minneapolis, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. La concentration protéique des échantillons est ajustée entre le TIMP-1 sauvage et les variants.

Afin d'évaluer l'homogénéité et la pureté des protéines purifiées, une coloration au nitrate d'argent est réalisée sur gel de polyacrylamide (12,5%) en conditions dénaturantes. Le gel est placé une nuit dans une solution de fixation (50% (v/v) éthanol, 10% (v/v) acide acétique). Différents lavages de 10 minutes sont réalisés. Un 1er lavage dans une solution contenant 50% (v/v) éthanol, 5% (v/v) acide acétique et 2% (p/v) chlorure de cuivre, un 2ème lavage avec la solution composée de 10% (v/v) éthanol et 5% (v/v) acide acétique, un 3ème lavage avec une solution composée de 0,001% (p/v) KMnO₄, un 4ème lavage avec la solution composée de 10% (v/v) éthanol et 5% (v/v) acide acétique, puis un dernier lavage avec la solution composée de 10% (v/v) éthanol. Le gel est ensuite rincé avec la solution composée de 10% (v/v) éthanol et 5% (v/v) acide acétique, puis incubé 10 minutes à l'obscurité dans une solution d'AgNO₃ (0,1% p/v), rincé à l'eau distillée, placé 1 minute dans une solution de 10% (p/v) K₂CO₃ et révélé à l'aide d'une solution contenant 2% (p/v) K₂CO₃ et 0,2% (p/v) formaldéhyde. La révélation est stoppée par incubation dans la solution composée de 10% (v/v) éthanol et 5% (v/v) acide acétique.

	Dirigé contre	Clone	Espèce	Dilution	Fournisseur
primaires	TIMP-1	7-6C1	Souris	1 : 1 000	Merck Millipore
	TIMP-1	polyclonal	Lapin	1 : 1 000	Merck Millipore
	FLAG	M2	Souris	1 : 3 000	Sigma-Aldrich
	FLAG	SIG1-25	Lapin	1 :3 000	Sigma-Aldrich
	LRP-1	8G1	Souris	1 µg/ml	Merck Millipore
	pro-MMP-9	polyclonal	Lapin	1 : 1 000	Sigma-Aldrich
	CD63	RFAC4	Souris	1 : 1 000	Merck Millipore
	actine	polyclonal	Chèvre	1 : 1 000	Santa-Cruz
secondaires	IgG Souris	Ref 7076S	Cheval	1 : 10 000	Cell Signaling
	IgG Lapin	Ref 7074 S	Chèvre	1 : 10 000	Cell Signaling
	IgG Chèvre	Ref 5420	Lapin	1 : 5 000	Sigma-Aldrich

Tableau X: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunoempreintes

IV. Etude de l'expression protéique par immunoempreinte

IV.1. Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont lavées une fois avec du tampon PBS puis lysées dans le même tampon contenant 1% (v/v) Triton X-100 ou 1% (v/v) Chaps, glycérophosphate 80 mM, EGTA 50 mM (*ethylene glycol tetraacetic*), MgCl₂ 15 mM et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma) dilué au 1 : 500^e. Le lysat cellulaire est incubé 20 minutes à 4°C et agité toutes les 5 minutes au vortex puis centrifugé (20 000 g, 30 minutes, 4°C). Le surnageant est ensuite récupéré et conservé à -20°C avant analyse. Les échantillons protéiques sont dosés selon la méthode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad, Marne la Coquette, France) ou selon la méthode de Lowry après précipitation des protéines solubilisées par le Chaps (kit *RCDC™ protein assay*, Bio-Rad).

IV.2. Electrophorèse et immunoempreinte

Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes puis déposés à quantités égales dans un gel de polyacrylamide (10% ou 12,5%) en conditions dénaturantes et réductrices (SDS-PAGE). Après migration 1 heure 30 à 100 V dans le tampon de migration (Tris Base 0,02 M, Glycine 0,2 M, 0,1% (p/v) SDS), les protéines sont transférées (70 V, 1h30) sur une membrane de nitrocellulose (Whatman Protran, Kent, UK) dans le tampon de transfert (20 % (v/v) éthanol, Tris 25 mM, glycine 192 mM). La membrane est ensuite saturée durant 1 heure à température ambiante dans la solution de blocage composée de 5% (p/v) de lait dégraissé dilué dans du tampon TBS-T (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; 0,1% (v/v) Tween), puis incubée avec l'anticorps primaire (Tableau X) dans la solution de blocage pendant 12 heures à 4°C. Après 5 lavages de 5 minutes avec du tampon TBS-T, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires (Tableau X) couplés à la peroxydase de Raifort et dilués au 1/10 000^e dans la solution de blocage. Les protéines sont révélées par chimioluminescence avec le kit Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) et mises en évidence à l'aide de l'Odyssey Fc (Licor, distribué par Eurobio, Courtaboeuf, France).

V. Etude de l'activité de certaines MMPs en présence d'inhibiteurs

L'activité inhibitrice de MMPs du TIMP-1 et de ses mutants est déterminée à l'aide d'une cinétique enzymatique en présence de différentes MMPs et de leur substrat fluorogénique. Les MMP-1 (2 nM), -2 (0,76 nM) ou -9 (0,3 nM) actives (Calbiochem), ainsi que les domaines catalytiques de la MMP-3 (2,3 nM) (Calbiochem) et de la MT1-MMP (0,3 nM) (Enzo Life Science) sont incubées pendant 3 heures à 27°C avec des concentrations croissantes de TIMP-1 sauvage ou des différents mutants (de 0,14 à 30,4 nM) dans le tampon Tris-test (Tris 50 mM , NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM) pour un volume final de 200 µL.

Substrat	Séquence	$\lambda_{\text{excitation}}$	$\lambda_{\text{émission}}$
MMP-1/-9	DNP - Pro - Cha - Gly - Cys (Me) - His - Ala - Lys (N-Me-Abz) - NH ₂	365 nm	450 nm
MMP-2/-7	MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH ₂ -TFA	325 nm	393 nm
MMP-3	NBD-Arg-Pro-Lys-Pro-Leu-Ala-Nva-Trp-Lys(DMC)-NH ₂	350 nm	465 nm
MT1-MMP	MCA-Pro-Leu-Ala-Cys-MeOBzl-Trp-Ala-Arg-DNP-Dap-NH ₂	325 nm	392 nm

Tableau XI: Substrats spécifiques des MMPs utilisés pour les tests fluorimétriques

Substrats MMP-1/-9, MMP-2/-7 et MMP-3 (Calbiochem) et substrat MT1-MMP (Sigma-Aldrich)

Les substrats fluorogéniques spécifiques de chacune des MMPs (tableau XI) sont ensuite ajoutés à des concentrations variables (2,5 à 5 μ M).

La dégradation du substrat fluorogénique est suivie à l'aide d'un lecteur de plaques (Tecan Infinite F200 PRO) en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques à chaque substrat. Afin d'être dans des conditions de vitesse initiale (V_i), une mesure est réalisée toutes les minutes sur une période de 20 minutes. La représentation de Michaelis-Menten ($V = f([S])$) est réalisée avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, USA) afin de déterminer les valeurs de V_{max} et de K_m grâce à l'équation de Michaelis-Menten : $V_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$. Le TIMP-1 étant un inhibiteur compétitif, les K_i sont déterminés par mesure de la vitesse initiale (V_i) en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs $[I]$ et en utilisant l'équation de Morrison: $V_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$ (Kakkar et al., 1999). Les représentations graphiques de l'équation de Morrison ainsi que les constantes d'inhibition K_i sont déterminées à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

VI. Etude des interactions protéine-protéine *in vitro*

VI.1. Etude de l'interaction TIMP-1 / LRP-1

VI.1.1. Résonance plasmonique de surface

Les mesures de résonance plasmonique de surface ont été réalisées au sein de la plateforme Centre d'Analyse Protéomique de Marseille (CAPM-Biocapteurs) du Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille (CR2N) UMR 7286. L'appareil utilisé pour réaliser ces mesures est le Biacore T200. Le tampon utilisé pour les différentes injections est le tampon HBS-N (Hepes–NaOH 50mM pH7,4, NaCl 150mM, tween 0,005%)

La puce CMD500M (Xantec, Dusseldorf, Allemagne) a été fonctionnalisée par couplage chimique de l'anticorps anti-Fc (Jackson ImmunoResearch, distribué par Interchim, Montluçon, France). Le niveau de couplage de l'anticorps sur les 4 pistes d'analyses est de l'ordre de 17000-18000 RU. Les domaines DII et DIV de LRP-1 possédant un tag Fc (R&D systems) sont immobilisés de façon orientée sur la biopuce. Les analytes sont injectés en cinétique multi cycle, correspondant à l'injection successive de différentes concentrations d'analytes avec un temps de dissociation entre chaque injection. Les analytes testés sont le TIMP-1 (wt) ainsi que les différents mutants. L'EGF (Sigma-Aldrich) est utilisé en tant que témoin négatif d'interaction car il n'interagit pas avec les domaines DII et DIV de LRP-1 (Loukinova et al., 2002). Des gammes de concentration croissantes (5-160 nM) sont injectées successivement sur les deux domaines de LRP-1, en les laissant se dissocier suffisamment longtemps après chaque injection. Les constantes de dissociation K_D sont déterminées.

VI.1.2. Immunoprécipitation

30 µL de résine M2 anti FLAG (Sigma-Aldrich) sont lavés 3 fois avec du tampon PBS puis incubés 1 heure avec du PBS supplémenté avec 0,01% (p/v) de BSA. Le TIMP-1 sauvage ou les mutants (350 ng) possédant un Tag 3XFLAG à l'extrémité C-terminale (cf partie III.) sont fixés à la résine par une incubation pendant 3 heures à 4°C sous agitation douce dans un volume final de 500 µL de PBS. La résine est ensuite lavée 3 fois avec du tampon PBS.

Les neurones corticaux d'embryons de souris sont lavés avec du tampon PBS puis lysés dans ce même tampon supplémenté avec 1% (v/v) Triton X-100, Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM et avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma) dilué au 1 : 500^e. Le lysat cellulaire est incubé 20 minutes à 4°C, agité toutes les 5 minutes au vortex puis centrifugé (20 000 g, 30 minutes, 4°C). Le surnageant est récupéré et les protéines totales sont dosées selon la méthode de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad).

La résine est incubée pendant 12 heures à 4°C avec 500 µg d'extraits protéiques de neurones corticaux sous agitation douce. Trois lavages au PBS supplémenté avec 0,1% (p/v) de Triton X-100 sont ensuite réalisés. Les complexes protéiques sont élués dans du tampon de Laemmli 2X (Tris HCl 50 mM pH 6,8, 10 % (v/v) glycérol, 0,001 % (p/v) bleu de bromophénol, 2 % (p/v) SDS, 20 % (v/v) β-mercaptoéthanol). Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse puis analysés par immunoempreintes à l'aide d'anticorps anti-TIMP-1, anti-FLAG et anti-LRP-1.

VI.2. Etude de l'interaction TIMP-1 / pro-MMP-9 par immunocapture

Le TIMP-1 sauvage ou les mutants (350 ng) sont fixés à la résine M2 anti FLAG (Sigma-Aldrich) par incubation pendant 3 heures à 4°C. 250 ng de pro-MMP-9 recombinante humaine (Calbiochem, Fontenay sous Bois, France) sont ajoutés à la résine puis incubés sous agitation douce pendant 12 heures à 4°C. Trois lavages au PBS supplémenté avec 0,1% (p/v) de Triton X-100 sont réalisés. Les complexes protéiques sont élués dans du tampon de Laemmli 2X. Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse puis analysés par immunoempreintes à l'aide d'anticorps anti-TIMP-1, anti-FLAG et anti-pro-MMP-9.

VI.3. Etude de l'interaction TIMP-1/CD63 par immunoprécipitation

Les cellules de la lignée cellulaire CHO surexprimant CD63 (Cf. Matériel et Méthodes II.5) sont ensemencées à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits pendant 48 heures dans du milieu DMEM F12 supplémenté avec 10% (v/v) de SVF et 0,5 µg/mL puromycine. Les cellules sont ensuite grattées dans le tampon TEM (Tris 75 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 12 mM, pH 7,5) puis lysées par sonication (3 pulses de 30 secondes). Les lysats cellulaires

Nom du peptide	Séquence
EDI	N ter – VGAQLVLSQTIIQGATPGS – C ter
EDI 6HIS	N ter – HHHHHHVGAQLVLSQTIIQGATPGS – C ter
Scramble	N ter – TISLIPALVQGSVGQTAQG – C ter
Scramble 6HIS	N ter – HHHHHHTISLIPALVQGSVGQTAQG – C ter
P1	N ter – VGAQLVLSQ – C ter
P2	N ter – VLSQTIIQG – C ter
P3	N ter – TIIQGATPGS – C ter
EDI a	N ter – HHHHHHVGAQLVLSQAAAAAATPGS – C ter

Tableau XII: Peptides générés par synthèse chimique pour étudier l'interaction du TIMP-1 avec le domaine EDI de CD63

sont incubés pendant 3 heures à 4°C sous agitation faible en présence de 1% (p/v) CHAPS (Sigma-Aldrich) afin de solubiliser le CD63. Les extraits protéiques sont ensuite centrifugés (20 000 g, 4°C, 20 minutes), les surnageants sont récupérés et la concentration en protéines est déterminée par la méthode de Lowry à l'aide du kit RCDC (Bio-Rad). Les extraits sont dilués dans du tampon NaH₂PO₄ 20 mM pH 8 afin d'avoir une concentration protéique de 1 mg/mL.

20 µL de billes NiNTA (Qiagen) sont lavées 3 fois avec le tampon NaH₂PO₄ 20 mM pH 8 (1 000 g, 1 minute, 4°C). Les billes sont laissées pendant 10 minutes dans le dernier lavage. 500 µL d'extraits protéiques (500 µg de protéines) sont incubés avec les billes pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite centrifugées (1 000 g, 1 minute, 4°C) puis lavées trois fois avec le tampon NaH₂PO₄ 20 mM pH 8 contenant 20 mM d'imidazole.

Le TIMP-1 sauvage ou muté (200 ng) est ajouté aux billes dans 500 µL de tampon NaH₂PO₄ 20 mM pH 8 contenant 20 mM d'imidazole puis incubés une nuit à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon NaH₂PO₄ 20 mM pH 8 contenant 50 mM d'imidazole afin d'éliminer les interactions non-spécifiques sur les billes NiNTA. L'élution des complexes protéiques formés se fait par ajout sur les billes de 40 µL de tampon de Laemmli 2X. Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse puis analysés par immunoempreintes à l'aide d'anticorps anti-CD63, anti-TIMP-1 ou anti-FLAG.

VI.4. Etude de l'interaction TIMP-1/Domaine extracellulaire I (EDI) de CD63

VI.4.1. Synthèse du domaine extracellulaire 1 (EDI)

Le domaine extracellulaire I (EDI) de CD63 correspond à une séquence de 19 acides aminés (Uniprot n°P08962) : Nt – VGAQLVLSQTIIQGATPGS – Ct. Cette séquence ainsi que des séquences tronquées, mutées et aléatoires dérivées de la séquence du domaine EDI ont été synthétisées par la société Genecust (Dudeland, Luxembourg) (Tableau XII). Certains peptides ont également été synthétisés avec 6 histidines supplémentaires à l'extrémité N-terminale. La synthèse de ces peptides a été réalisée selon la méthode Fmoc permettant la protection de la fonction amine lors de l'étape de liaison du 1^{er} acide aminé à la résine, *via* son domaine C-terminal. Le groupement protecteur Fmoc a ensuite été éliminé avant le couplage des acides aminés. Le taux de pureté des peptides est évalué par HPLC et ce dernier est supérieur à 95%.

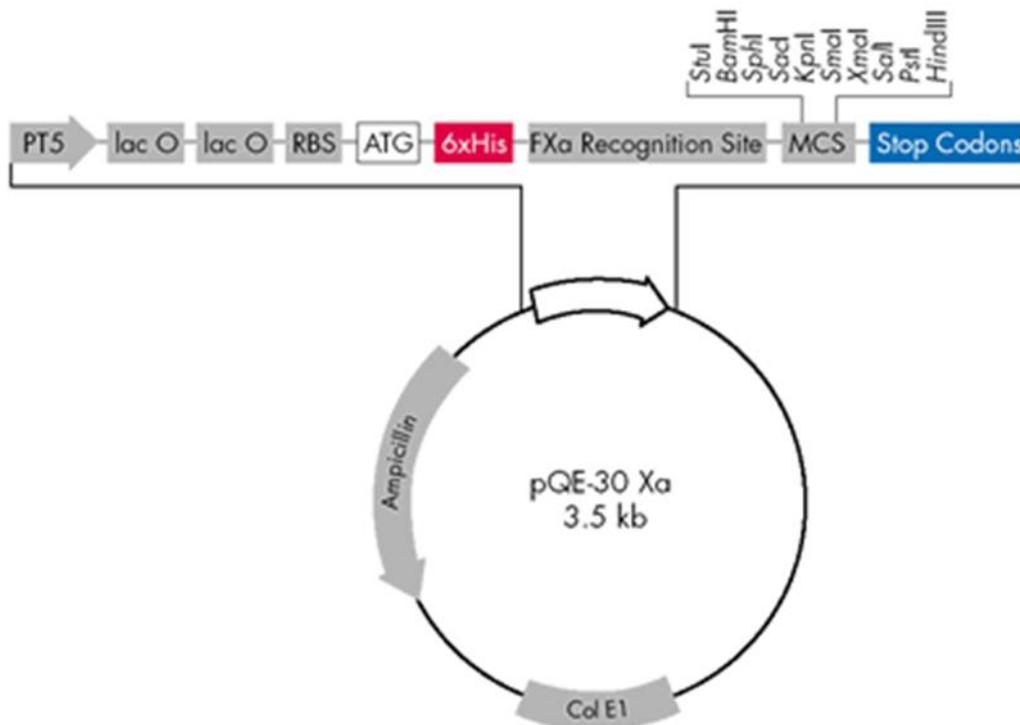


Figure 30: Schéma du vecteur pQe30

Ce vecteur comporte un site de liaison pour les ribosomes (RBS), un codon initiateur en amont d'une séquence codant pour 6 histidines (6xHis) suivie d'un site de reconnaissance pour le Facteur Xa (*FXa Recognition Site*), permettant de cliver le tag 6 Histidines, et d'une cassette de clonage (MCS). Ces éléments sont sous le contrôle du promoteur du phage T5 (PT5), reconnu par l'ARN polymérase d'*E.coli*, et de l'opéron lactose (lac O). Il contient également une origine de réplication bactérienne (col E1 ori) et un gène de résistance à l'ampicilline (Amp').

Amorces	Séquences
Sens	5'-GAGAAGATCTGCTGGCTATGTGTTT-3'
Anti-sens	5'-AGAGAAGCTTCTACACATTTTTCTCAGCCA-3'

Tableau XIII: Séquence des amorces pour le clonage du domaine extracellulaire II de la glycoprotéine CD63 dans le vecteur pQe30

La séquence correspondant au début de la séquence du domaine EDII est représentée en violet, et la séquence correspondant à la fin de ce domaine est représentée en orange. Le codon stop est indiqué en rouge et les sites de restriction pour les enzymes HindIII et BglIII sont respectivement représentés en vert et en bleu.

VI.4.2. Etude d'interaction

20 μL de billes NiNTA (Qiagen) sont lavées 3 fois avec le tampon NaH_2PO_4 20 mM pH 8 (1 000 g, 1 minute, 4°C). Les billes sont laissées pendant 10 minutes dans le dernier lavage. 500 μg de peptide sont incubés avec les billes pendant 1 heure à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite centrifugées (1 000 g, 1 minute, 4°C) puis lavées trois fois avec le tampon NaH_2PO_4 20 mM pH 8 contenant 20 mM d'imidazole.

200 ng de TIMP-1 sont ajoutés aux billes dans 500 μL de tampon NaH_2PO_4 20 mM pH 8 contenant 20 mM d'imidazole puis incubés une nuit à 4°C sous agitation. Les billes sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon NaH_2PO_4 20 mM pH 8 contenant 50 mM d'imidazole afin d'éliminer les interactions non-spécifiques sur les billes NiNTA. L'élution des complexes protéiques formés se fait par ajout sur les billes de 40 μL de tampon de Laemmler 2X. Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse puis analysés par immunoempreintes à l'aide d'anticorps anti-TIMP-1 ou anti-FLAG.

VI.5. Etude de l'interaction TIMP-1/Domaine extracellulaire II (EDII) de CD63

VI.5.1. Synthèse du domaine extracellulaire II (EDII)

Le vecteur d'expression utilisé pour produire le domaine extracellulaire II de CD63 (EDII) est le vecteur d'expression bactérienne pQe30 (Qiagen, Courtaboeuf, France). Ce vecteur est composé d'une séquence codant six histidines entre le codon stop et le site multiple de clonage, permettant l'ajout d'un tag 6 Histidines en position N-terminale de la protéine permettant sa purification. De plus, ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection dans la souche bactérienne *E.coli*. Ce vecteur possède également un promoteur au lactose inductible par l'IPTG (*Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*) (Figure 30).

La séquence du domaine extracellulaire II de CD63 a été amplifiée à l'aide du couple d'amorce présenté dans le tableau XIII. Le volume réactionnel final de 20 μL contient 1 ng d'ADN, 1 μM de chaque amorce (Eurogentec), 4 μL de tampon High Fidelity 5X (Finnzymes), dNTP 500 mM, et 0,4 unité d'enzyme polymérase Phusion (Finnzymes). Le premier cycle est composé de 30 secondes de dénaturation à 98°C, puis de 30 secondes d'hybridation à 50°C. La polymérisation se fait pendant 90 secondes à 72°C. Ce cycle est répété 24 fois. Enfin, un dernier cycle de 5 minutes à 72°C est réalisé de façon à permettre l'élongation de tous les brins partiellement synthétisés. Les produits PCR sont analysés et séparés sur gel d'agarose à 1% (p/v) contenant 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BET dans le tampon TBE 0,5 X. La taille des produits de PCR est évaluée à l'aide des marqueurs de taille (100 pb DNA ladder plus, GR3, Euromedex, Souffelweyersheim, France). Après purification du produit de PCR à l'aide d'un kit de purification Nucleospin extract II (Macherey-Nagel, Hoerd, France) ce dernier est digéré par les enzymes BglIII (Takara) et HindIII (Takara) dans le tampon K 1X (Takara) pendant 1 heure à 37°C. Le vecteur pQe30 est digéré par les enzymes BamHI (Takara) et HindIII (Takara) dans le tampon K 1X (Takara), pendant 1 heure à 37°C.

Après purification des produits de digestion, la séquence de l'EDII est insérée par ligation dans le vecteur pQe30 (Cf. Matériel et Méthodes II.5.1.). Après une incubation d'une nuit à 4°C, la ligase est inactivée 5 minutes à 70°C et les produits de ligation sont digérés par l'enzyme BamHI dans le tampon K 1X pendant 1 heure à 37 °C afin de linéariser les vecteurs refermés sur eux-même. Après inactivation de ces enzymes par chauffage pendant 15 minutes à 65°C, une transformation des produits de ligation par choc thermique est réalisée dans les bactéries BL21 (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Les bactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB solide en présence de 50 µg/mL ampicilline pendant une nuit à 37°C. Les colonies sont ensuite repiquées sur boîte quadrillée numérotée afin d'identifier les différents clones obtenus. L'extraction de l'ADN plasmidique de différents clones est réalisée à partir de cultures bactériennes grâce au kit *Nucleospin Plasmid* (Macherey-Nagel) et selon le protocole du fournisseur. Les clones sont ensuite séquencés par la société Beckman Coulter Genomics afin de vérifier la présence des inserts dans le vecteur pQe30 ainsi que l'absence de mutation (vecteur pQe30 CD63 EDII).

Afin de produire le domaine EDII, une pré-culture d'un clone positif est réalisée pendant 18 heures dans du milieu LB liquide. Cette pré-culture est ensuite diluée 5 fois dans le même milieu et la densité optique à 600 nm est déterminée. Lorsque la densité optique est comprise entre 0,5 et 0,6, la production de protéines est induite par l'IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*). La production du domaine EDII nécessite la mise au point des conditions de production. Des concentrations variables d'IPTG (0,2 mM à 1 mM final) (Sigma-Aldrich) ont été ajoutées au milieu de culture, différents temps (30 minutes à 1 nuit) et températures (20 à 37°C) ont également été testés.

Les suspensions bactériennes ont ensuite été centrifugées (3 500 g, 15 minutes, 4°C). Les surnageants sont conservés et les culots sont repris dans 200 µL de tampon de lyse (Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazole 5 mM) soniqués 3 fois 30 secondes puis centrifugés (10 000 g, 20 minutes, 4°C). Les échantillons (culots et surnageants) ont été déposés sur gel de polyacrylamide (15%) en conditions dénaturantes. Après migration, pendant 1h30 à 100 V dans le tampon de migration (Tris Base 0,02 M, Glycine 0,2 M, 0,1% (p/v) SDS) les gels ont été colorés au bleu de Coomassie (méthanol 40% (v/v), acide acétique 10% (v/v), bleu de Coomassie 0,1 % (p/v)).

	Dirigé contre	Clone	Espèce	Dilution	Fournisseur
primaires	TIMP-1	7-6C1	Souris	1 : 300	Merck Millipore
	LRP-1	8G1	Souris	1 µg/ml	Merck Millipore
	EEA1	polyclonal	Lapin	1 : 300	Abcam
	β3 tubuline	SDL-3D10	Souris	1 : 300	Sigma - Aldrich
secondaires	IgG Souris AlexaFluor 488	polyclonal	Singe	1 : 1 000	Invitrogen
	IgG Lapin AlexaFluor 488	polyclonal	Singe	1 : 1 000	Invitrogen
	IgG Souris AlexaFluor 568	polyclonal	Singe	1 : 1 000	Invitrogen
	IgG Lapin AlexaFluor 568	polyclonal	Chèvre	1 : 1 000	Invitrogen

Tableau XIV: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunofluorescence

	Dirigé contre	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
	phalloïdine	578	600
secondaires	IgG Souris AlexaFluor 488	495	519
	IgG Lapin AlexaFluor 488	495	519
	IgG Souris AlexaFluor 568	578	603
	IgG Lapin AlexaFluor 568	578	603

Tableau XV : Longueurs d'ondes d'excitation ($\lambda_{\text{excitation}}$) et d'émission ($\lambda_{\text{émission}}$) associées aux anticorps secondaires utilisés

VII. Etude de l'expression protéique par immunofluorescence

Les cellules cultivées sur lamelles de verres sont lavées 3 fois avec du PBS-B refroidi à 4°C, puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% (p/v) pendant 10 minutes. Les sites de liaisons aspécifiques des anticorps sont saturés pendant 1 heure avec une solution de BSA à 3% (p/v). Les lamelles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire (tableau XIV) pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages avec du PBS-B, les lamelles sont incubées avec un anticorps secondaire (Tableau XIV) pendant 1 heure à température ambiante en présence d'1 µg/mL de Hoechst afin de mettre en évidence les noyaux. Enfin, trois lavages dans du PBS-B sont réalisés avant de retourner les lamelles sur une lame en ajoutant au préalable une goutte de milieu de montage *Fluor Save Reagent* (Calbiochem). Les lames sont observées à l'aide du microscope à fluorescence Olympus BH2-RFCA (Olympus, Rungis, France) puis du microscope confocal Zeiss LSM 710 (Zeiss, Heidelberg, Allemagne) pour les expériences de co-localisation. Les différents fluorochromes ont été excités en utilisant la longueur d'onde appropriée (Tableau XV).

VII.1. Mise en évidence de la colocalisation entre LRP-1 et le TIMP-1 dans les neurones corticaux d'embryons de souris

Les neurones corticaux sont cultivés pendant 48 heures sur lamelle de verre préalablement recouvertes à la poly-lysine (cf Partie II.1.). L'immunomarquage est réalisé selon le protocole détaillé ci-dessus (Partie VII.1.). Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps primaire dirigé contre la protéine LRP-1 (souris) et contre le TIMP-1 (lapin). Les anticorps secondaires utilisés sont les anticorps dirigés contre les IgG de souris couplés à l'AlexaFluor 488 et contre les IgG de lapin couplés à l'AlexaFluor 568. Les lames sont observées à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM 710 (Zeiss, Heidelberg, Allemagne) en utilisant un objectif x63. Les différents fluorochromes ont été excités en utilisant la longueur d'onde appropriée (Tableau XV).

VII.2. Etude de la morphologie neuronale par immunofluorescence

VII.2.1. Marquages par immunofluorescence

Les neurones corticaux sont cultivés pendant 24h sur lamelle de verre préalablement recouvertes à la poly-lysine (Cf Partie II.1.). Ils sont ensuite incubés pendant 30 minutes avec 150 ng/mL TIMP-1 sauvage ou muté dans un milieu défini (Milieu neurobasal, 2% (v/v) de supplément B27, 2,5 mM glutamine (Invitrogen) et 25 µM glutamate) en présence ou absence de 19,5 µg/mL de RAP (*Receptor associated protein*) (Perrot et al., 2012). Le milieu est ensuite rapidement éliminé et les cellules sont incubées une nuit avec l'anticorps anti-β3 tubuline (Sigma-Aldrich). Les lamelles sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à un Alexa Fluor 488 (Invitrogen) et dilué au 1:1 000^e. Après 3 lavages avec du

PBS-B, les lamelles sont incubées pendant 2 heures à température ambiante avec la phalloïdine couplé à un Alexa Fluor 568 (Invitrogen) et dilué au 1:100^e, ainsi qu'avec 0,5 µg/mL de Hoechst (Life technologies). Enfin, trois lavages dans du PBS-B sont réalisés avant de retourner les lamelles sur une lame en ajoutant au préalable une goutte de milieu de montage *Fluor Save Reagent* (Calbiochem).

VII.2.2. Analyse de la taille du réseau neuritique

Les lames sont observées avec un microscope à fluorescence Olympus BH2-RFCA en utilisant un objectif x 40. Dix champs sont photographiés par lame à l'aide d'une caméra U-MPTV (Olympus) et en utilisant le logiciel d'acquisition DP Controller (Olympus). La longueur du réseau neuritique total est déterminée à l'aide du plugin Neuron J du logiciel Image J. Le nombre de noyaux par champ est compté de façon à exprimer la longueur du réseau neuritique par neurone.

VII.2.3. Analyse du volume des cônes de croissance

Les lames sont observées avec le microscope confocal Zeiss LSM 710 NLO (Zeiss, Heidelberg, Allemagne) en utilisant un objectif x63. Les différents fluorochromes ont été excités en utilisant la longueur d'onde appropriée. Dix champs sont photographiés par lame en utilisant le logiciel d'acquisition Zen et avec un pas entre chaque section de 0,300 µm. Les images obtenues ont été traitées et reconstruites avec le logiciel Amira (FEI Visualization, Hillsboro, USA). Le volume des cônes de croissance de chaque neurone est mesuré grâce à la quantification des voxels (correspondant aux pixels en 3D).

VIII. Etude de l'endocytose par immunofluorescence

VIII.1. Marquages par immunofluorescence

Les neurones corticaux sont cultivés pendant 4 jours sur lamelle de verre préalablement recouvertes à la poly-lysine (cf Partie II.1.). Les lamelles sont ensuite incubées pendant 30 minutes sur de la glace dans du milieu défini (Milieu neurobasal, 2% (v/v) de supplément B27, 2,5 mM glutamine (Invitrogen) et 25 µM glutamate) supplémenté avec 1 mg/ml BSA. Cette étape permet de saturer la surface cellulaire et de bloquer le processus d'endocytose. Les neurones sont ensuite exposés pendant 1h30 à 4°C avec 150 ng/ml TIMP-1 ou mutants en présence ou non de 19,5 µg/mL de RAP. L'endocytose est déclenchée par incubation à 37°C pendant 10 minutes à 1 heure et arrêtée par incubation à 4°C.

Les immunomarquages sont réalisés avec les anticorps dirigés contre le TIMP-1 (souris) et contre le marqueur des endosomes précoces EEA1 (lapin) selon le protocole défini dans la partie VII. Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à un Alexa Fluor 568 (TIMP-1) ou à un Alexa Fluor 488 (EEA1).

VIII.2. Analyse de l'endocytose

L'acquisition des images pour l'analyse de la colocalisation a été réalisée avec le microscope confocal Zeiss LSM 710, en utilisant un objectif 63x, une caméra numérique et le logiciel d'acquisition Zen (Zeiss). Les différents fluorochromes ont été excités en utilisant les longueurs d'onde appropriées. Un pas entre chaque section de $z=0.300\ \mu\text{m}$ a été utilisé. Les images obtenues ont été traitées et reconstruites avec le logiciel Amira (projections, représentations surfaciques). Les résultats présentent la représentation surfacique des marquages TIMP-1 et EEA1 et les points de colocalisation. Les coefficients de corrélation ont été déterminés à l'aide du module de quantification de colocalisation du logiciel Amira sur 10 images par expérimentation indépendante.

IX. Etude de la survie cellulaire

Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits à raison de $1,5 \cdot 10^4$ cellules par puits dans le milieu milieu DMEM/Ham-F12 contenant 10% (v/v) de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine (Invitrogen), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'insuline, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'hydrocortisone, 2 ng/mL d'EGF, et 0,1 mg/mL de toxine cholérique (Sigma-Aldrich)). Après 18 heures d'incubation, les cellules sont lavées 1 fois avec du PBS pH 7,4 contenant 100 mM de glycine, puis 2 fois avec du PBS. Les cellules sont incubées 1 heures à 37°C avec 150 ng/mL de TIMP-1 sauvage ou mutant dans du milieu DMEM F12. L'apoptose est ensuite induite par 0,01 μM de staurosporine (Enzo Life Science, Villeurbanne, France). Le nombre de cellules viables est déterminé à T = 0, T = 24 heures et T = 48 heures par dosage colorimétrique à l'aide de MTT (Sigma-Aldrich). 20 μL de MTT (solution à 1 mg/ml) sont ajoutés par puits. Après une incubation de 4 heures à 37°C, le milieu contenant le MTT est éliminé et le formazan formé par la succinate deshydrogénase mitochondriale est dissous dans 100 μL d'isopropanol contenant 0,04 N d'acide chlorhydrique. La densité optique à 560 nm est mesurée à l'aide du lecteur de plaques Tecan F200 Pro (Tecan, Lyon, France).

X. Analyses statistiques

L'ensemble des résultats présentés sont issus d'expériences indépendantes répétées un minimum de 3 fois. Les photos présentées sont représentatives d'une expérience. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyenne +/- erreur standard à la moyenne (SEM). Selon les expériences, un test de Student ou un test ANOVA a été utilisé pour étudier la significativité des résultats obtenus. Celle-ci est exprimée de la manière suivante : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NS = Non Significatif.

RESULTATS

Partie I :
Identification d'un nouveau récepteur du
TIMP-1 : le récepteur LRP-1

Manuscrit :

Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 mediates endocytic clearance of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and promotes its cytokine-like activities

Jessica Thevenard[#], Laurie Verzeaux[#], Jérôme Devy, Nicolas Etique, Albin Jeanne, Christophe Schneider, Cathy Hachet, Géraldine Ferracci, Marion David, Laurent Martiny, Emmanuelle Charpentier, Michel Khrestchatisky, Santiago Rivera, Stéphane Dedieu[§], Hervé Emonard[§].

PLoS One. 2014 Jul 30;9(7):e103839. doi: 10.1371/journal.pone.0103839. eCollection 2014.

[#]: These authors contributed equally to this work

[§]: They are co-senior authors

Contexte scientifique

Des études menées au sein de notre équipe de recherche ont pour objectif de caractériser les interactions entre le récepteur LRP-1 et certains acteurs de la protéolyse matricielle dans différents contextes pathologiques (cancers et maladies neurodégénératives). La protéine LRP-1, exprimée à la surface des neurones, est impliquée dans le comportement et la fonction motrice des souris en modulant la transmission synaptique (May et al., 2004). La localisation de LRP-1 est modifiée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En effet, lors du développement de la maladie, LRP-1 est moins exprimé à la surface des vaisseaux sanguins alors qu'il est surexprimé à la surface des neurones. Cette modification de la localisation de LRP-1 diminue la clairance des peptides A β par la circulation sanguine, augmentant ainsi la formation des plaques séniles (Donahue et al., 2006). Par ailleurs, le récepteur LRP-1 interagit avec de nombreux ligands, permettant leur endocytose, ainsi que l'activation de voies de signalisation cellulaire. Le TIMP-2 et le TIMP-3 ont ainsi été identifiés comme des ligands de LRP-1 est sous forme libre et/ou lié à la pro-MMP-2 (Emonard et al., 2004; Scilabra et al., 2013).

Une augmentation de l'expression de TIMP-1 est observée dans certaines maladies neurodégénératives telles que la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Kouwenhoven et al., 2001; Lorenzl et al., 2002). Dans un modèle de culture primaire de neurones d'embryons de souris, il a été montré que le TIMP-1 réduit la longueur des neurites conduisant à une altération de la connectivité neuronale. Ces effets sont en partie liés à l'inhibition de la MMP-2 mais un autre mécanisme indépendant de l'inhibition des MMPs pourrait être impliqué puisqu'un inhibiteur de MMPs à large spectre, le RXPO3R ne reproduit pas la totalité des effets obtenus par le TIMP-1 dans ce modèle *in vitro*. De plus, la surexpression du TIMP-1 induit des effets plus importants que l'ajout de TIMP-1 exogène, suggérant un effet autocrine (Ould-yahoui et al., 2009).

Les activités cytokiniques du TIMP-1 impliquant généralement sa fixation à un récepteur membranaire, nous avons émis l'hypothèse d'une interaction entre le TIMP-1 et LRP-1 à la surface des neurones permettant d'une part d'assurer la clairance du TIMP-1 et d'autre part de moduler la connectivité neuronale.

Nos résultats ont été publiés dans la revue Plos One en 2014.

Principaux résultats

Pour étudier l'interaction entre le TIMP-1 et LRP-1, nous avons utilisé un modèle de culture primaire de neurones corticaux d'embryons de souris dans lequel un effet du TIMP-1 a déjà été démontré (Ould-yahoui et al., 2009).

Nous avons montré que le TIMP-1 induit une diminution de 50% de la longueur des neurites et une augmentation de 175% du volume des cônes de croissance. Les effets du TIMP-1 sont bloqués par la protéine RAP, le ligand préférentiel de LRP-1, ainsi que par un anticorps bloquant dirigé contre LRP-1. Ces résultats laissent supposer que le TIMP-1 interagit avec le récepteur LRP-1 dans le modèle de culture primaire d'embryons de souris.

Par immunofluorescence et immunoprécipitation, nous avons mis en évidence une colocalisation et une interaction directe du TIMP-1 avec LRP-1.

En suivant l'endocytose de TIMP-1 fluorescent, nous avons montré que le TIMP-1 fixé à LRP-1 est internalisé dans les deux heures suivant l'incubation des cellules avec le TIMP-1.

Pour confirmer et préciser l'interaction du TIMP-1 avec LRP-1, nous avons transfecté des cellules CHO avec les ADNc codant les domaines extracellulaires de LRP-1.

Suite à l'immunoprécipitation de ces domaines, nous avons montré que le TIMP-1 se lie préférentiellement aux domaines DII et DIV de LRP-1. Ce résultat a été confirmé en évaluant la constante de dissociation par résonance plasmonique de surface. La fixation du TIMP-1 aux domaines DII ou DIV est également inhibée par RAP. De plus, des tests d'endocytose réalisés avec les cellules CHO exprimant les domaines DII et DIV ont permis de confirmer que la liaison du TIMP-1 à ces domaines induit l'endocytose du TIMP-1.

Afin de déterminer si les effets du TIMP-1 observés sur les neurones sont indépendants de son activité inhibitrice de MMPs, nous avons utilisé le mutant T2G, décrit dans la littérature comme ayant perdu sa capacité d'inhibition des MMP-1, -2, -3 et -7. Dans les neurones corticaux d'embryons de souris, le mutant T2G induit une diminution de 30% de la longueur des neurites et une augmentation de 100% du volume des cônes de croissance. Par immunofluorescence, nous avons montré que le mutant T2G est colocalisé avec le récepteur LRP-1 à la surface des neurones. Les effets du mutant T2G dans ce modèle cellulaire sont inhibés par RAP et par l'anticorps bloquant LRP-1.

Ces résultats montrent que le mutant T2G reproduit les effets du TIMP-1 sur les neurones corticaux en se fixant à LRP-1 et que les effets du TIMP-1 sur ce modèle cellulaire sont indépendants de l'inhibition des MMPs.

Conclusion

Nous avons identifié la protéine LRP-1 en tant que nouveau récepteur du TIMP-1 dans les neurones corticaux d'embryons de souris.

Cette interaction est directe et se fait avec les domaines DII et DIV de la chaîne extracellulaire de LRP-1.

La liaison et l'endocytose du TIMP-1 *via* le récepteur LRP-1 sont indépendantes de son activité inhibitrice de MMPs.

La liaison du TIMP-1 à LRP-1 dans les neurones corticaux d'embryons de souris module la plasticité neuronale en réduisant la taille des neurites et en augmentant le volume des cônes de croissance.



Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Mediates Endocytic Clearance of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 and Promotes Its Cytokine-Like Activities

Jessica Thevenard¹, Laurie Verzeaux¹, Jérôme Devy¹, Nicolas Etique¹, Albin Jeanne¹, Christophe Schneider¹, Cathy Hachet¹, Géraldine Ferracci², Marion David³, Laurent Martiny¹, Emmanuelle Charpentier¹, Michel Khrestchatsky^{4,5}, Santiago Rivera^{4,5}, Stéphane Dedieu^{1"}, Hervé Emonard^{1"*}

1 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7369 Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire, Université de Reims Champagne-Ardenne, Unité de Formation et de Recherche (UFR) Sciences Exactes et Naturelles, Reims, France, **2** Aix-Marseille Université, CNRS, Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille (CRN2M), UMR 7286, Plate-Forme de Recherche en Neurosciences (PFRN), Marseille, France, **3** VECT-HORUS SAS, Faculté de Médecine Secteur Nord, Marseille, France, **4** Neurobiologie des Interactions Cellulaires et Neurophysiopathologie (NICN), UMR 7259, Aix-Marseille Université, Marseille, France, **5** NICN, CNRS UMR 7259, Marseille, France

Abstract

Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) regulates the extracellular matrix turnover by inhibiting the proteolytic activity of matrix metalloproteinases (MMPs). TIMP-1 also displays MMP-independent activities that influence the behavior of various cell types including neuronal plasticity, but the underlying molecular mechanisms remain mostly unknown. The trans-membrane receptor low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) consists of a large extracellular chain with distinct ligand-binding domains that interact with numerous ligands including TIMP-2 and TIMP-3 and a short transmembrane chain with intracellular motifs that allow endocytosis and confer signaling properties to LRP-1. We addressed TIMP-1 interaction with recombinant ligand-binding domains of LRP-1 expressed by CHO cells for endocytosis study, or linked onto sensor chips for surface plasmon resonance analysis. Primary cortical neurons bound and internalized endogenous TIMP-1 through a mechanism mediated by LRP-1. This resulted in inhibition of neurite outgrowth and increased growth cone volume. Using a mutated inactive TIMP-1 variant we showed that TIMP-1 effect on neurone morphology was independent of its MMP inhibitory activity. We conclude that TIMP-1 is a new ligand of LRP-1 and we highlight a new example of its MMP-independent, cytokine-like functions.

Citation: Thevenard J, Verzeaux L, Devy J, Etique N, Jeanne A, et al. (2014) Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Mediates Endocytic Clearance of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 and Promotes Its Cytokine-Like Activities. PLoS ONE 9(7): e103839. doi:10.1371/journal.pone.0103839

Editor: Peter J. Lenting, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France

Received May 23, 2014; Accepted June 11, 2014; Published July 30, 2014

Copyright: 2014 Thevenard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by The National Centre for Scientific Research (CNRS) and a grant from The French National Research Agency (ANR) grant number [ANR-08-MNPS-042-04 TIMPAD to S.R. and H.E.]. A.J. is recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research; L.V. and S.D. are recipients of grants from Région Champagne-Ardenne; M.K. acknowledges support from the ANR [ANR-09-BIOT-015-01 VECToBrain and ANR-2011-MALZ-007-01 PREVENTAD]; and S.R. acknowledges support from the Ligue Européenne Contre la Maladie d'Alzheimer (LECAM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Marion David is employed by the Biotechnology company Vect-Horus. Michel Khrestchatsky is Director of the NICN Academic Laboratory supported by Aix-Marseille Université and the CNRS, and also founder and shareholder of Vect-Horus. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* Email: herve.emonard@univ-reims.fr

These authors contributed equally to this work.

" SD and HE are co-senior authors on this work.

Introduction

The four tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1–4) inhibit the proteolytic activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and together constitute the principal regulators of the pericellular environment in physiological and pathological situations [1]. Independently of their MMP inhibitory properties, TIMPs elicit signaling pathways through binding to membrane receptors that lead for instance to regulation of cell growth and apoptosis [2,3]. We have thus reported that the formation of a ternary complex at the cell surface between TIMP-1, proMMP-9 and the hyaluronan receptor CD44 promoted erythroid cell survival [4,5]. TIMP-1 binds to CD63, a member of the tetraspanin receptor family, to regulate cell survival via an interaction with b1 integrin [6].

The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) is a receptor for more than 40 different ligands [7], including members of the MMP family such as MMP-2 [8,9], MMP-9 [10] and MMP-13 [11]. LRP-1 is a heterodimeric endocytic receptor that consists of a 515-kDa extracellular a-chain non-covalently associated to an 85-kDa transmembrane b-chain. The a-chain contains four extracellular ligand-binding domains, termed domains I to IV, each composed of a cluster of cysteine-rich complement-type repeats. Although most of LRP-1 ligands bind to domains II and IV, the aspartic proteinase pro-cathepsin D has recently been shown to interact with the extracellular part of LRP1 b-chain [12]. A 39-kDa protein, originally identified by its copurification with LRP-1 [13] and thereby termed receptor-associated protein (RAP), is a chaperone that binds tightly to domains II, III and IV of LRP-1 through its C-terminal heparin-binding domain and antagonizes ligand binding to LRP-1 [14]. The cytoplasmic tail of LRP-1 b-chain contains an YXXL and two NPxY motifs that regulate its localization to clathrin-coated pits and contribute to LRP-1 endocytosis. Moreover, NPxY motifs also serve as docking sites for cytoplasmic adaptor proteins including Shc, Disabled and Fe65 that confer signaling properties to LRP-1 [7]. The embryonic lethal phenotype obtained after targeted disruption of the LRP-1 gene [15] pinpoints the biological importance of this endocytic and signaling receptor in normal development. We recently demonstrated that LRP-1 knockdown inhibited migration and invasive capacities of carcinoma cells, and identified the extracellular signal regulated protein kinases (ERK) and c-Jun N-terminal kinases (JNK) as the main LRP-1 molecular relays to regulate focal adhesion disassembly in malignant cells [16,17].

TIMP-1 elicits important effects in brain pathophysiology and in neuronal differentiation and plasticity [18]. Thus, TIMP-1

inhibits neurite outgrowth and modulates growth cone morphology in cultured cortical neurons [19]. These effects have been related in part to the inhibition of MMP-2 activity, but alternative/complementary mechanisms cannot be excluded. Tissue-selective deletion of LRP-1 in neurons highlights its key role in mice behavior and motor function [20]. We have previously shown that TIMP-2 and -3 endocytosis by low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) is an efficient way to control TIMP-2 and -3 extracellular levels in a variety of cell types [9,21,22]. However, the relationship between TIMP-1 and LRP-1, and its biological consequences on neuron behavior, remain unknown.

In the present report, we first investigated the possible interaction of TIMP-1 with LRP-1 in CHO cells expressing LRP-1 ligand-binding domains [14] as a model system. As TIMP1 and LRP-1 are

both involved in neuronal plasticity [19,20], we then extended our study to primary cortical neurons. Our results demonstrate for the first time that TIMP-1 binds to specific domains of LRP-1 to undergo endocytosis. Moreover, such an interaction regulates neuronal outgrowth and growth cone morphology. Finally, a mutated inactive TIMP-1 variant [23] reproduces morphological effects displayed by full-length TIMP-1 on neurones.

Materials and Methods

Reagents

Anti-LRP-1 a-chain (mouse, clone 8G1), anti-LRP-1 b-chain (mouse, clone 5A6) and nonreactive IgGs used for immunoprecipitation and immunoblotting, were obtained from Millipore SAS (Molsheim, France). Anti-hemagglutinin (anti-HA) tag monoclonal antibody (mouse, clone 12CA5) was obtained from Roche

Diagnostics (Meylan, France). Anti-red fluorescent protein (antiRFP) tag rabbit polyclonal antibodies were from Abcam (Paris, France). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and antimouse antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (distributed by Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). For immunocytochemistry experiments, mouse anti-bIII-tubulin (clone SDL.3D10) and anti-FLAG (clone M2) antibodies were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 568-phalloidin and Prolong Gold antifade reagent with 49, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) were from Molecular Probes (distributed by Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Mouse recombinant TIMP1 and goat anti-mouse TIMP-1 antibodies were purchased from R&D System (Minneapolis, MN, USA). Blocking LRP-1 polyclonal antibodies (R2629) [24] were a generous gift from Dr. D.K. Strickland (Department of Surgery, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA). Streptavidin eFluor710 was obtained from eBioscience (Paris, France) and ProtOn Biotin Labeling Kit from Vector Laboratories (ClniSciences SAS, Nanterre, France). EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotin, D-biotin and monomeric avidin-agarose beads were obtained from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). Pronase and other chemicals were from Sigma-Aldrich.

Plasmids, transfection and purification of recombinant proteins

The plasmid constructs SPCT (SP, signal peptide; CT, Cterminal), ligand-binding domain II (DII) or IV (DIV) coding for LRP-1 mini-receptors were generated as described elsewhere [25]. The plasmid construct for RFP-tagged TIMP-1 was previously described [19]. CHO cells were stably transfected with the SPCT, mini-LRP-II and mini-LRP-IV plasmid constructs using JetPEI reagent from Polyplus Transfection (distributed by Ozyme). Clonal cells were selected with 0.8 mg/ml G418 (Invitrogen) and overexpression of LRP-1 mini-receptors was controlled by immunoblotting and immunocytochemistry. Then, minireceptoroverexpressing CHO cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium:Nutrient Mixture F-12 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 0.5 mg/ml G418. In some experiments, CHO cells overexpressing HA-tagged LRP-1 minireceptors were further transiently transfected with RFP-tagged TIMP-1.

TIMP-1 cDNA was cloned into the p3XFLAG-CMV-14 vector (Sigma-Aldrich) to produce TIMP-1 with fusion FLAG-tag in Cterminal using the following primers: TACAGAATTCCACCATGGCCCC (forward) and GAGAGCTAGCGGCTATCTGGGACC (reverse). The mutated non-functional fulllength TIMP-1 exhibiting threonine-2 mutated to glycine (T2G) [23] was generated using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Agilent Technologies, Les Ulis, France) with the following primers: CAGCAGGGCCTGCGGCTGTGTCCCACCC (forward) and GGGTGGGACACAGCCGAGGCCCTGCTG (reverse). DNA sequencing confirmed the fidelity of these constructs. CHO cells were stably transfected with these constructs to express FLAG-tagged wild type TIMP-1 and the T2G mutant. The conditioned medium was collected and incubated 1 h with 10 mM EDTA in acidic condition (pH 3.5) to remove TIMP-1 complexed to MMPs. After pH equilibration to 7.4, the conditioned medium was incubated with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) for 3 h at 4uC. After the resin was collected and washed with trisbuffered saline (TBS), the recombinant proteins were eluted under acidic conditions (0.1 M glycine-HCl, pH 3.5) and the concentrations were determined using the Human TIMP-1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems). All recombinant proteins were controlled by SDS-PAGE, silver nitrate staining and immunoblotting.

RAP was expressed in *Escherichia coli* BL21 pLysS (Promega, Charbonnie' res-les-Bains, France) using the pT7H6FX-RAP construct kindly provided by Dr. M. S. Nielsen (Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus, Denmark). RAP purification was conducted as previously reported [25].

Primary cultures of cortical neurons

Primary cultures of cortical neurons were prepared from CD1 mice embryos, as previously described [19]. Pregnant mice were deeply anesthetized with isoflurane and then sacrificed by cervical dislocation, without suffering. Embryos at E17-18 were decapitated. This is conform to National and European regulations (EU directive Nu 2010/63) and in agreement with the authorization for animal experimentation attributed to the laboratory by the Prefecture des Bouches du Rhone (permit number: D 13 055 08). Cells were plated onto poly-D-lysine coating (SigmaAldrich) and grown at 37uC in a humidified chamber containing 5% CO₂. After 90 min, the plating medium was replaced by serum-free defined medium consisting in Neurobasal Medium with 2% B27 supplement, 5 U/ml penicillin/streptomycin, 2.5 mM glutamine (all from Invitrogen) and 25 mM glutamate (Sigma Aldrich).

Whole-cell protein extraction

Whole-cell protein extracts were prepared by scraping primary neurons in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride and 1 mM Na₃VO₄ supplemented with a proteinase inhibitor cocktail from Sigma-Aldrich). Cells were shaken vigorously for 30 min at 4°C and the remaining pellet was separated by centrifugation (10,000 g for 10 min at 4uC) and discarded. Protein concentration was quantified by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

Plasma membrane protein isolation

CHO cells or primary neurons were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and cell surface proteins were biotinylated with PBS containing 0.5 mg/ml of EZ-Link sulfoNHS-LC-biotin for 30 min at 4uC. After three washes, cells were incubated with 100 mM glycine in PBS for 30 min at 4uC to avoid nonspecific binding. Cells were washed three times before protein extraction in ice-cold lysis buffer as described above. Cell extracts were pelleted at 10,000 g for 10 min at 4uC and protein amount was quantified by the Bradford method. Solubilized biotinylated proteins from neurons (250 mg) or CHO cells (750 mg) were then specifically affinity-purified using 40 ml of monomeric avidinagarose beads. Incubation was performed overnight at 4uC with gentle agitation, followed by five washes with cold lysis buffer to remove nonspecific binding. Cell-surface biotinylated proteins were then subjected to immunoprecipitation assay with anti-LRP1 (clone 8G1 or 5A6), anti-HA, anti-RFP, or nonspecific IgGs that served as control. For immunoprecipitation, 10 mM D-biotin in PBS was used for competitive elution of biotinylated proteins from avidin-agarose beads. Immunoprecipitation was performed with protein G-Sepharose (Amersham Biosciences, Courtaboeuf, France) for 4 h at 4uC on an orbital agitator. Samples were washed three times with cold lysis buffer. Then, immunoprecipitated protein complexes were solubilized before analysis by immunoblotting.

Immunoblotting analysis

Immunoprecipitated cell-surface proteins and proteins from whole-cell extracts were separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences) and incubated overnight at 4uC under gentle agitation with anti-LRP-1 (1/1000; 5A6 or 8G1), anti-TIMP-1 (1/500), anti-HA tag (1/ 1000) or anti-RFP tag (1/500) antibodies. Membranes were then incubated for 1 h at room temperature (RT) with corresponding horseradish peroxidase-coupled antibodies. TBS with 0.1% (v/v) Tween-20 was used for all washes. Immunoreactive bands were revealed using the ECL chemiluminescence kit (Amersham Biosciences) by using a ChemiDoc-XRS imaging station (BioRad laboratories). Ponceau red staining solution was used to ensure equal loading of the protein samples and for normalization. Immunoblots presented are representative of at least three independent experiments.

Fluorescent TIMP-1 preparation and endocytosis experiments

Ten mg of TIMP-1 were biotinylated with the ProtOn Biotin Labeling Kit according to the manufacturer's instructions. Then biotinylated TIMP-1 was incubated with 0.5 mg of eFluor 710 Streptavidin for 30 min at RT. For cell-surface binding of fluorescent TIMP-1 (fluo-TIMP-1), 2610⁴ CHO cells or cortical neurons were plated onto 96-well plates and allowed to grow overnight (for CHO cells) or 8 days (for neurons) in their respective culture medium. After washing twice with assay medium (culture medium containing 0.1% bovine serum albumin, BSA) and adaptation to this medium at 4uC for 1 h, cells were incubated with 10 nM fluo-TIMP-1 in assay medium at 4uC for 2 h, in the absence or presence of 500 nM RAP, a classic competitor of LRPligand interaction [13]. Cells were then carefully rinsed five times with cold PBS and surface-digested with 0.1% (w/v) pronase in culture medium at 4uC to degrade surface-bound ligands and detach cells. After cell collection by centrifugation, fluorescence in the

supernatant defined as surface-bound ligand was measured by spectrofluorimetry (I_{exc} , 633 nm/ I_{em} , 710 nm) (Infinite F200 PRO, Tecan, Lyon, France). Appropriate controls with eFluor alone were performed. For endocytosis assays, after 2 h of binding and careful rinsing with PBS, cells were further cultured in assay medium pre-warmed at 37°C for 1 hour. To distinguish surface binding from intracellular accumulation, cells were washed twice with cold PBS and surface-digested with pronase as above.

Fluorescence associated with pelleted cells, i.e. pronase-resistant was defined as internalized ligand. Proteins were quantified by the Bradford method to normalize the results.

Surface plasmon resonance (SPR) analysis

Recombinant human LRP-1 Fc-tagged mini-domains II and IV (termed respectively Fc-DII and Fc-DIV) were purchased from R&D Systems. Human recombinant TIMP-1 was a generous gift from Prof. H. Nagase (Kennedy Institute of Rheumatology, University of Oxford, London, United Kingdom). Epidermal growth factor (EGF), used as negative control [9], was from Sigma-Aldrich. Interaction of ligands with LRP-1 mini-domains was tested at 25°C using a Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) and HBS (50 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20) as running buffer. Anti-Fc antibody (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, United Kingdom) was first immobilized at pH 5.0 on a CMD500m sensor chip (Xantec) using amine coupling kit (GE Healthcare). Fc fragment (Millipore SAS), Fc-DII and Fc-DIV were then immuno-captured on the sensor chip at a density of around 8 fmol/mm². Binding to Fc-DII- or Fc-DIV-coated flow cells was corrected for non-specific binding to Fc-coated flow cells. The single-cycle kinetic method was used to measure the affinity of ligands with LRP-1 mini-domains. TIMP-1 and EGF were serially diluted 2-fold in running buffer yielding concentrations ranging from 5 to 80 nM and samples injected sequentially 2 minutes at 50 ml/min using increasing concentrations. Blank run injections of HBS were performed in the same conditions before ligands injections. Double-subtracted sensorgrams were globally fitted with the 1:1 titration kinetic binding model from Biacore T200 Evaluation version 2.0. Data are representative of three independent experiments.

Inhibition of MMP-2 activity and K_i determination

Active MMP-2 (0.76 nM) was added into Tris-test buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 5 mM CaCl₂) containing FLAG-TIMP-1 or FLAG-T2G (0.17 to 13.5 nM) and incubated 2 h at 27°C. MMP-2 activity was monitored with the fluorogenic synthetic substrate MCA-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-AlaArg-NH₂.TFA, at excitation and emission wavelengths of 325 and 393 nm, respectively. Enzyme and substrate were from Millipore SAS (Molsheim, France). Non-linear regression analysis with Graphpad software (La Jolla, USA) was used to calculate the K_i values using the Morrison equation.

Immunofluorescence and cytoskeleton labeling

Cortical neurons from mouse embryos were seeded onto poly-L-lysine-coated glass slides for 24 h at 37°C. Recombinant FLAGTIMP-1 (10 nM), FLAG-T2G (10 nM), RAP (500 nM) and blocking LRP-1 polyclonal antibodies (R2629, 30 mg/ml) were added to cultures in serum-free media for 30 minutes. Neurons were rinsed with PBS and fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde for 10 min. For immunofluorescence, cells were pre-incubated with

0.1% Triton X-100, 3% BSA for 60 min, followed by incubation at 4°C with the following primary antibodies overnight: anti-LRP1 (8G1, 1/100), anti-TIMP-1 (1/100), anti-FLAG (1/100) or antiβIII-tubulin (1/100). Control preparations were incubated without primary antibodies. Slides were washed five times with PBS and cells were incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 (1/1000, green) or Alexa Fluor 568 (1/1000, red) at RT for 60 min. For F-actin labeling, cells were further incubated with Alexa Fluor 568-phalloidin (1/100) at RT for 45 min, rinsed with PBS and mounted in fluorescence mounting medium containing diaminido phenylindole (DAPI) for nuclei counterstaining. Cells were observed using a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope with the 63x oil-immersion objective and Zeiss operating system associated with the ZEN software program (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Acquisitions were performed by exciting Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568 and DAPI dye with an argon laser, a helium–neon laser and a chameleon infrared laser tuned at 730 nm, respectively. Emitted fluorescence was detected through the appropriate wavelength window.

Morphological analyses

In each experiment, fluorescence microphotographs were taken from at least 5 randomly selected fields per slide and 3 slides per experimental condition. The neurite length of all βIII-tubulin positive cells was measured using the ImageJ plugin NeuronJ. The mean length of the neuritic arbor was obtained by dividing the total length of neurites in a field by the number of cells immunoreactive for βIII-tubulin, as previously described [19]. A neurite segment was defined as the distance between the branching point and the tip of the neurite. Growth cone volume quantification was realized using the AMIRA software (v5.4.2, Visualization Sciences Group, Burlington, MA, USA). For quantification studies, a multichannel field module was used, followed by a filter and deconvolution 3D treatment. The same threshold was applied for each field. Growth cone volumes were obtained by summing voxel volumes per cell.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's t-test. Values represent the means ± 6 s.e.m. of at least three independent experiments.

Results

LRP-1 directly binds TIMP-1 and mediates its uptake in CHO cells through the extracellular ligand-binding domains II and IV

We first investigated whether LRP-1 may bind TIMP-1 at the plasma membrane. Overexpressing full-length LRP-1 is particularly inefficient due to its considerable molecular weight; therefore, we generated CHO cells that stably overexpress functional HA-tagged-mini-receptors derived from LRP-1. The SPCT construct contains only the HA-tagged LRP-1 b-chain (molecular weight of 106 kDa), whereas the other LRP-1 variants further contain the ligand-binding domain II (DII, molecular weight of 153 kDa) or IV (DIV, molecular weight of 164 kDa) (Fig. 1A) of the extracellular a-chain. Stable expression of HA-tagged minireceptors at the plasma membrane of each CHO clone was assessed by HA tag-directed immunoprecipitation of cell-surface biotinylated proteins followed by immunoblotting analysis using an

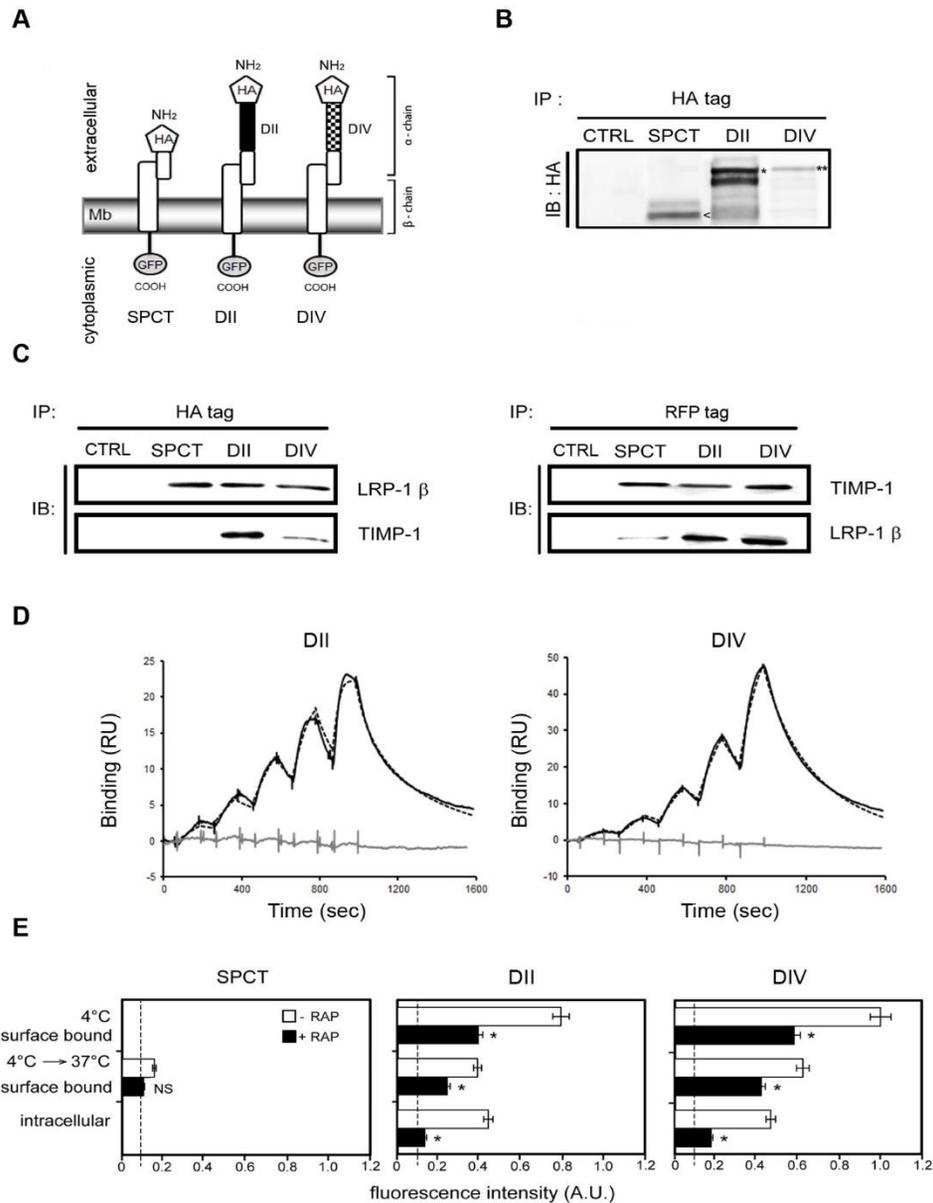


Figure 1. Domains II and IV of the extracellular α -chain of LRP-1 are required to bind and promote TIMP-1 endocytosis in CHO cells. **A**. Schematic representation of LRP-1-derived minireceptors carrying no-ligand-binding cluster (SPCT), extracellular binding-domain II (DII) or extracellular binding-domain IV (DIV). Each construct contains a HA tag at the amino-terminus of the α -chain. **B**. Transfected CHO cells stably express HA-tagged SPCT (SPCT), HA-tagged mini LRP-II (DII), or HA-tagged mini LRP-IV (DIV). Nontransfected cells served as control (CTRL). Biotinylation of cell-surface proteins was performed, followed by an immunoblot (IB) analysis using anti-HA tag. Bands correspond to the expected molecular weights of SPCT (106 kDa; arrowhead), DII (153 kDa; star), and DIV (164 kDa; double star). **C**. CHO cells overexpressing HA-tagged LRP-1-derived minireceptors (SPCT, DII, DIV) or not (CTRL) were transiently transfected with RFP-tagged TIMP-1 for 24 hours. Cell-surface proteins were subjected to immunoprecipitation (IP) assay with either anti-HA tag (left panel) or an anti-RFP tag (right panel). Then, immunoblot (IB) analysis was conducted using both anti-LRP-1 β -chain (5A6) and anti-RFP tag. **D**. Representative sensorgrams for TIMP-1 interacting with DII (left panel) and DIV (right panel). A set of concentrations (5–80 nM) of TIMP-1 or EGF was sequentially injected over immobilized Fc-DII and Fc-DIV. The solid black lines represent the specific binding of TIMP-1 obtained after double-subtraction of the signal obtained on the control flow cell and a blank run. The dotted black lines represent the fit of the data with a kinetic titration 1:1 interaction model. The grey lines represent the specific binding of EGF obtained after double-subtraction of the signal obtained on the control flow cell and a blank run. Arrows indicate the beginning of each injection. The data illustrated are representative of three independent experiments. **E**. Binding and internalization of exogenous fluorescent TIMP-1 (fluo-TIMP-1) by CHO cells overexpressing minireceptor SPCT (left), DII (middle) or DIV (right). Binding was assessed by incubating fluo-TIMP-1 (10 nM) at 4°C for 2 hours. Cells were then transferred to 37°C for additional 2 h to allow internalization. All incubations were performed with or without RAP (500 nM), an antagonist of LRP-1-mediated binding and consequently, endocytosis. Fluorescence intensity was quantified by spectrophotometry and expressed as arbitrary units (A.U.). Values below 10 A.U. are considered to be nonspecific. Images in B–D are representative of results obtained in 3 independent experiments. Values in E represent the means \pm 6 s.e.m. of 3 independent experiments. NS, not significant; * $p < 0.05$, as compared to untreated cells.

anti-HA antibody, which revealed the expected molecular weights (Fig. 1B).

To investigate binding of TIMP-1 to the different LRP-1 constructs, CHO cells overexpressing SPCT, DII or DIV or not (CTRL) were transiently co-transfected with RFP-tagged TIMP-1. Co-immunoprecipitation experiments demonstrated that the antiHA tag antibody immunoprecipitated transfected RFP-TIMP-1 only in CHO cells expressing the domains II and IV of LRP-1 (Fig. 1C, left panel). Consistently, the anti-RFP antibody immunoprecipitated LRP-1 fusion proteins containing the domains II and IV (Fig. 1C, right panel). In both cases, no immunoprecipitation was obtained in SPCT-overexpressing cells.

We next verified whether TIMP-1 can physically interact with LRP-1 using SPR technology. LRP-1 domains II and IV were immunocaptured on a sensor chip and TIMP-1 or EGF was injected (Fig. 1D). As previously reported using soluble LRP-1 [8], EGF interacted neither with DII nor DIV. A direct interaction was demonstrated between TIMP-1 and LRP-1 domains II and IV, with a nanomolar range of affinity (Table 1). Interestingly, association rate (k_{on}) of TIMP-1 for DII is 10-fold faster than that for DIV,

while its dissociation rate (k_{off}) about twice for DII versus DIV. This results in an affinity of TIMP-1 5-fold higher for DII than for DIV. These data clearly demonstrate that soluble TIMP-1 directly binds cell-surface LRP-1, especially through its ligand-binding domains II and IV.

To study whether TIMP-1 undergoes internalization after binding to LRP-1 mini-receptors in CHO cells, we used eFluorconjugated recombinant TIMP-1 (fluo-TIMP-1) (Fig. 1E). At 4uC, we observed that fluo-TIMP-1 binds to CHO cells overexpressing DII or DIV constructs, such a binding being partially inhibited by RAP. No detectable fluo-TIMP-1 was measured at the surface of SPCT-overexpressing CHO cells. After 2 h at 37uC, about 50% of fluo-TIMP-1 bound to the surface of DII- and DIV-overexpressing cells was found internalized. The addition of RAP significantly impeded TIMP-1 endocytosis mediated by the LRP-1-derived minireceptors. Altogether, these data demonstrated that LRP-1 mediates the binding and uptake of TIMP-1 mainly through domains II and IV of its extracellular a-chain.

Table 1. Kinetics of TIMP-1 binding to LRP-1 domains II and IV.

Kinetics Values	DII	DIV
k_{on}	$(1.87 \pm 0.29) \times 10^6$	$(2.55 \pm 0.22) \times 10^5$
k_{off}	$(2.10 \pm 0.39) \times 10^{-2}$	$(1.35 \pm 0.55) \times 10^{-2}$
K_D	11.2 ± 0.5 nM	52.4 ± 18.2 nM

Data are based on three measurements using five different concentrations for each measurement. Mean values ± s.e.m. are presented.
 The k_{on} values are in $M^{-1}s^{-1}$, and k_{off} values are in s^{-1} .
 The equilibrium constants of dissociation (K_D) were calculated from the association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rate constants.

Data are based on three measurements using five different concentrations for each measurement. Mean values 6 s.e.m. are presented.

The k_{on} values are in $M^{-1}s^{-1}$, and k_{off} values are in s^{-1} .

The equilibrium constants of dissociation (K_D) were calculated from the association (k_{on}) and dissociation (k_{off}) rate constants.

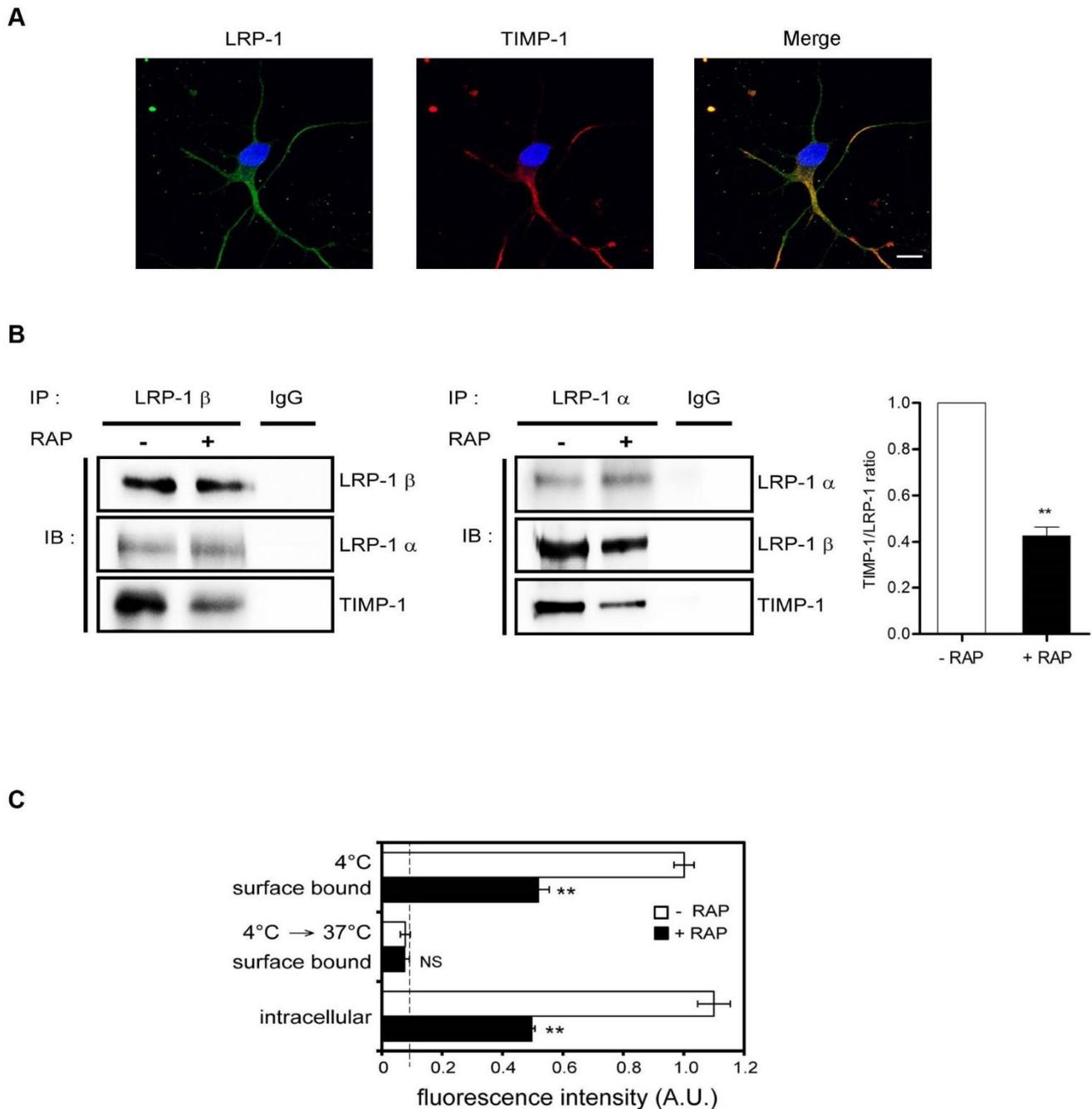


Figure 2. Endogenous TIMP-1 interacts with LRP-1 in cortical neurons. A. Cortical neurons from mouse embryos were plated onto poly-Llysine-coated coverslips for 24 h at 37uC, fixed, washed and stained with anti-LRP1 antibody (Alexa Fluor 488, green) and anti-TIMP-1 antibody (Alexa Fluor 568, red) before confocal microscopy analysis. Nuclei were counterstained with DAPI (blue) and appropriate secondary antibody controls were performed. LRP-1 labeling (left), TIMP-1 labeling (middle), and a merged image (right) are shown. B. Biotinylation of cell-surface proteins was conducted at 4uC from cortical neurons previously treated for 24 h with or without RAP (500 nM). Proteins were affinity precipitated with avidinagarose beads, then LRP-1-containing complexes were immunoprecipitated by either anti-LRP-1 b-chain (LRP-1 b; left panel) or anti-LRP-1 a-chain (LRP-1 a; middle panel) and analyzed by western-blot using anti-LRP-1 b-chain (5A6), anti-LRP-1 a-chain (8G1) and anti-TIMP-1 antibodies. Nonspecific IgGs were used as a negative control of immunoprecipitation. The presence of TIMP-1 in immunocomplexes was quantified by densitometric analysis relative to immunoprecipitated LRP-1-a-chain (histogram, right panel). C. Binding and internalization of exogenous fluorescent TIMP-1 (fluo-TIMP-1) by cortical neurons. Binding was determined by incubating fluo-TIMP-1 at 4uC for 2 h. After extensive washes, part of the cells was used to quantify total binding. The other part was incubated at 37uC for an additional 1 h to permit endocytosis. Experiments were carried out with or without RAP (500 nM). Fluorescence intensity was quantified by spectrophotometry and expressed as arbitrary units (A.U.). Values below 10 A.U. are considered to be nonspecific. Images in A and B are representative of results obtained in 3 independent experiments. Values in B and C represent the means \pm s.e.m. of 3 independent experiments. NS, not significant; ** $p < 0.01$, as compared to untreated cells. Scale bar: 5 μ m.

Interaction of TIMP-1 with LRP-1 at the plasma membrane of cortical neurons promotes its internalization

We next investigated whether there was a functional interplay between TIMP-1 and LRP-1 in a relevant culture model of primary cortical neurons, which express both TIMP-1 and LRP-1 [19,26]. Confocal imaging analysis using anti-LRP1 and antiTIMP-1 antibodies (Fig. 2A) revealed that endogenous LRP-1 and TIMP-1 co-localized, especially along neurites, as evidenced by overlay image. To confirm these results, co-immunoprecipitation experiments were carried out from cell-surface proteins. We efficiently immunoprecipitated both endogenous LRP-1 a-chain and LRP-1 b-chain with antibodies directed either against the extracellular part of the b-chain (Fig. 2B, left panel) or against the a-chain (Fig. 2B, right panel). TIMP-1 was found co-immunoprecipitated with LRP-1-containing complexes in each co-immunoprecipitation assay in basal conditions (Fig. 2B). Furthermore, the amount of immunoprecipitated TIMP-1 decreased about 2-fold upon RAP treatment (Fig. 2B, graph). These data demonstrated for the first time that endogenous LRP-1 and TIMP-1 might indeed interact at the surface of cortical neurons.

To examine whether such an interaction may lead to TIMP-1 internalization, neurons were incubated with fluo-TIMP-1 in the presence or in the absence of RAP (Fig. 2C). After incubation at 4uC to permit fluo-TIMP-1 binding to the cell surface, they were transferred to 37uC to allow endocytosis. Addition of RAP inhibited by 2-fold both binding and internalization of fluoTIMP-1, suggesting that TIMP-1 is mainly endocytosed in neurons in an LRP-1-dependent pathway.

Interaction of TIMP-1 with LRP-1 at the surface of cortical neurons alters neurite outgrowth and growth cone morphology

To demonstrate the biological/functional relevance of TIMP1/LRP-1 interactions, we evaluated the response of neurons to TIMP-1 treatment. For this purpose, cortical neurons were labeled with anti-bIII tubulin antibodies to visualize the microtubule cytoskeleton and measure neurite outgrowth (Fig. 3A and 3B). A significant decrease in neurite mean length was observed after 30 min of 10 nM TIMP-1 treatment compared to untreated control cells. Interestingly, TIMP-1-mediated inhibition of neurite outgrowth was abolished by RAP treatment. Similar inhibition of neurite outgrowth was obtained using R2629, a previously validated LRP-1 blocking antibody [24].

RAP and blocking antibodies alone had no effect on neuronal morphology. These results demonstrated that TIMP-1 triggers rapid effects that modulate neurite outgrowth and that depend on its interaction with LRP-1.

We further investigated the effect of TIMP-1 on the structural plasticity of cortical neurons by analyzing the growth cone volume, a paradigmatic actin-rich structure. F-actin staining with Texas Red phalloidin revealed a 2.8-fold increase in the volume of growth cones after 30 min treatment with TIMP-1 (Fig. 4A and 4B). The inhibition of LRP-1 with RAP or blocking LRP-1 antibodies prevented the increase in growth cone size upon TIMP1 treatment. Again, RAP and blocking antibodies alone did not affect cellular morphology.

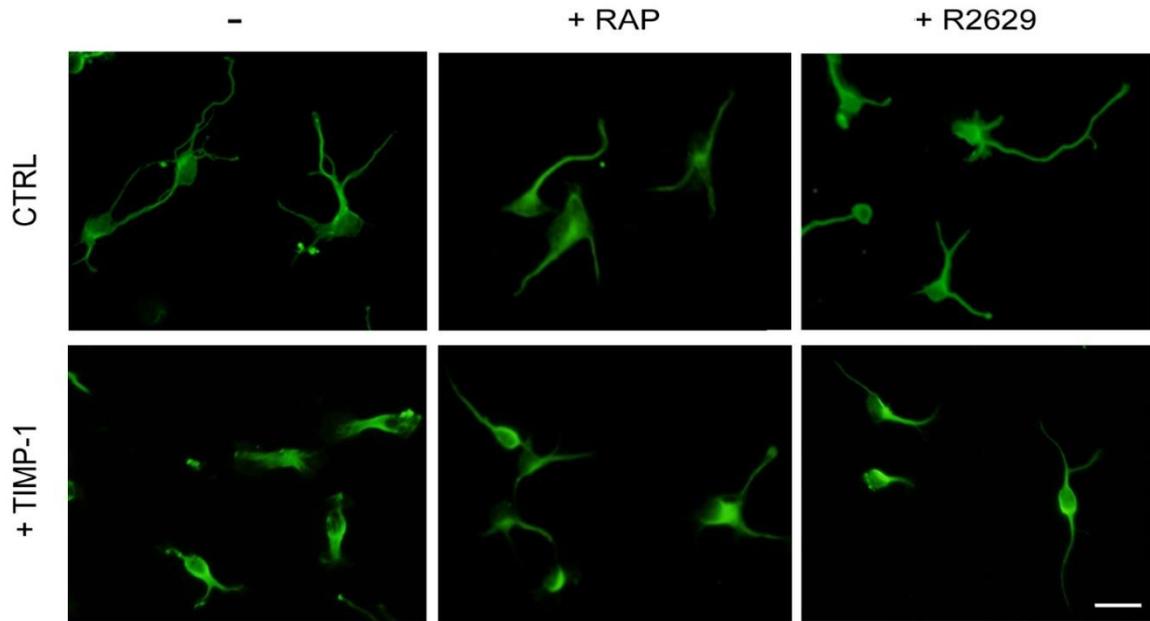
Changes in the morphology of cortical neurons are not related to the inhibitory function of TIMP-1

We next sought to determine whether the short-term effects of TIMP-1 on neurite outgrowth and growth cone size was related to MMP-2 inhibition, as previously suggested for long-term effects of TIMP-1 [19]. For this purpose, we used T2G mutant, a mutated inactive form of full-length TIMP-1 in which the threonine-2

substitution to glycine abrogates its MMP inhibitory activity except for MMP-9 [23], which was not produced by murine cortical neurons early after explantation [19]. We experimentally confirmed that T2G mutant, contrary to full-length TIMP-1, failed to inhibit MMP-2 activity, with Ki values equal to 18.9 and 0.09 nM, respectively.

Confocal imaging analysis of cortical neurons revealed that T2G mutant was highly co-localized with endogenous LRP-1, as observed for TIMP-1 (Fig. 5A). We next compared the effects of T2G to those of full-length TIMP-1 on cortical neuron morphology. After 30 min of treatment, as observed using fulllength TIMP-1, the T2G mutant reduced the neurite mean length (Fig. 5B) and increased the volume of growth cones by about 2-fold (Fig. 5C). Again, RAP or R2629 treatments prevented the effects of the T2G mutant (Fig. 5B and 5C). These data indicate that TIMP-1-mediated modulation of neuron morphology is not related to its MMP inhibitory activity, but rather depends on its ability to interact with LRP-1.

A



B

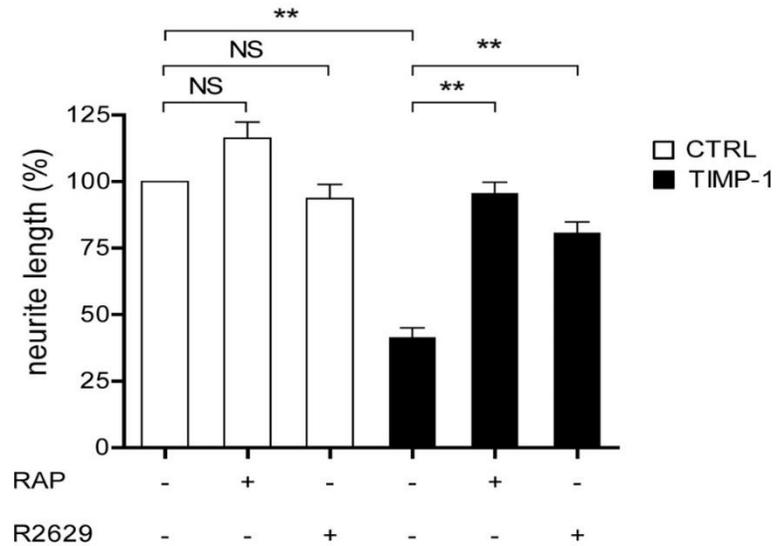
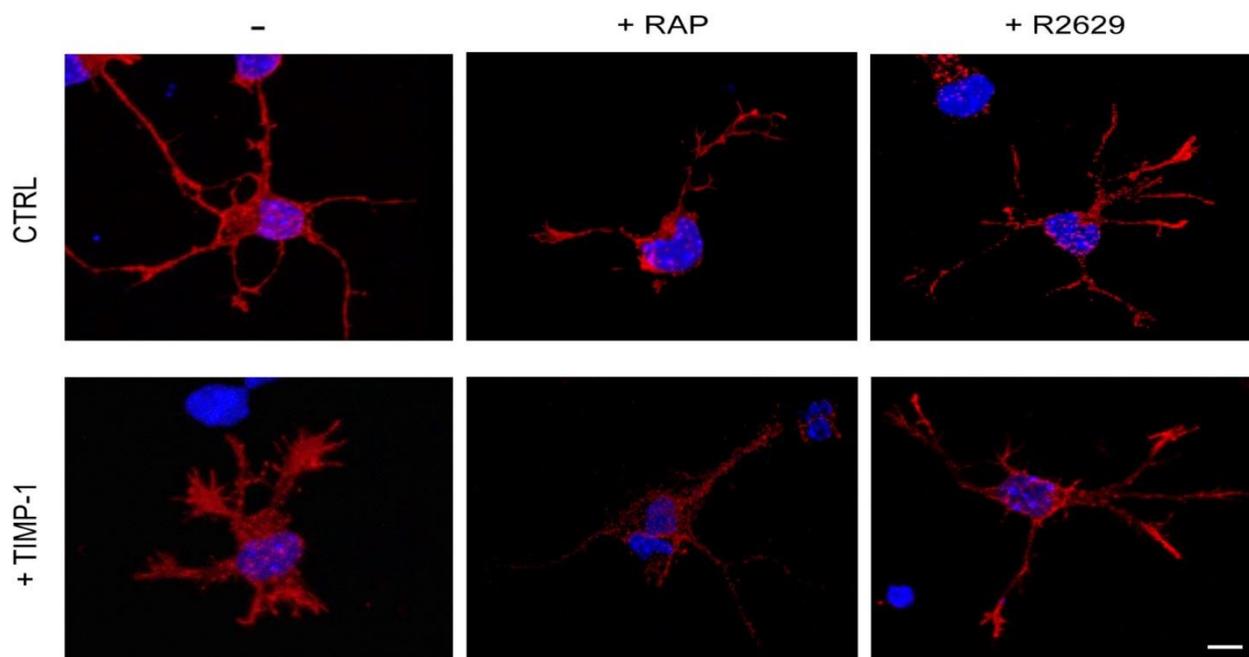


Figure 3. TIMP-1 binding to LRP-1 reduces neurite length. A. Cortical neurons from mouse embryos were cultured for 24 h on poly-L-lysinecoated coverslips and then treated for 30 min with TIMP-1 (10 nM), RAP (500 nM), blocking LRP-1 polyclonal antibodies (R2629) or a combination of TIMP-1+RAP and TIMP-1+R2629. Untreated cells served as control (CTRL). Cells were labeled with anti- β -tubulin monoclonal antibody and observed under confocal microscopy. B. Quantification of neurite mean length per cell was performed using the ImageJ plugin NeuronJ and expressed as percent of untreated neurons (CTRL). Images in A are representative of results obtained in 3 independent experiments. Values in B represent the means \pm s.e.m. of 3 independent experiments. NS, not significant; ** $p < 0.01$. Scale bar: 10 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0103839.g003

A



B

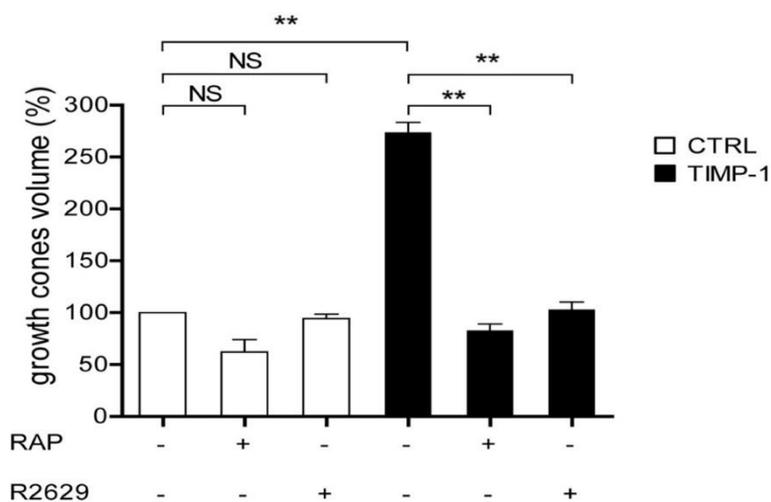


Figure 4. TIMP-1 binding to LRP-1 increases growth cone volume. A. Cortical neurons from mouse embryos were treated after 24 h growing on poly-L-lysine-coated coverslips for 30 min with TIMP-1 (10 nM), RAP (500 nM) or blocking LRP-1 polyclonal antibodies (R2629) or a combination of TIMP-1+RAP and TIMP-1+R2629. Untreated cells served as a control (CTRL). Neurons were incubated with Alexa Fluor 568-phalloidin to label F-actin structures and analyzed by confocal microscopy. B. 3D-quantification of growth cone volume was performed using the AMIRA software and expressed as percent of untreated neurons (CTRL). Images in A are representative of results obtained in 3 independent experiments. Values in B represent the means \pm s.e.m. of 3 independent experiments. NS, not significant; ** p,0.01. Scale bar: 5 μ m.

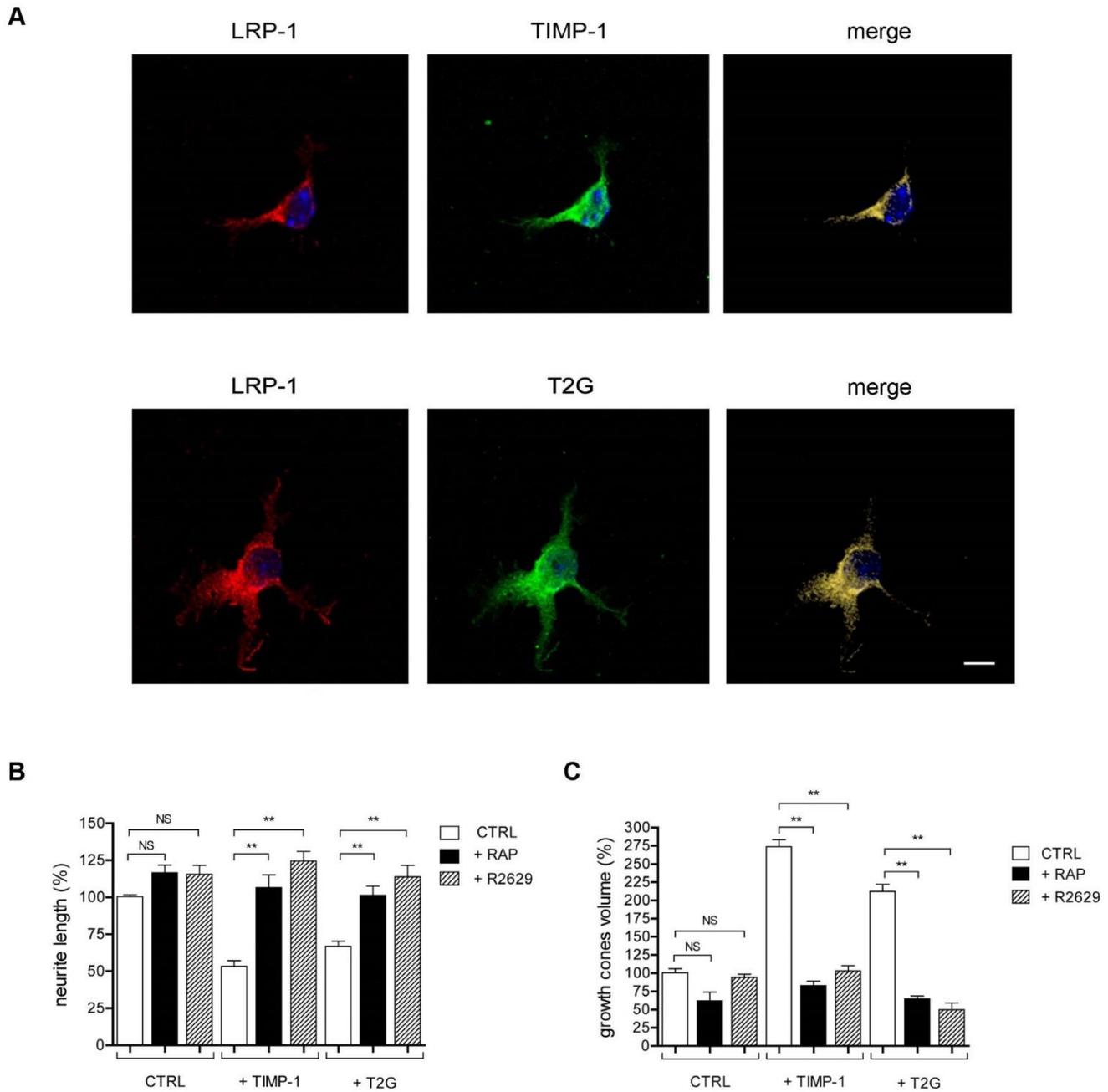


Figure 5. Inactive T2G mutant of TIMP-1 colocalizes with LRP-1 and exerts similar effects on the morphology of cortical neurons than wild-type TIMP-1. A. Cortical neurons from mouse embryos were allowed to grow during 24 h onto poly-L-lysine-coated coverslips, and treated for 30 min with FLAG-TIMP-1 (10 nM) or FLAG-T2G (10 nM). Neurons were then stained with anti-LRP-1 antibody (Alexa Fluor 568, red) or anti-FLAG antibody (Alexa Fluor 488, green) and analyzed by confocal microscopy. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Images were treated with the AMIRA software. Fluorescent signals corresponding to LRP-1, FLAG and colocalization were shown by red (left), green (middle) and cyan (right) labeling. B–C. Neurons were treated as indicated in A, in the absence or presence of RAP. B. Neurites were labeled with anti- β -tubulin antibody and observed under confocal microscopy. The neurite mean length per cell was determined using the ImageJ plugin NeuronJ and expressed as percent of untreated neurons (CTRL). C. Actin-rich growth cones were visualized with Alexa Fluor 568-phalloidin, observed under confocal microscopy and quantified using the AMIRA software (right panel). Images in A are representative of results obtained in 3 independent experiments. Values in B and C represent the mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments. NS, not significant; ** $p < 0.01$. Scale bar: 5 μ m.

Discussion

In this study, we have demonstrated that CHO cells overexpressing LRP-1 mini-receptors bind and internalize TIMP-1. By SPR analysis, we evidenced a direct and strong interaction between TIMP-1 and the ligand-binding domains DII and DIV from the extracellular LRP-1 a-chain. We have shown that primary cortical neurons from murine embryos also endocytose TIMP-1 by a mechanism dependent on LRP-1. Interaction between TIMP-1 and LRP-1 modulates neuronal outgrowth and morphology. Altogether, these data indicate that LRP-1 is a cellular receptor of TIMP-1 and functions as signaling receptor in neurons.

LRP-1 is an endocytic receptor that binds several varieties of ligands [7], including members of the MMP family, MMP-2, -9 and -13 and of the TIMP family, TIMP-2 and -3 [27]. Previous study reported that MMP-9:TIMP-1 complex, but not TIMP-1 alone, bound to LRP-1 [10]. Using cell cultures and *in vitro* binding analysis, we clearly demonstrated that TIMP-1 directly binds to and is internalized by LRP-1, through interactions with the ligand-binding domains DII and DIV of the extracellular achain. This is a common feature among LRP-1 extracellular ligands, with the exception of pro-cathepsin D that binds to the short extracellular part of the b-chain [12]. The detailed kinetic SPR analyses of TIMP-1 interaction with DII and DIV indicate that DII appears to be the most efficient domain to bind TIMP-1. This has been already observed for other extracellular ligands such as pro-urokinase, pro-uPA and tissue-type plasminogen activator complexed to plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1 [28]. In contrast, we recently showed that cell membrane receptor CD44 bound to LRP-1 by interacting with the fourth ligand-binding domain, DIV [25].

RAP, a powerful antagonist for LRP-1 binding [14], did not entirely abolish binding of TIMP-1 to the ligand-binding domains DII and DIV but significantly inhibited its internalization. Similarly, RAP fails to inhibit the binding of MMP-13 [11] and proMMP-2:TIMP-2 [9] to LRP-1, but not their subsequent internalization. These data suggest the existence of RAP-insensitive co-receptor(s) allowing the further presentation of TIMP-1 to LRP-1 prior to endocytosis, as previously reported for the trimolecular complex uPA:PAI-1:uPA receptor [29]. In this sense, CD44 [4] and CD63 [6] both bind TIMP-1 and could act as LRP1 co-receptor. Furthermore, binding to cortical neurons and internalization of TIMP-1 were only partially inhibited by RAP, as previously shown for TIMP-2 [9] and TIMP-3 [22] in different cell culture models. These studies thus suggest that TIMP-1, as TIMP-2 and TIMP-3, was endocytosed by both LRP-1-dependent and -independent pathways. It would be interesting to determine whether the LRP-1-independent endocytosis is identical for TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3. A new member of the LDL receptor family, LRAD3, involved in amyloid precursor protein trafficking by a RAP-insensitive mechanism has been identified in the cortex and hippocampus [30]. LRAD3 could thus represent a candidate for mediating the LRP-1-independent endocytosis of TIMP-1 observed in neurons.

We have previously reported that full-length TIMP-1 and its truncated N-terminal domain, which retained full MMP inhibition capacity [31], modulated neurite outgrowth and

morphology of cortical neurons after relative long exposures of 24 h. In the same experimental paradigm, the mutated T2G N-terminal truncated form lacking MMP inhibitory activity [23] did not alter neuronal plasticity [19]. From these results, we concluded that TIMP-1 modulates neuronal outgrowth and morphology through, at least in part, the inhibition of MMPs, in particular MMP-2, which is abundantly expressed by these developing neurons. In the present study a short exposure (30 min) to TIMP-1 similarly decreased neurite length and increased growth cone size, but remarkably the TIMP-1 effects were independent of its inhibitory action on MMPs. Indeed, the full-length T2G mutant, unable to inhibit most MMPs including MMP-2, modulated neuronal plasticity through its interaction with LRP-1. These differences observed with two mutants that only differ by the absence or presence of the C-terminal part of TIMP-1, points out the bi-functionality of TIMP-1, exhibiting not only MMP inhibition but also MMP-independent regulation of cell signaling and biological activities, as previously reviewed [3,32]. Although challenging, the identification of TIMP-1 residues involved in signal transduction would be of real interest to provide a better understanding of the dual action of this molecule.

The ability of TIMP-1 to mediate MMP-independent signal transduction was reported in few cell types but never in neurons [3]. For instance, TIMP-1 was shown to associate with cell-surface CD44 and proMMP-9 to promote erythroid cell survival through the PI3kinase/Akt signaling pathway [4,5]. Additionally, TIMP-1 was reported to interact with CD63 to regulate epithelial cell survival via the ERK signaling pathway [6], and mesenchymal stem cell functions through let-7f microRNA and Wnt/b-catenin signaling [33]. Such interactions have not been reported for TIMP-1 in neurons, but TIMP-2, another member of the TIMP family, has been shown to promote neuronal differentiation through binding to $\alpha 3 \beta 1$ integrin in a MMP-independent manner [34]. We may hypothesize that in response to a sudden increase of TIMP-1 levels as those reported in neurons after acute hyperactivity/excitotoxic lesions [35,36], TIMP-1 rapidly triggers changes in neuron morphology through interaction with LRP-1. However, chronic TIMP-1 exposures associated for instance with inflammatory processes may set in motion alternative pathways that involve the inhibition of MMPs, which lead eventually to the same biological effects: the inhibition of neurite outgrowth.

Several LRP-1 ligands, such as apoE-containing lipoproteins and $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ M), promote neurite outgrowth [37]. Mantuano and co-workers [38] demonstrated that this promoting effect exerted by binding of $\alpha 2$ M to LRP-1 was dependent on Akt and ERK activation. More recently, Shi and colleagues [39] described a signaling pathway whereby $\alpha 2$ M or tissue-type plasminogen activator binding to LRP-1 resulted in Src family kinase activation leading to Trk receptor transactivation. These authors conclude that Trk receptor transactivation was necessary for activation of Akt and ERK and for neurite outgrowth downstream to LRP-1. In contrast, a recent report analyzed the involvement of LRP-1 in the inhibition of neurite outgrowth by serving myelin-associated glycoprotein receptor [40]. Similarly, our data clearly show that TIMP-1 binding to LRP-1 inhibited

neurite outgrowth. However, the intracellular signaling pathway engaged by LRP-1-mediated endocytosis of TIMP-1 remains to be deciphered.

In conclusion, this study shows that independently of MMP inhibition, TIMP-1 acts as a cytokine-like molecule through its binding to LRP-1. Our data strongly suggest that LRP-1 functions as a versatile signaling receptor whose cell response

appears mainly dependent of the stimuli and cell environment. We propose that LRP-1 constitutes a new functional relay that modulates neuronal plasticity in response to cytokine-like activity of TIMP-1. In this sense, LRP-1 could represent a valuable therapeutic target for the modulation of potentially deleterious effects of TIMP-1.

Acknowledgments

The authors thank Prof. H. Nagase (Kennedy Institute of Rheumatology, University of Oxford, London, United Kingdom) for giving human recombinant TIMP-1. They are grateful to Dr. D.K. Strickland (Department of Surgery, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA) and Dr. M. S. Nielsen (Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus, Denmark) for providing us with the R2629 antibodies and pT7H6FX-RAP construct, respectively. They thank J.L. Breda for animal care and C. Terryn (SFR Cap-Santé, Reims) for technical support with confocal imaging. The authors acknowledge S. Ricord for editorial assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SD HE. Performed the experiments: JT LV AJ CS CH GF MD. Analyzed the data: JD NE LM EC MK SR SD HE. Contributed to the writing of the manuscript: SD HE.

References

1. Brew K, Nagase H (2010) The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 1803: 55–71.
2. Stetler-Stevenson WG (2008) Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 8: re6.
3. Ries C (2014) Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci* 71: 659–672.
4. Lambert E, Bridoux L, Devy J, Dasse E, Sowa ML, et al. (2009) TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 1102–1115.
5. Bridoux L, Etique N, Lambert E, Thevenard J, Sowa ML, et al. (2013) A crucial role for Lyn in TIMP-1 erythroid cell survival signalling pathway. *FEBS Lett* 587: 1524–1528.
6. Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR (2006) Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 25: 3934–3942.
7. Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK (2008) LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 88: 887–918.
8. Yang Z, Strickland DK, Bornstein P (2001) Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* 276: 8403–8408.
9. Emonard H, Bellon G, Troeberg L, Berton A, Robinet A, et al. (2004) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of proMMP-2:TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem* 279: 54944–54951.
10. Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK (2001) The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* 276: 15498–15503.
11. Barmina OY, Walling HW, Fiocco GJ, Freije JM, Lo'pez-Ott' n C, et al. (1999) Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J Biol Chem* 274: 30087–30093.
12. Beaujouin M, Pre'bois C, Derocq D, Laurent-Matha V, Masson O, et al. (2010) Pro-cathepsin D interacts with the extracellular domain of the beta chain of LRP1 and promotes LRP1-dependent fibroblast outgrowth. *J Cell Sci* 123: 3336–3346.
13. Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Batten F, Behre E, et al. (1991) Primary structure of alpha 2-macroglobulin receptor-associated protein. Human homologue of a Heymann nephritis antigen. *J Biol Chem* 266: 13364–13369.
14. Obermoeller-McCormick LM, Li Y, Osaka H, FitzGerald DJ, Schwartz AL, et al. (2001) Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *J Cell Sci* 114: 899–908.
15. Herz J, Clouthier DE, Hammer RE (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71: 411–421.
16. Dedieu S, Langlois B, Devy J, Sid B, Schneider C, et al. (2008) LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. *Mol Cell Biol* 28: 2980–2995.
17. Langlois B, Perrot G, Schneider C, Henriot P, Emonard H, et al. (2010) LRP-1 promotes cancer cell invasion by supporting ERK and inhibiting JNK signaling pathways. *PLoS One* 5: e11584.
18. Rivera S, Khrestchatsky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM (2010) Zincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci* 30: 15337–15357.
19. Ould-yahoui A, Tremblay E, Sbai O, Ferhat L, Bernard A, et al. (2009) A new role for TIMP-1 in modulating neurite outgrowth and morphology of cortical neurons. *PLoS One* 4: e8289.
20. May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, et al. (2004) Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol Cell Biol* 24: 8872–8883.
21. Troeberg L, Fushimi K, Khokha R, Emonard H, Ghosh P, et al. (2008) Calcium pentosan polysulfate is a multifaceted exosite inhibitor of aggrecanases. *FASEB J* 22: 3515–3524.
22. Scilabra SD, Troeberg L, Yamamoto K, Emonard H, Thøgersen I, et al. (2013) Differential regulation of extracellular tissue inhibitor of metalloproteinases-3 levels by cell membrane-bound and shed low density lipoprotein receptor-related protein 1. *J Biol Chem* 288: 332–342.
23. Hamze AB, Wei S, Bahudhanapati H, Kota S, Acharya KR, et al. (2007) Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors. *Protein Sci* 16: 1905–1913.
24. Mikhailenko I, Batten FD, Migliorini M, Ruiz JF, Argraves K, et al. (2001) Recognition of alpha 2-macroglobulin by the low density lipoprotein receptor-related protein requires the cooperation of two ligand binding cluster regions. *J Biol Chem* 276: 39484–39491.
25. Perrot G, Langlois B, Devy J, Jeanne A, Verzeaux L, et al. (2012) LRP-1/CD44, a new cell surface complex regulating tumor cell adhesion. *Mol Cell Biol* 32: 3293–3307.
26. Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL (1994) Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem* 269: 18521–18528.
27. Etique N, Verzeaux L, Dedieu S, Emonard H (2013) LRP-1: a checkpoint for the extracellular matrix proteolysis. *BioMed Res Int* 2013: article ID 152163.
28. Neels JG, van den Berg BMM, Lookena A, Olivecrona G, Pannekoek H, et al. (1999) The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem* 274: 31305–31311.

29. Czekay RP, Kuemmel TA, Orlando RA, Farquhar MG (2001) Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol Cell Biol* 12: 1467–1479.
30. Ranganathan S, Noyes NC, Migliorini M, Winkles JA, Battey FD, et al. (2011) LRAD3, a novel low-density lipoprotein receptor family member that modulates amyloid precursor protein trafficking. *J Neurosci* 31: 10836–10846.
31. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O’Shea M, et al. (1991) The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30: 8097–8102.
32. Lambert E, Dasse’ E, Haye B, Petitfre’ re E (2004) TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49: 187–198.
33. Egea V, Zahler S, Rieth N, Neth P, Popp T, et al. (2012) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/b-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E309– E316.
34. Pe’ rez-Marti’ nez L, Jaworski DM (2005) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J Neurosci* 25: 4917–4929.
35. Rivera S, Tremblay E, Timsit S, Canals O, Ben-Ari Y, et al. (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J Neurosci* 17: 4223–4235.
36. Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, et al. (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* 15: 19–32.
37. Qiu Z, Hyman BT, Rebeck GW (2004) Apolipoprotein E receptors mediate neurite outgrowth through activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase in primary neurons. *J Biol Chem* 279: 34948–34956.
38. Mantuano E, Mukandala G, Li X, Campana WM, Gonias SL (2008) Molecular dissection of the human alpha2-macroglobulin subunit reveals domains with antagonistic activities in cell signaling. *J Biol Chem* 283: 19904–19911.
39. Shi Y, Mantuano E, Inoue G, Campana WM, Gonias SL (2009) Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway. *Sci Signal* 2: ra18.
40. Stiles TL, Dickendeshler TL, Gaultier A, Fernandez-Castaneda A, Mantuano E, et al. (2013) LDL receptor-related protein-1 is a sialic-acid-independent receptor for myelin-associated glycoprotein that functions in neurite outgrowth inhibition by MAF and CNS myelin. *J Cell Sci* 126: 209–220.

Partie II :
Etude *in silico* de la dynamique du
TIMP-1

Les activités biologiques du TIMP-1 indépendantes de l'inhibition des MMPs et induites par sa fixation aux récepteurs pro-MMP-9/CD44, CD63/intégrine β 1 ou encore LRP-1 pourraient avoir des effets délétères dans certains cancers ou certaines maladies neurodégénératives (D'Angelo et al., 2014; Thevenard et al., 2014; Xia et al., 2012). Bloquer l'interaction du TIMP-1 avec ses différents récepteurs présente donc un intérêt thérapeutique majeur. Cette approche nécessite cependant une parfaite caractérisation des domaines du TIMP-1 qui se lient aux différents récepteurs identifiés. Si actuellement les résidus du TIMP-1 impliqués dans sa liaison et dans l'inhibition des MMPs sont bien caractérisés (Bode et al., 1999; Gupta and Patil, 2012), ceux impliqués dans sa liaison aux différents récepteurs et dans ses activités cytokiniques n'ont pas été identifiés.

A l'heure actuelle, l'étude des interactions protéine-protéine fait appel à des approches *in silico* afin de rationaliser les méthodes expérimentales. L'amarrage moléculaire ou docking moléculaire est une méthode particulièrement adaptée à ce type d'étude. Cependant, cette méthode nécessite des données structurales précises issues de la cristallographie aux rayons X ou de la RMN pour chacun des deux partenaires. Ce type de données est disponible pour le TIMP-1, en revanche seules des données partielles existent pour les récepteurs CD63 et LRP-1 du fait de la taille importante de LRP-1 et de la présence de nombreuses régions non ordonnées dans CD63. L'amarrage moléculaire semble donc difficile à mettre en œuvre dans le cadre du TIMP-1 et ses récepteurs et c'est la raison pour laquelle nous avons choisi une autre stratégie innovante.

Nous sommes partis du constat que les interactions des protéines avec leurs récepteurs impliquent le plus souvent des changements conformationnels de l'un et/ou l'autre des partenaires (Jiang et al., 2014; Mittag et al., 2010). Ces changements conformationnels peuvent être mis en évidence par l'étude de la dynamique des protéines. Nous avons étudié la dynamique du TIMP-1 et émis l'hypothèse que perturber ses changements conformationnels pourrait bloquer sa liaison aux récepteurs et/ou les effets cellulaires associés. Les analyses de modes normaux (NMA) couplées à la dynamique moléculaire sont deux méthodes particulièrement adaptées à l'étude de la dynamique intrinsèque des protéines (Floquet et al., 2006). En effet, les modes normaux donnent accès au mouvement de grande amplitude des domaines protéiques grâce au calcul des modes de basses fréquences (Skjaerven et al., 2009). Les simulations issues de la dynamique moléculaire permettent de calculer le déplacement des atomes à des échelles de l'ordre de la nanoseconde (Doruker et al., 2000; Karplus and McCammon, 2002).

A

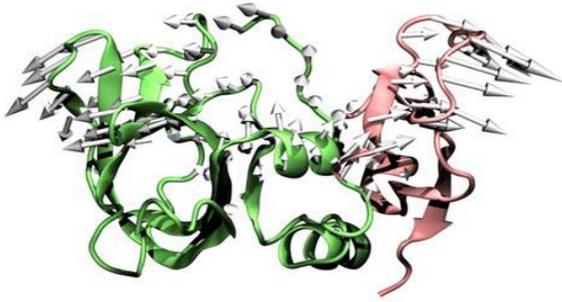
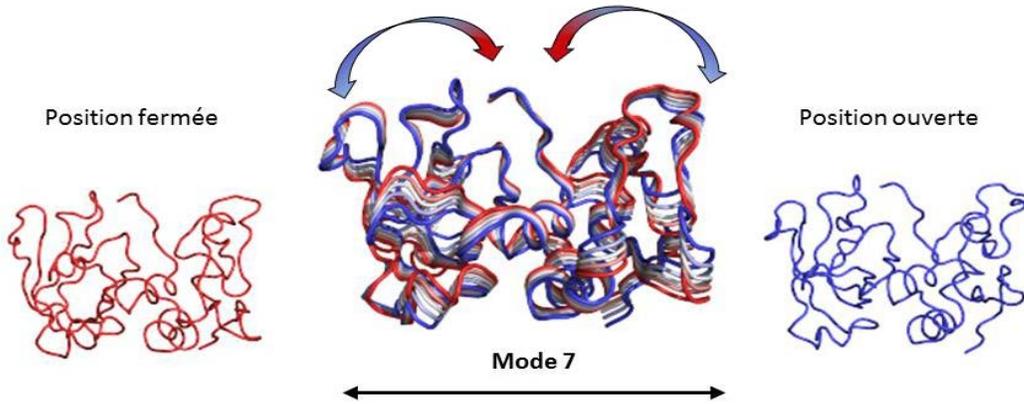


Figure 31: Représentation du mouvement du TIMP-1 issu du mode 7

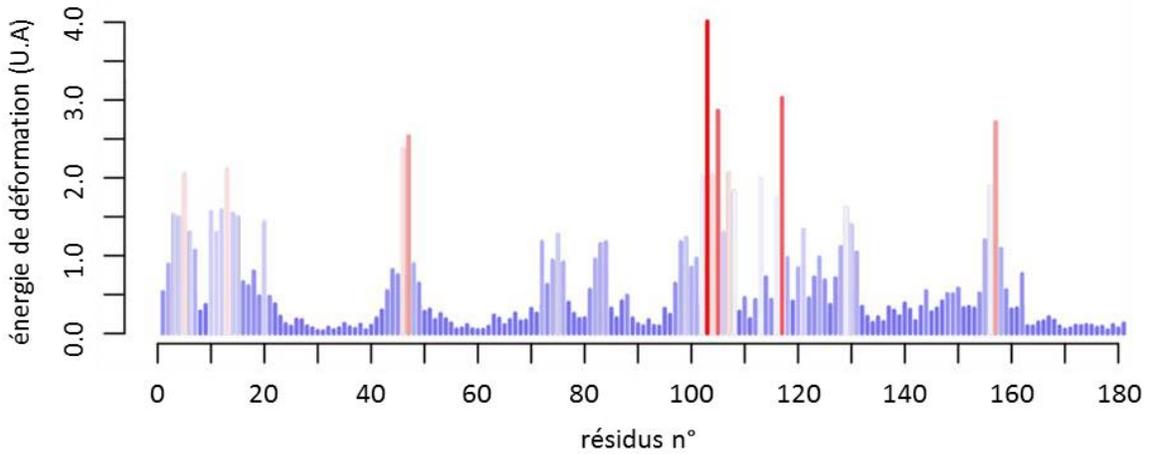
A. Représentation du mouvement du TIMP-1 selon le mode 7. Les flèches indiquent le sens du mouvement des différentes régions du TIMP-1

B. Représentation du passage de la position fermée du TIMP-1 à la position ouverte selon le mode 7

B



A



B

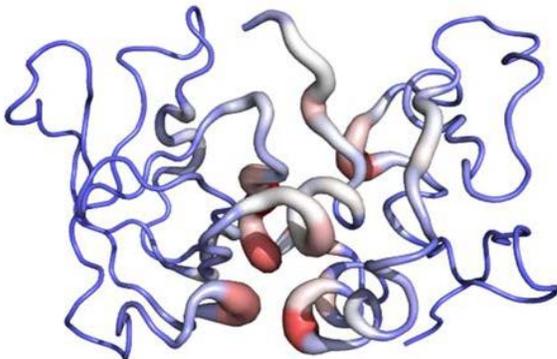


Figure 32: Etude de la contribution énergétique des différents résidus du TIMP-1 décrit par le mode 7

A. Histogramme représentant l'énergie de déformation des résidus du TIMP-1 selon le mode 7. Les faibles énergies de déformation sont représentées en bleu et les fortes énergies en rouge

B. Localisation des résidus possédant une forte énergie de déformation dans la structure tridimensionnelle du TIMP-1. Les résidus possédant une grande énergie de déformation sont représentés en rouge et plus épais

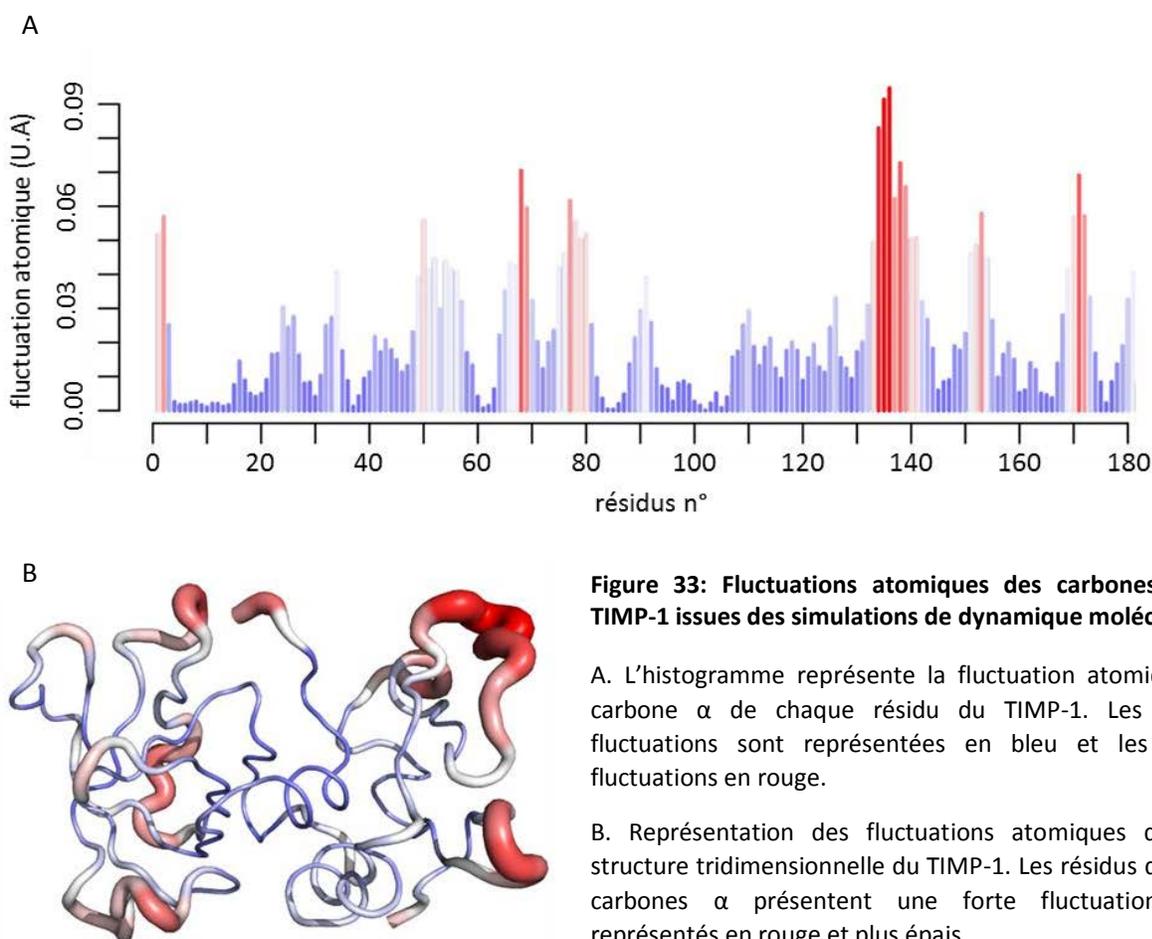
I. Analyse de Modes Normaux (NMA)

Les modes normaux sont calculés à partir de données structurales issues de la cristallographie et de la RMN. L'énergie de la structure tridimensionnelle du TIMP-1 (PDB n° 1UEA – Structure obtenue par cristallographie aux rayons X, Résolution : 2,8 Å) a tout d'abord été minimisée grâce aux algorithmes *steepest descent* et *Adopted Basis Newton–Raphson* (ABNR). L'analyse des modes normaux a été réalisée sur cette structure et a permis de générer un ensemble de modes ((3 x nombre d'atomes) - 6) présentant des mouvements intra-protéique différents. Les 6 premiers modes sont ceux de translation et rotation de la molécule (Hayward and de Groot, 2008; Reuter et al., 2003). Les modes suivants sont ceux de plus basse énergie à température ambiante et les modes 7 à 12 sont potentiellement ceux qui contribuent le plus aux mouvements de grande amplitude de la protéine. Pour cette étude, nous avons fait le choix de nous focaliser principalement sur le mode 7. Selon ce mode, le mouvement du TIMP-1, présenté dans la figure 31, peut être assimilé à un mouvement de pince réalisé par les domaines N- et C-terminaux.

Dans un second temps nous avons cherché à mettre en évidence les régions du TIMP-1 impliquées dans l'exécution de ce mouvement et ainsi identifier des acides aminés qui pourraient être essentiels à la dynamique d'interaction de cette protéine. Nous avons ainsi étudié l'énergie de déformation des différents résidus au cours du mode 7 ce qui permet de visualiser la contribution énergétique de chaque résidu lors de l'exécution du mouvement (Figure 32 A). L'histogramme obtenu montre des zones de faibles (en bleu) et de fortes (en rouge) contributions énergétiques réparties sur l'ensemble de la séquence du TIMP-1. Les résidus présentant une forte contribution énergétique sont répartis tout au long de la structure primaire du TIMP-1. Une autre représentation utilisant la structure tridimensionnelle du TIMP-1 (Figure 32 B) montre de façon très intéressante que les résidus présentant la plus grande énergie de déformation sont localisés dans la partie centrale de la protéine le long d'un axe situé entre les domaines N- et C-terminaux. Cette localisation est en accord avec le mouvement de pince décrit précédemment puisque cette région pourrait être assimilée à une "charnière" nécessaire à l'exécution du mouvement.

II. Dynamique moléculaire

En parallèle à l'analyse des modes normaux, nous avons réalisé des expériences de dynamique moléculaire mettant en évidence les fluctuations atomiques des différents acides aminés du TIMP-1 au cours du temps. Ces fluctuations reflètent leurs déplacements lors de la dynamique moléculaire (Figure 33 A). L'histogramme met en évidence des zones de faibles fluctuations (en bleu) et des zones de fortes fluctuations atomiques (en rouge) correspondant à des zones très mobiles de la protéine. Ces zones sont réparties tout au long de la structure primaire du TIMP-1. La localisation de ces zones dans la structure tridimensionnelle de la protéine montre qu'elles sont majoritairement situées à la périphérie de la molécule, dans des régions connues pour être principalement en interaction avec les métalloprotéases (Figure 33 B). De façon intéressante, les zones de faibles fluctuations atomiques correspondent à la région de fortes contributions énergétiques précédemment identifiée dans le mouvement de pince et cette localisation renforce le rôle de région "charnière" attribué à cette zone.



III. Identification de résidus impliqués dans le mouvement

A partir de ces données, nous avons cherché à identifier dans cette zone charnière des acides aminés dont la substitution pourrait entraîner une perturbation du mouvement. Dans un premier temps, nous avons superposé les données normalisées des énergies de déformation obtenues avec l'analyse des modes normaux avec les données normalisées des fluctuations atomiques issues de la dynamique moléculaire (Figure 34). Cette superposition met en évidence 7 zones (marquées par #) au sein desquelles l'énergie de déformation est maximale alors que les fluctuations atomiques sont relativement faibles.

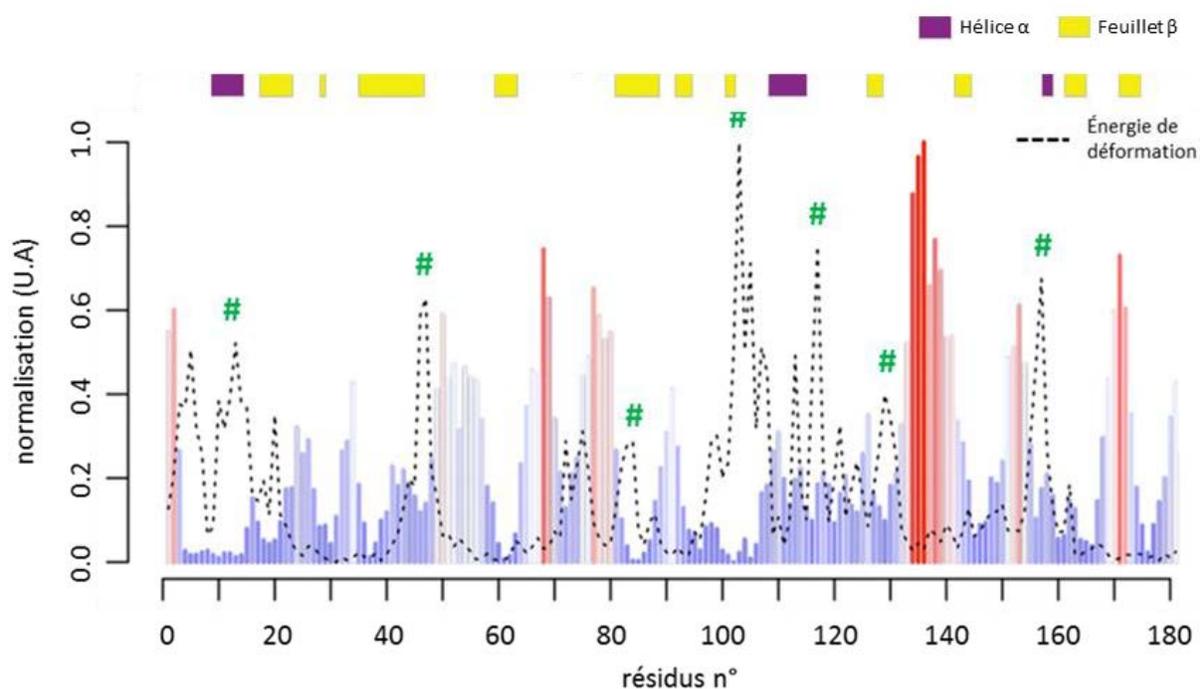


Figure 34: Superposition de l'énergie de déformation sur l'histogramme de fluctuation atomique du TIMP-1 lors de la dynamique moléculaire

Les valeurs d'énergie et de fluctuation sont normalisées afin de pouvoir superposer ces données # : Régions présentant une forte énergie de déformation et une faible fluctuation atomique. Les hélices α sont représentées en violet et les feuillets β en jaune

Dans ces zones, nous avons éliminé les résidus appartenant à des structures secondaires, de façon à ne pas perturber le repliement structural du TIMP-1 (Figure 34). Parmi les résidus appartenant aux 7 zones et en dehors des structures secondaires, trois résidus ont été identifiés comme susceptibles d'être

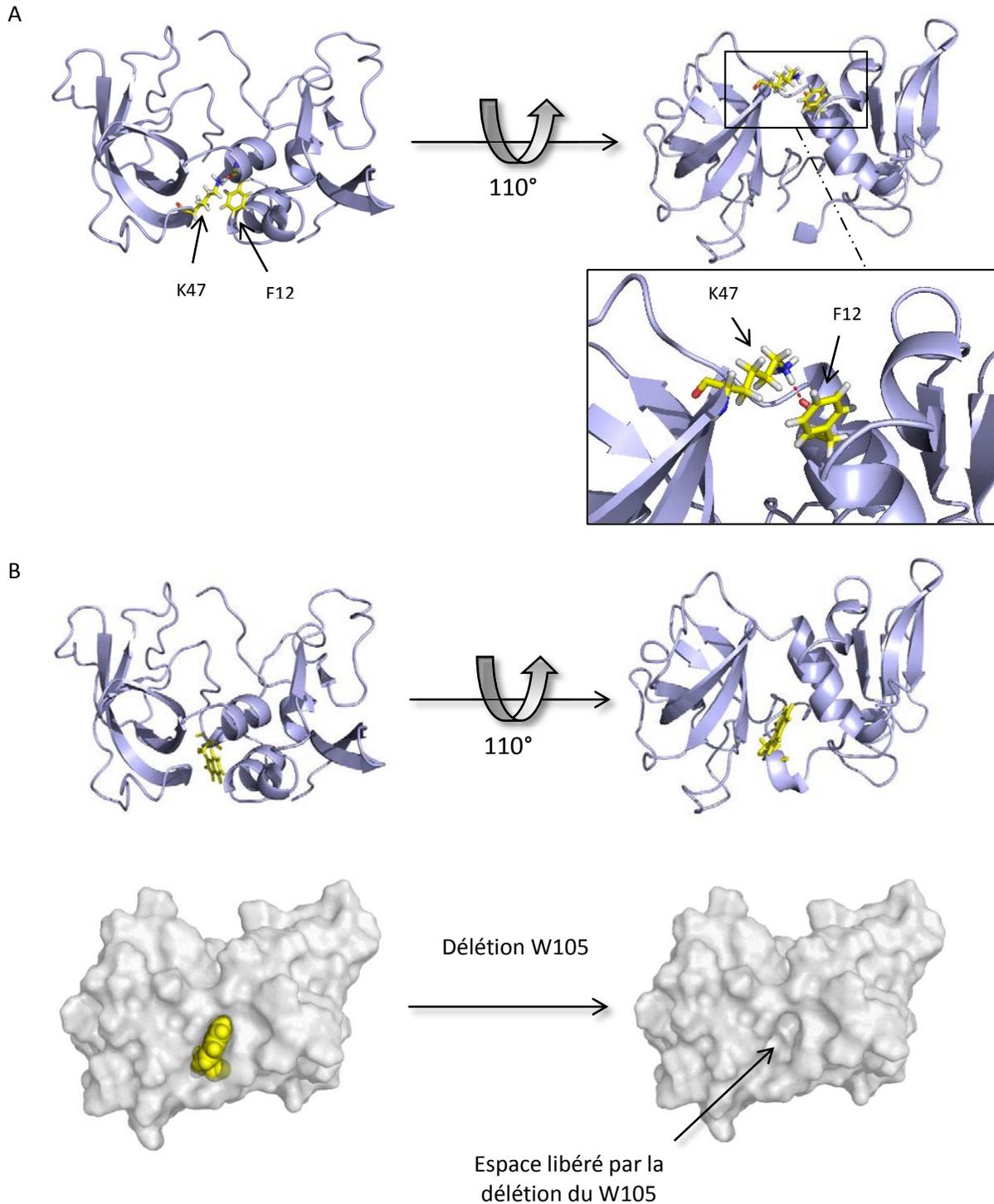


Figure 35: Localisation des résidus à muter dans la structure tridimensionnelle du TIMP-1

A. Localisation des résidus F12 et K47 se faisant face tout au long du mouvement et mise en évidence de l'interaction électrostatique

B. Localisation du W105 situé à l'entrée de la région charnière et présentant un encombrement stérique important visible en représentation surfacique après délétion

impliqués dans le mouvement de pince précédemment décrit : la phénylalanine 12 (F12), la lysine 47 (K47) et le tryptophane 105 (W105). Les résidus F12 et K47, localisés dans la région charnière, se font face tout au long du mouvement (Figure 35 A). Cette figure montre que ces deux résidus sont à une distance (inférieure à 3,2 Å) leur permettant de former une liaison hydrogène. Le troisième résidu ciblé est le tryptophane 105 (W105) qui se situe à l'entrée de la région charnière et présente un encombrement stérique important (Figure 35 B).

Partie III : Production de mutants du TIMP-1

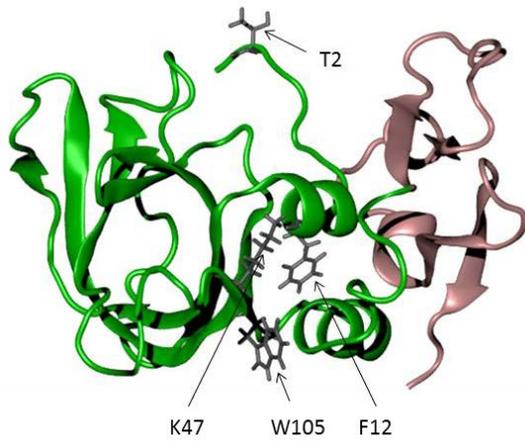


Figure 36: Représentation schématique des mutants du TIMP-1

A. Localisation des trois acides aminés substitués par une alanine dans la structure 3D du TIMP-1 ainsi que de la thréonine 2 substituée par une glycine

B. Représentation schématique de la séquence des mutants après mutagenèse dirigée et clonage dans le vecteur p3XFLAG CMV14



Trois acides aminés la phénylalanine 12 (F12), la lysine 47 (K47) et le tryptophane 105 (W105) ont été désignés comme susceptibles d'être impliqués dans la dynamique du TIMP-1.

I. Génération des mutants du TIMP-1

Nous avons décidé de générer trois mutants simples (F12A, K47A et W105A) dans lesquels chacun des acides aminés désigné a été substitué par une alanine. Le choix de la substitution par une alanine repose sur l'absence de charge électrostatique de cet acide aminé (contrairement aux résidus F12 et K47) et sur son faible encombrement stérique (contrairement au résidu W105). Un autre mutant dont la thréonine 2 a été substituée par une glycine (T2G) a également été généré. Cette mutation étant éloignée de la région charnière que nous avons ciblée, le mutant T2G servira de contrôle. Par ailleurs, les études réalisées avec ce mutant T2G, décrit comme ayant perdu ses capacités inhibitrices vis-à-vis des MMP-1, -2, -3 et -7, permettront de dissocier les effets du TIMP-1 dépendants de ceux indépendants de l'inhibition des MMPs.

Les séquences modifiées par mutagenèse dirigée ont été insérées dans le vecteur p3XFLAG-CMV-14 permettant l'expression de la protéine sauvage et des mutants dans des cellules eucaryotes et l'ajout d'un "tag" 3XFLAG à l'extrémité C-terminale des protéines (Figure 36). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage avant la poursuite des expérimentations.

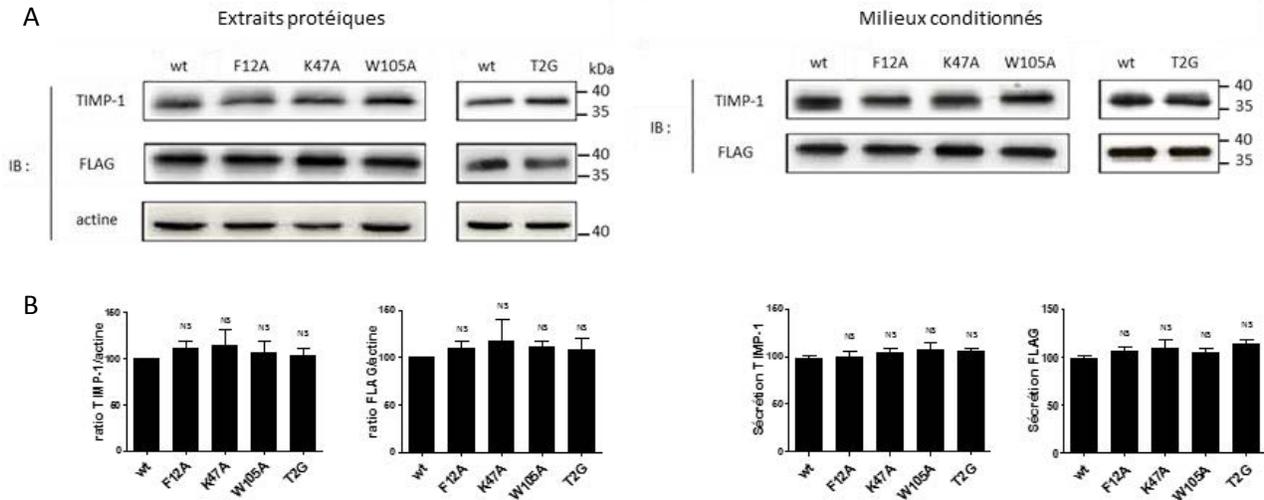


Figure 37: Etude de l'expression et de la sécrétion du TIMP-1 et des mutants par immunoempreinte

A. Les extraits cellulaires et les milieux conditionnés des cellules CHO stablement transfectées sont déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-TIMP-1, anti-FLAG et anti-actine sont réalisées.

B. Histogrammes de quantification de l'expression et la sécrétion du TIMP-1 et des mutants. Les pourcentages sont exprimés par rapport au TIMP-1 wt.

Les résultats présentés sont issus d'une expérience et sont représentatifs d'expérimentations réalisées en triplicata.

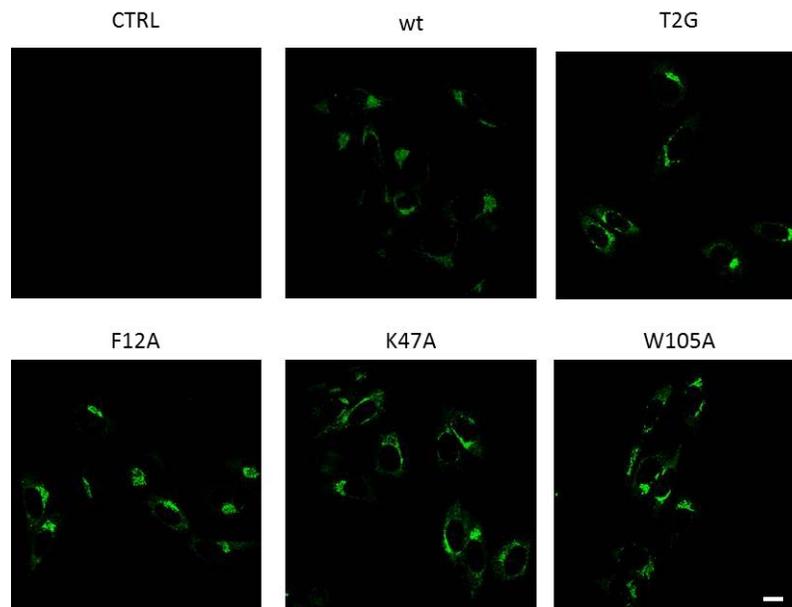


Figure 38: Etude de l'expression du TIMP-1 et des mutants par immunofluorescence

Les cellules CHO stablement transfectées avec le vecteur pCMV-3XFLAG contenant le TIMP-1 sauvage ou les mutants sont ensemencées sur lamelles de verre. Un immunomarquage est réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre le TIMP-1 (clone 7-6C1). Cet anticorps est détecté à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor 488. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. Barre d'échelle : 5 µm

II. Production du TIMP-1 et des mutants

Les vecteurs permettant l'expression du TIMP-1 sauvage et des mutants ont été transfectés de façon stable dans la lignée cellulaire CHO. Le choix de cette lignée est justifié par sa haute transfectabilité et parce qu'elle permet d'avoir une maturation des protéines de type eucaryote (repliement et glycosylation). Des extraits protéiques ainsi que les milieux conditionnés des différentes lignées cellulaires obtenues ont été déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-TIMP-1, anti-FLAG et anti-actine ont été réalisées afin de vérifier l'expression et la sécrétion des différents mutants (Figure 37 A).

La figure 37 montre que le TIMP-1 sauvage et les mutants sont exprimés par les cellules, qu'ils sont sécrétés dans le milieu de culture et qu'ils possèdent tous le tag 3XFLAG. Les protéines sécrétées sont glycosylées car on observe une bande à la masse moléculaire attendue de 37 kDa. Ces résultats montrent également que les différentes mutations n'affectent pas l'expression et la sécrétion de la protéine ni sa reconnaissance par l'anticorps anti-TIMP-1 (clone 7-6C1). En effet, l'intensité évaluée par densitométrie des bandes obtenues avec les anticorps anti-TIMP-1 et anti-FLAG pour les différents mutants est équivalente à celle du TIMP-1 sauvage (Figure 37 B).

Ces résultats ont été confirmés par immunofluorescence réalisée dans les lignées de cellules CHO transfectées avec le TIMP-1 sauvage et les mutants (Figure 38). Les immunomarquages montrent une détection et une localisation similaires des mutants TIMP-1 par rapport à celles du TIMP-1 sauvage.

III. Purification du TIMP-1 et des mutants

Le TIMP-1 et les mutants produits par la lignée CHO avec un tag 3XFLAG à leur extrémité C-terminale ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur une résine couplée à un anticorps anti-FLAG. Cette étape de purification a nécessité quelques mises au point. En effet, la lignée cellulaire CHO, comme la plupart des lignées eucaryotes, exprime et sécrète des MMPs (Sandberg et al., 2006) qui peuvent former des complexes avec le TIMP-1 (Roderfeld et al., 2007). Afin d'éviter de purifier du TIMP-1 complexé à des MMPs, nous avons ajouté une étape de prétraitement des milieux conditionnés avec l'EDTA à pH 3,5 pendant une heure à 37°C de façon à dissocier les complexes MMP/TIMP (Murphy et al., 1989). Le zymogramme de la figure 39 montre qu'en absence de prétraitement des milieux conditionnés à l'EDTA, la pro-MMP-9 est présente dans la solution contenant le TIMP-1 purifié. L'absence complète de bande correspondant à la pro-MMP-9 après prétraitement à l'EDTA et purification permet de mettre en évidence que l'on obtient du TIMP-1 non complexé à la pro-MMP-9.

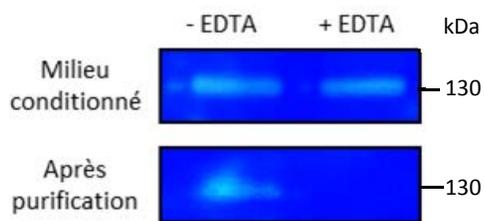


Figure 39: Dissociation des complexes pro-MMP-9/TIMP-1 avant l'étape de purification

Les milieux conditionnés de cellules CHO transfectées stablement avec le vecteur codant l'ADNc du TIMP-1, ainsi que les protéines purifiées ayant subi ou non un traitement à l'EDTA sont déposés sur gel d'électrophorèse contenant de la gélatine. Après migration, les gels sont incubés dans le tampon de digestion afin de mettre en évidence la présence de MMPs

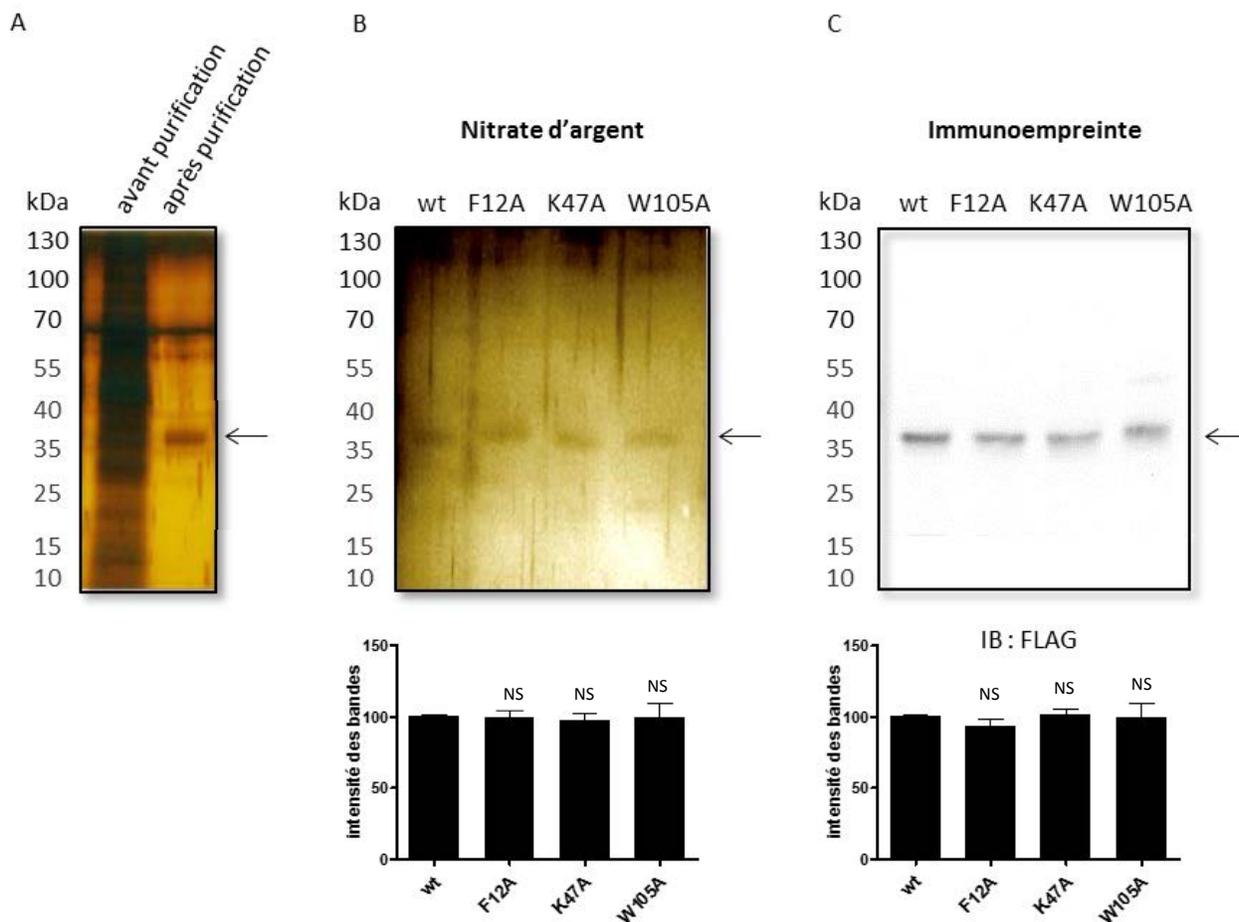


Figure 40: Analyse de la pureté du TIMP-1 et des mutants

A. Le milieu conditionné des cellules CHO exprimant le TIMP-1 sauvage est déposé avant et après purification du TIMP-1 sur un gel d'électrophorèse puis coloré au nitrate d'argent

B. Après purification par chromatographie d'affinité et quantification par le kit ELISA anti-TIMP-1, le TIMP-1 et les mutants sont déposés en quantités équivalentes et séparés par électrophorèse. Une coloration au nitrate d'argent est réalisée ainsi qu'une immunoempreinte anti-FLAG

Test Student. NS : non significatif

Après purification, les protéines éluées ont été séparées par électrophorèse puis colorées au nitrate d'argent afin d'évaluer leur taux de pureté (Figure 40 A). La figure 40 A met en évidence une seule bande correspondant à la masse moléculaire attendue de 37 kDa.

Après la quantification grâce à un kit ELISA utilisant des anticorps dirigés contre la partie C-terminale du TIMP-1, des quantités équivalentes de TIMP-1 et de mutants ont été séparées par électrophorèse. Un gel est coloré au nitrate d'argent et un autre est analysé par immunoempreinte avec un anticorps dirigé contre le tag 3XFLAG (Figure 40 B et C). Les résultats montrent que la quantification à l'aide du kit ELISA est fiable puisqu'elle permet d'équilibrer les concentrations de TIMP-1 sauvage et des mutants comme en témoigne l'homogénéité de l'intensité des bandes obtenues.

Cette quantification a permis d'estimer la production de 600 ng de TIMP-1 purifié à partir de 1.10^6 cellules CHO après 48h de culture.

IV. Mesure de l'activité inhibitrice de MMPs du TIMP-1 et des mutants

Après avoir purifié le TIMP-1 sauvage et les mutants, nous avons testé leur capacité à inhiber les MMPs. Cette étude doit permettre de vérifier le bon repliement des différentes protéines ainsi que leur fonctionnalité vis-à-vis des MMPs. En effet, les résidus K47, F12 et W105 étant éloignés des résidus impliqués dans l'inhibition des MMPs, leur mutation ne devrait pas perturber cette activité biologique du TIMP-1. Seul le mutant T2G dont la perte d'inhibition vis-à-vis des MMP-1, -2 et -3 est avérée, devrait présenter des effets différents de ceux du TIMP-1 sauvage et servira donc de contrôle.

L'activité inhibitrice du TIMP-1 et des mutants vis-à-vis des MMP-1, -2, -3 et -9 a été analysée par fluorimétrie en présence de concentrations variables de TIMP-1 ou de mutants et ce, dans des conditions de vitesse initiale. L'équation de Morrison a été utilisée pour déterminer les constantes d'inhibition K_i (Figure 41). Comme attendu, le mutant T2G n'inhibe pas les MMP-1, -2 et -3. Les représentations graphiques de l'équation de Morrison ainsi que les valeurs des K_i ne montrent aucune différence significative d'inhibition des MMP-1, -2, -3 et -9 entre le TIMP-1 sauvage et les trois mutants K47A, F12A et W105A (Tableau XVI). Ces résultats indiquent que les mutations réalisées au niveau de la région charnière n'impactent pas l'activité inhibitrice du TIMP-1 vis-à-vis de ces MMPs.

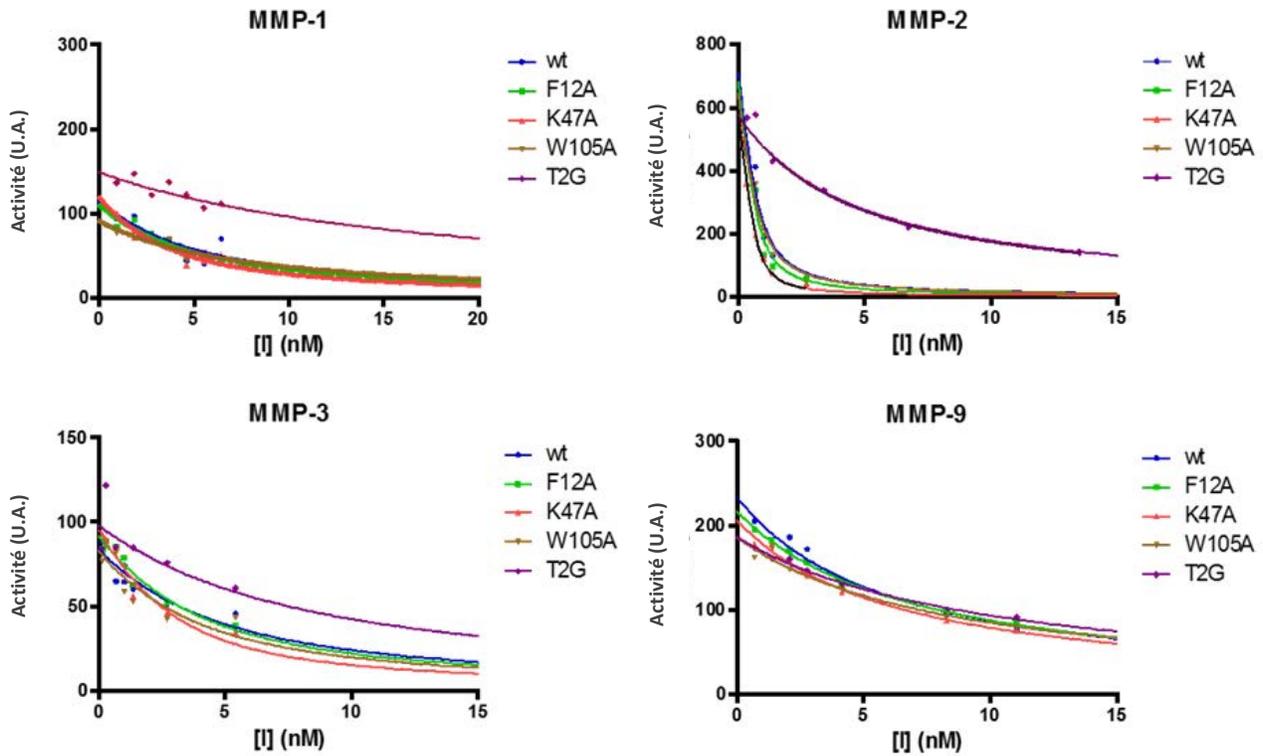


Figure 41: Mesure de l'activité inhibitrice du TIMP-1 sauvage et des mutants vis-à-vis des MMP-1, -2, -3 et -9

Représentation graphique de l'équation de Morrison correspondant à l'inhibition des MMP-1, -2, -3 et -9 par le TIMP-1 et les mutants. Ces résultats sont représentatifs de trois expérimentations réalisées de manière indépendante

$$\text{Equation de Morrison : } V_i = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

	K _i (nM)			
	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-9
wt	4,03 ± 1,57	0,09 ± 0,04	1,18 ± 0,47	4,25 ± 0,28
F12A	3,82 ± 1,33	0,06 ± 0,02	0,58 ± 0,60	4,76 ± 0,57
K47A	3,38 ± 2,92	0,03 ± 0,01	0,55 ± 0,19	4,40 ± 0,78
W105A	4,12 ± 2,62	0,12 ± 0,10	0,51 ± 0,19	5,94 ± 1,62
T2G	35,9 ± 1,67	18,926 ± 0,12	3,34 ± 0,48	8,09 ± 0,81

Tableau XVI: Tableau regroupant les constantes d'inhibition (K_i) du TIMP-1 sauvage et des différents mutants vis à vis des MMP-1, -2, -3 et -9

Les valeurs de K_i sont exprimées en nM et correspondent à la moyenne ± écart type de 3 expériences indépendantes

Nous avons également étudié la capacité du TIMP-1 sauvage et des différents mutants à inhiber la MT1-MMP dans le but de déterminer si les mutations altèrent ou non la spécificité d'inhibition du TIMP-1 (Figure 42). En effet, le TIMP-1 est connu pour ne pas inhiber toutes les MMPs et ainsi être un très mauvais inhibiteur de la MT1-MMP. Cependant, la substitution de la thréonine 98 par une leucine permet de générer un mutant du TIMP-1 possédant une forte capacité inhibitrice vis-à-vis de la MT1-MMP (Lee et al., 2003) et nos mutations pourraient engendrer un phénomène similaire.

Les résultats présentés dans la figure 42 montrent que le TIMP-1 sauvage et les 4 mutants inhibent très faiblement la MT1-MMP contrairement au TIMP-2, un puissant inhibiteur de la MT1-MMP. Ainsi, les mutations réalisées ne modifient pas l'activité inhibitrice du TIMP-1 vis-à-vis de la MT1-MMP et probablement de façon plus générale sa sélectivité vis-à-vis des MMPs.

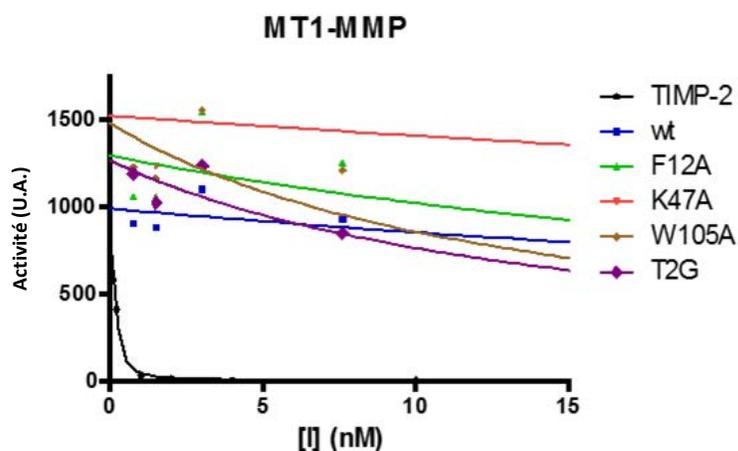


Figure 42: Mesure de l'activité inhibitrice du TIMP-1 et des mutants vis-à-vis de la MT1 MMP

Représentation graphique de l'équation de Morrison correspondant à l'inhibition de la MT1-MMP par le TIMP-2, le TIMP-1 et les mutants.

Ces résultats sont représentatifs de trois expérimentations réalisées de manière indépendante

Partie IV :
**Etude de l'interaction du TIMP-1 et des
mutants avec le récepteur LRP-1**

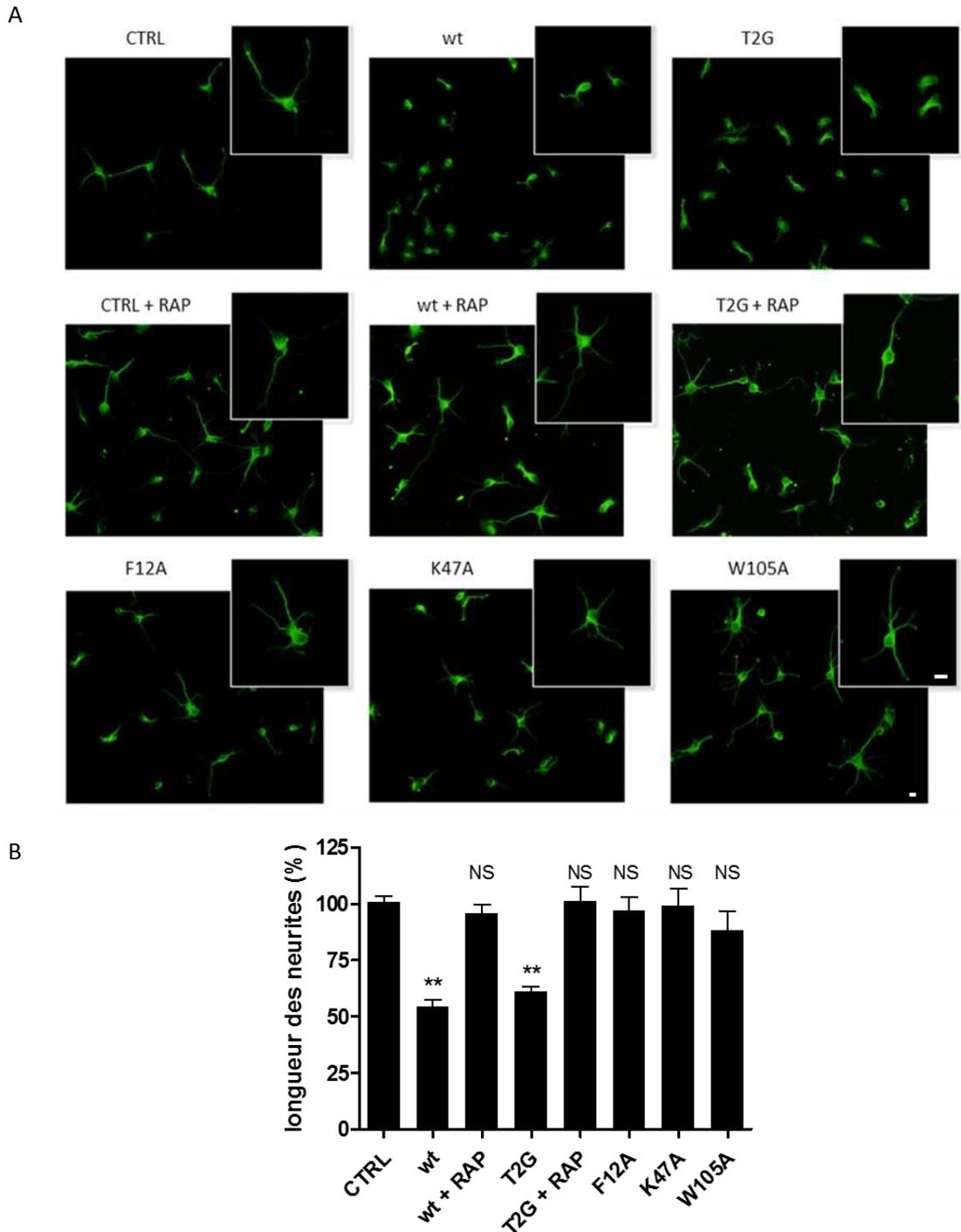


Figure 43: Effet des mutants du TIMP-1 sur le réseau neuritique

A. Les neurones sont incubés avec 150 ng/mL TIMP-1 ou mutants pendant 30 minutes. Un immunomarquage anti- $\beta 3$ tubuline est réalisé et la longueur des neurites est mesurée grâce au plugin NeuronJ du logiciel ImageJ. Ces images sont représentatives de trois expérimentations réalisées de manière indépendante. Barre d'échelle : 5 μ m

B. Histogramme représentant le pourcentage du réseau neuritique de chaque neurone par rapport au contrôle (CTRL). Test Student **: $p < 0,01$, NS : non significatif. La significativité est exprimée par rapport au contrôle.

I. Etude de l'interaction avec le récepteur LRP-1

Nous avons montré que le TIMP-1 diminue la longueur des neurites et augmente le volume des cônes de croissance des neurones corticaux d'embryons de souris *via* sa fixation aux domaines DII et DIV du récepteur LRP-1. Dans le but de caractériser l'interaction du TIMP-1 avec ce récepteur, nous avons testé l'effet des mutants dans ces cellules.

I.1. Effets des mutants du TIMP-1 sur la morphologie neuronale

I.1.1. Etude du réseau neuritique

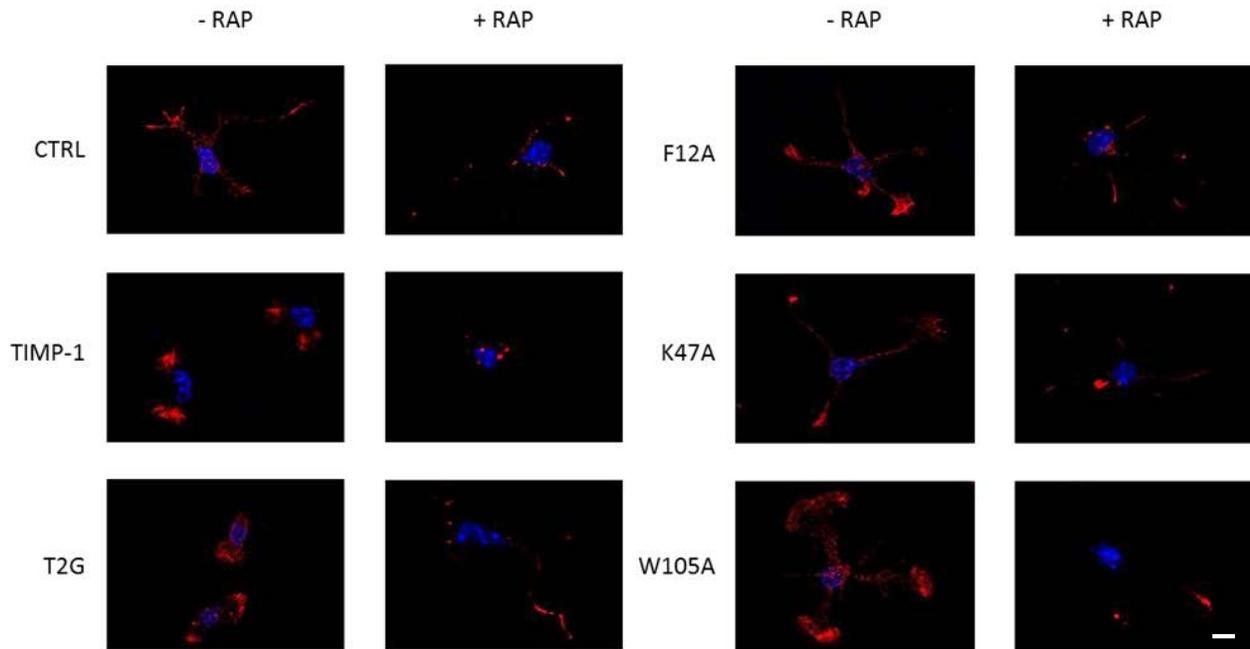
Afin d'évaluer l'effet du TIMP-1 ou de chaque mutant sur le réseau neuritique, les neurones ont été incubés avec 150 ng/mL TIMP-1 ou mutant pendant 30 minutes. Un immunomarquage anti- β 3 tubuline, le composant principal des microtubules est réalisé afin de visualiser le cytosquelette neuronal. La longueur des neurites est calculée à l'aide du plugin Neuron J du logiciel Image J et les résultats sont exprimés en somme de la longueur du réseau neuritique par neurone (Figure 43). Le TIMP-1 sauvage induit une diminution de 50% de la longueur des neurites comme montré précédemment (Résultats, Partie I). Des résultats similaires sont obtenus avec le mutant T2G ce qui montre que ces effets sont indépendants de l'inhibition des MMPs. Cet effet est inhibé par RAP, ce qui confirme que le TIMP-1 induit une réduction de la longueur des neurites *via* sa liaison à LRP-1.

En revanche, lorsque les neurones sont incubés avec les mutants F12A, K47A et W105, la longueur des neurites n'est pas modifiée comparativement à celle des neurites témoins. Ces résultats montrent que les mutations réalisées bloquent l'activité biologique du TIMP-1 sur la longueur des neurites dans ces cellules.

I.1.2. Etude du volume des cônes de croissance

En plus de ses effets sur la croissance neuritique, le TIMP-1 induit une augmentation du volume des cônes de croissance. Ces structures situées à l'extrémité des neurites sont riches en actine et myosine et permettent aux neurones d'établir des contacts avec leur cible. Le marquage des cônes de croissance se fait par immunofluorescence la phalloïdine, qui se lie spécifiquement aux fibres d'actine F. Le volume des cônes de croissance par neurone est mesuré après reconstruction 3D des acquisitions faites en microscopie confocale, à l'aide du logiciel AMIRA (Figure 44). L'incubation des neurones avec le TIMP-1 sauvage induit une augmentation de 150% du volume des cônes de croissance et un résultat similaire est observé lorsque les neurones sont incubés avec le mutant T2G ce qui confirme

A



B

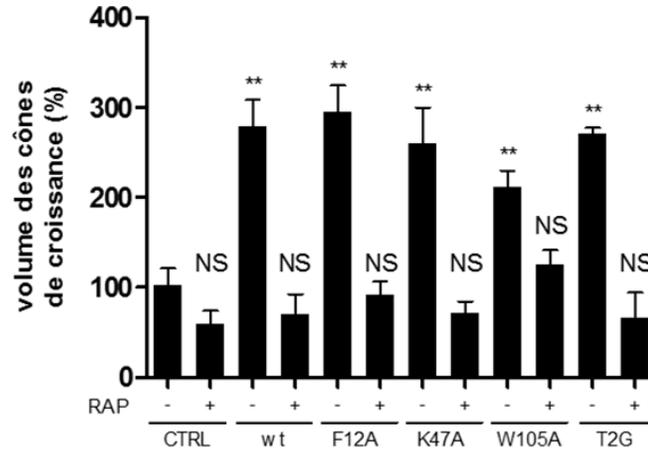


Figure 44: Effet des mutants du TIMP-1 sur le volume des cônes de croissance

A. Les neurones sont incubés avec 150 ng/mL TIMP-1 ou mutants pendant 30 minutes. Un marquage avec la phalloïdine est réalisé et le volume des cônes de croissance est mesuré grâce au logiciel AMIRA. Ces images sont représentatives de trois expérimentations réalisées de manière indépendante.

Barre d'échelle : 5 μ m

B. Histogramme représentant le pourcentage du réseau neuritique de chaque neurone par rapport au contrôle (CTRL). Test Student **: $p < 0,01$, NS : non significatif. La significativité est exprimée par rapport au contrôle.

que cet effet est indépendant de l'inhibition des MMPs. Par ailleurs, lorsque les neurones sont incubés avec le TIMP-1 ou le T2G en présence de RAP, le volume des cônes de croissance n'est pas modifié par rapport au contrôle. Ce résultat confirme que l'augmentation du volume des cônes de croissance est dépendante de la liaison du TIMP-1 à LRP-1.

L'incubation des neurones avec les mutants induit également une augmentation de 100 à 150% du volume des cônes de croissance. Ces résultats montrent que les mutations réalisées ne bloquent pas l'activité biologique du TIMP-1 sur le volume des cônes de croissance. L'effet des mutants est inhibé par RAP ce qui suggère que les mutants sont capables de se fixer à LRP-1 et que les mutations n'altèrent pas la capacité du TIMP-1 à se lier à LRP-1.

I.2. Etude de la liaison des mutants du TIMP-1 au récepteur LRP-1

Afin d'étudier la fixation des mutants sur les domaines DII et DIV de LRP-1, nous avons réalisé des analyses en résonance plasmonique de surface grâce à une collaboration avec le Centre d'Analyse Protéomique de Marseille (CAPM-Biocapteurs). Les domaines DII et DIV couplés à une fraction Fc sont immobilisés sur une puce à l'aide d'un anticorps anti-Fc. Le TIMP-1 et les mutants sont ensuite passés en mode *multicycle* sur ces puces et les constantes de dissociation (K_D) ont été déterminées (Tableau XVII). Les valeurs de K_D des différents mutants pour les domaines DII et DIV sont de l'ordre du nM et ne sont pas différentes de celles du TIMP-1 sauvage. Ainsi, les mutations réalisées ne semblent pas perturber l'affinité du TIMP-1 pour les domaines DII et DIV de LRP-1.

	K_D (nM)	
	DII	DIV
wt	10.8 ± 2.1	34.7 ± 1.7
T2G	11.59 ± 2.2	28.9 ± 1.2
F12A	18.5 ± 4.6	38.7 ± 3.8
K74A	10.4 ± 4.5	26.46 ± 0.9
W105A	10.3	31.7

Tableau XVII: Tableau représentant les constantes de dissociation du TIMP-1 et des mutants avec les domaines DII et DIV de la protéine LRP-1 déterminées par résonance plasmonique de surface

Immobilisation par immunocapture sur anticorps anti-Fc des domaines II et IV de LRP-1 et injection des différents analytes en cycle cinétique *multicycle* (TIMP-1, mutants du TIMP-1 et EGF). L'EGF est utilisé en tant que témoin négatif car il ne se lie pas à LRP-1

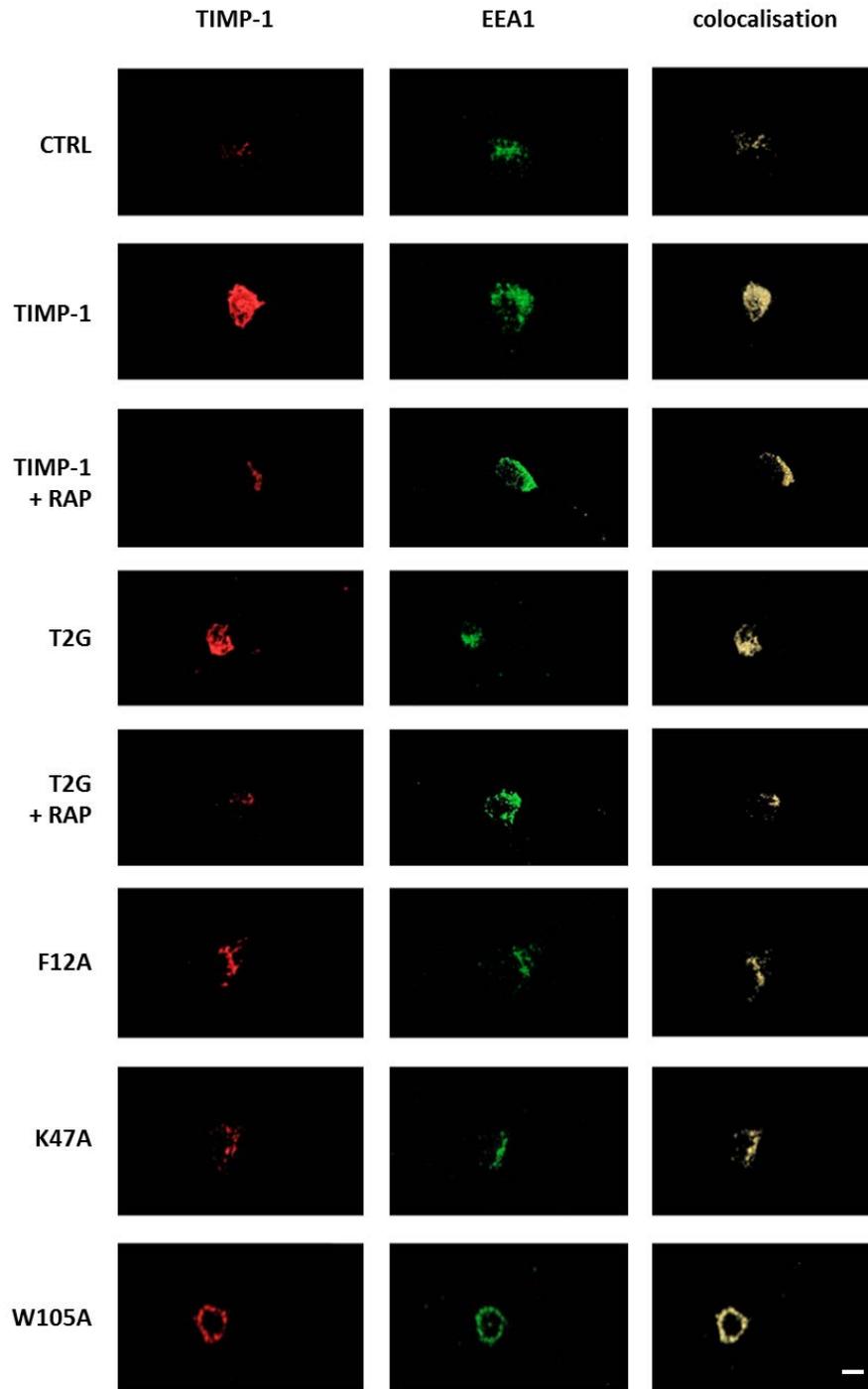


Figure 45: Endocytose des mutants médiée par LRP-1 à 10 minutes

Les neurones sontensemencés sur lamelles et stimulés avec du TIMP-1 ou les mutants pendant 1 heure à 4°C. L'endocytose est induite à 37°C pendant 10 minutes. Les neurones sont ensuite fixés et des immunomarquages anti-EEA1 et anti-TIMP-1 sont réalisés. Les photos sont acquises au microscope confocal et analysées à l'aide du logiciel AMIRA. Ces images sont représentatives de trois expérimentations réalisées de manière indépendante. Barre d'échelle : 5 µm

I.3. Etude de l'endocytose des mutants par LRP-1

Nous avons montré que l'activité cytokinique du TIMP-1 dans les neurones corticaux d'embryons de souris est associée à son endocytose par LRP-1. Les trois mutants du TIMP-1 se fixant à LRP-1, nous avons donc étudié leur endocytose par ce récepteur.

Les neurones sont incubés avec le TIMP-1 ou les mutants pendant 1 heure à 4°C puis l'endocytose est déclenchée par passage des cellules à 37°C. L'endocytose a été étudiée après une période d'incubation de 10 minutes, conduisant à l'internalisation des protéines liées à la surface cellulaire, mais ne permettant pas leur recyclage ni leur dégradation (Hao and Maxfield, 2000).

L'endocytose du TIMP-1 et des mutants a été mise en évidence par un immunomarquage anti EEA1, un marqueur des endosomes précoces. Des photos représentatives prises en microscopie confocale sont présentées dans la figure 45 et l'analyse des coefficients de corrélation entre le marquage TIMP-1 et EEA1 est présentée dans la figure 46. Lorsque les neurones sont incubés avec le TIMP-1 sauvage, on observe une augmentation du marquage intracellulaire du TIMP-1 par rapport aux neurones non traités. Ce marquage colocalise avec celui réalisé avec l'anticorps anti-EEA-1 mettant en évidence l'endocytose du TIMP-1 dans ces cellules (Figure 45). Lorsque le RAP est ajouté dans le milieu, on observe une diminution de la localisation du TIMP-1 au niveau des endosomes précoces reflétant une diminution de l'endocytose du TIMP-1 par LRP-1. Ce résultat est confirmé par une diminution significative du coefficient de corrélation de $0,294 \pm 0,030$ à $0,134 \pm 0,020$ (Figure 46).

Des résultats similaires sont observés avec le mutant T2G. En effet, le T2G est colocalisé au niveau des endosomes précoces et le coefficient de corrélation associé est de $0,364 \pm 0,030$. Lorsque les neurones sont incubés avec le T2G en présence de RAP on observe une diminution de la localisation du T2G au niveau des endosomes précoces et le coefficient de corrélation associé est de $0,151 \pm 0,020$.

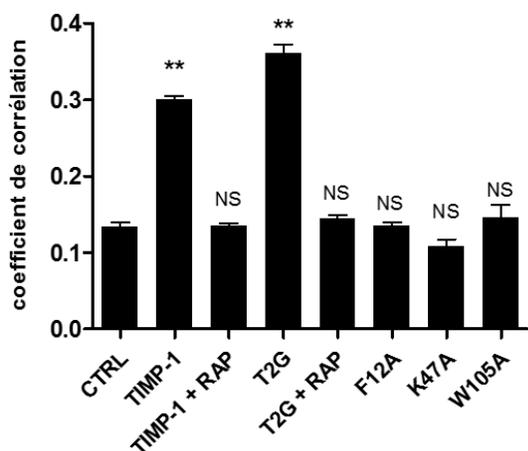


Figure 46: Histogramme représentant les coefficients de corrélation entre le TIMP-1 et le marqueur EEA1

Les coefficients de corrélation entre le TIMP-1 et le marqueur EEA1 sont déterminés à l'aide du logiciel AMIRA. Test Student **: $p < 0,01$, NS : non significatif. La significativité est exprimée par rapport au contrôle

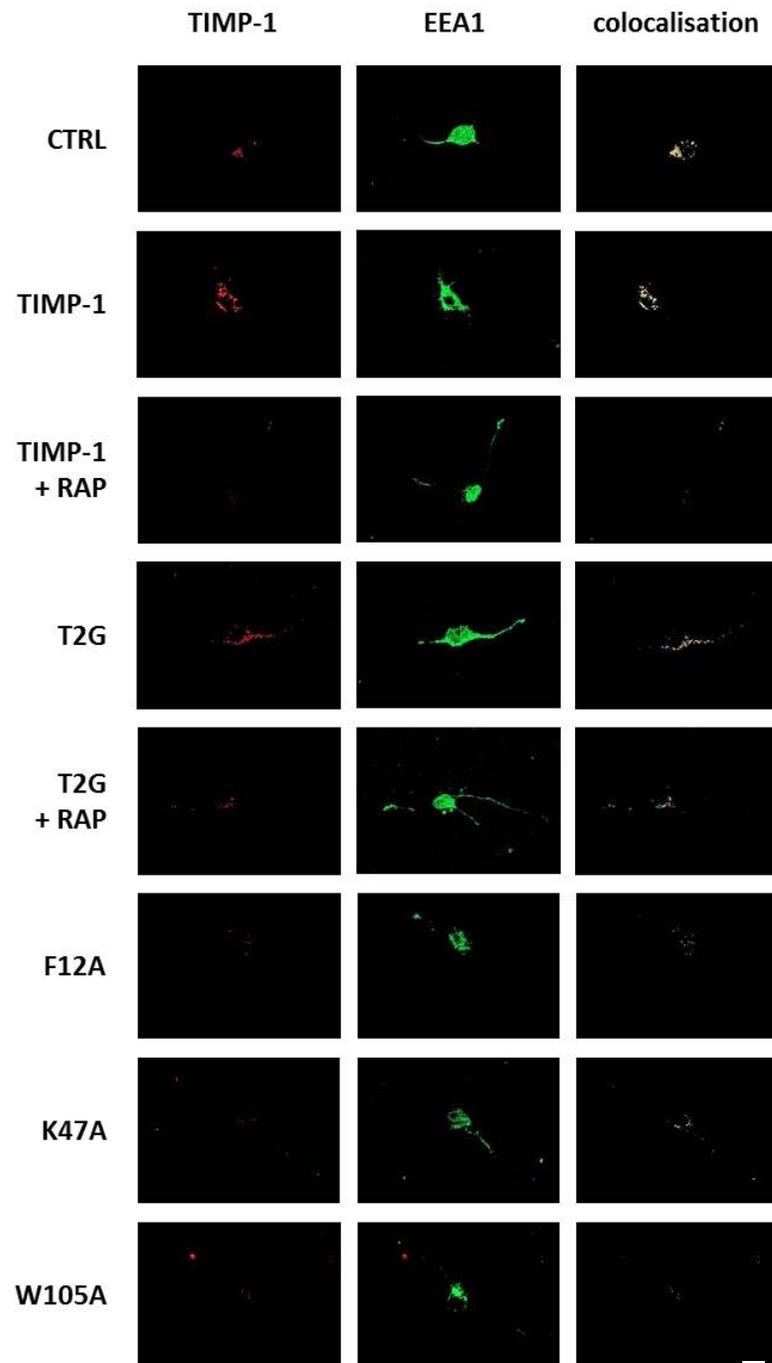


Figure 47: Endocytose des mutants médiée par LRP-1 à 1 heure

A. Les neurones sont ensemencés sur lamelles et stimulés avec du TIMP-1 ou les mutants pendant 1 heure à 4°C. L'endocytose est induite à 37°C pendant 1 heure. Les neurones sont ensuite fixés et des immunomarquages anti- EEA1 et anti-TIMP-1 sont réalisés. Les photos sont acquises au microscope confocal et analysées à l'aide du logiciel AMIRA. Ces images sont représentatives de trois expérimentations réalisées de manière indépendante. Barre d'échelle : 5 μ m

Ces résultats montrent que le TIMP-1 est endocyté *via* le récepteur LRP-1 indépendamment de son activité inhibitrice de MMPs.

Lorsque les neurones sont incubés avec les mutants F12A, K47A et W105A, on observe une nette diminution de la localisation des mutants au niveau des endosomes précoces (Figure 45). Cette diminution est confirmée par une baisse significative des valeurs du coefficient de corrélation pour les mutants F12A ($0,127 \pm 0,010$), K47A ($0,092 \pm 0,020$) et W105A ($0,179 \pm 0,030$) comparativement à celle du TIMP-1 sauvage ($0,204 \pm 0,030$) (Figure 46). Ces résultats indiquent que les mutants ne sont pas endocytés par LRP-1 en 10 minutes et suggèrent que les mutations altèrent l'endocytose du TIMP-1 par LRP-1.

Pour déterminer si cet effet résulte d'un retard d'endocytose, nous avons étudié l'endocytose du TIMP-1 et des mutants avec une incubation d'une heure à 37°C (Figure 47). Dans ces conditions, on observe une localisation du TIMP-1 et du T2G au niveau des endosomes précoces marqués avec l'anticorps anti-EEA1. Ces effets sont inhibés par le RAP. Les coefficients de corrélation pour les marquages TIMP-1 et EEA1 sont de $0,294 \pm 0,080$ et $0,223 \pm 0,010$ dans les neurones stimulés par le TIMP-1 et le mutant T2G respectivement, alors qu'ils sont de $0,119 \pm 0,010$ et $0,178 \pm 0,010$ lorsque la protéine RAP est ajoutée dans le milieu de stimulation (Figure 48). Ces résultats confirment de nouveau que l'endocytose du TIMP-1 *via* le récepteur LRP-1 est indépendante de l'activité inhibitrice des MMPs.

Lorsque les neurones sont incubés avec les mutants F12A, K47A et W105A, on observe une faible localisation du TIMP-1 au niveau des endosomes précoces, comme le montrent les coefficients de corrélation qui sont respectivement de $0,065 \pm 0,030$, $0,160 \pm 0,030$ et $0,047 \pm 0,030$. Les mutants ne sont donc pas endocytés par LRP-1 même après 1 heure d'incubation à 37°C.

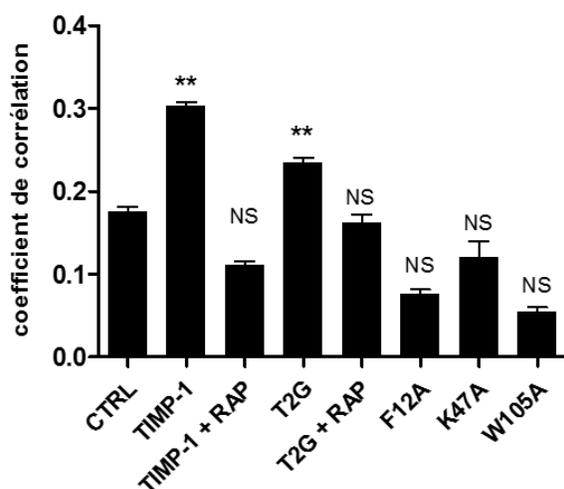


Figure 48: Histogramme représentatif des coefficients de corrélation entre le TIMP-1 et le marqueur EEA1.

Les coefficients de corrélation entre le TIMP-1 et le marqueur EEA1 sont déterminés à l'aide du logiciel AMIRA. Test Student **: $p < 0,01$, NS : non significatif. La significativité est exprimée par rapport au contrôle.

Les mutations réalisées dans la région charnière du TIMP-1 bloquent donc l'endocytose du TIMP-1 par le récepteur LRP-1.

Ainsi, cette étude a permis de mettre en évidence que les mutants i) ont les mêmes effets que le TIMP-1 sur le volume des cônes de croissance, ii) se fixent aux domaines DII et DIV de LRP-1, iii) n'ont pas les mêmes effets que le TIMP-1 sur la longueur des neurites et iv) ne sont pas endocytés par les neurones corticaux d'embryons de souris.

Partie V :
**Etude de l'interaction du TIMP-1 et des
mutants avec le récepteur CD63**

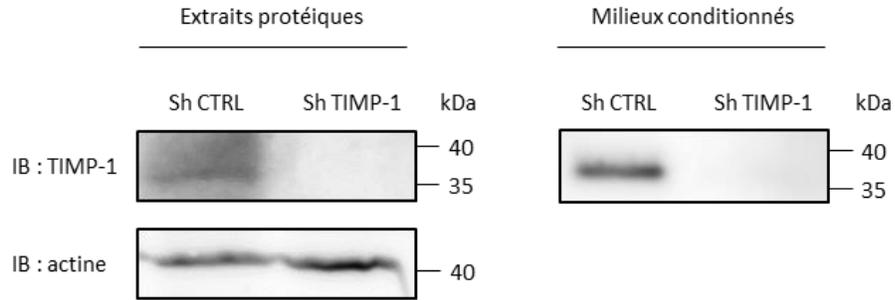


Figure 49: Génération d'une lignée cellulaire MCF10A n'exprimant plus le TIMP-1

Les extraits protéiques et les milieux conditionnés des lignées cellulaires MCF10A transfectées avec le shRNA CTRL ou le shRNA TIMP-1 sont déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-TIMP-1 et anti-actine sont réalisées.

Ces immunoempreintes sont représentatives de trois expérimentations indépendantes

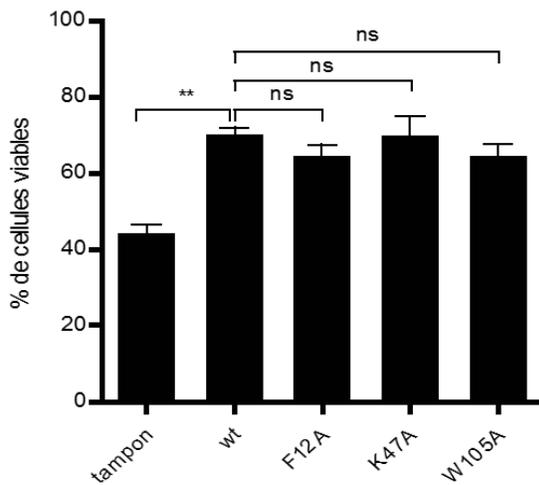


Figure 50: Effet du TIMP-1 et des mutants sur la viabilité de la lignée cellulaire MCF10A sh TIMP-1

Les cellules MCF10A sh TIMP-1 sont incubées avec le TIMP-1 ou les mutants. La mort cellulaire est induite par 0,01 μ M de staurosporine. La viabilité cellulaire est mesurée après 48 heures grâce au MTT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport au temps t 0.

Ces résultats sont issus de 3 expérimentations réalisées de manière indépendante. ns : non significatif ; ** : $p < 0,01$

I. Etude de l'interaction du TIMP-1 et des mutants avec le récepteur CD63

Jung et ses collaborateurs ont démontré que le TIMP-1 se fixe au récepteur CD63 et induit la survie des cellules épithéliales mammaires MCF10A. Nous avons donc étudié les effets des trois mutants dans cette lignée cellulaire.

I.1. Etude de la survie des cellules MCF10A

La lignée cellulaire MCF10A produit et sécrète du TIMP-1. A l'aide d'un kit ELISA nous avons quantifié le TIMP-1 présent dans le milieu conditionné de 250 000 cellules après 48 heures d'incubation. Une concentration de 150 ng/ml de TIMP-1 a ainsi été déterminée. Nous avons donc utilisé cette concentration pour les études de survie cellulaire. Pour s'affranchir de la présence de TIMP-1 endogène, nous avons donc généré une lignée cellulaire MCF10A n'exprimant plus de TIMP-1. Les cellules MCF10A ont été transfectées de façon stable avec le vecteur pLMP contenant un shRNA dirigé contre le TIMP-1 (cellules MCF10A sh TIMP-1). Comme en témoigne la figure 49, cette transfection permet de diminuer fortement l'expression et la sécrétion du TIMP-1 par ces cellules. Une lignée cellulaire transfectée avec un shRNA contrôle a également été générée (MCF10A sh CTRL).

Pour étudier l'effet des mutants sur la survie, les cellules MCF10A sh TIMP-1 ont été pré-incubées pendant 1 heure avec 150 ng/ml de TIMP-1 sauvage ou mutants. La mort cellulaire est induite par 0,01 μ M de staurosporine, un puissant inhibiteur des protéines kinases. La mesure de la viabilité cellulaire est suivie pendant 48 heures grâce au test MTT. Les résultats de la figure 50 représentent la viabilité cellulaire 48 heures après induction de la mort cellulaire et sont exprimés en pourcentage de cellules viables par rapport au temps t 0. La figure 50 montre que le TIMP-1 induit une augmentation de 30% du nombre de cellules viables. Les mutants sont également capables de stimuler la survie des cellules MCF10A shTIMP-1. Ce résultat suggère que les mutations n'altèrent pas l'effet biologique du TIMP-1 dans cette lignée cellulaire.

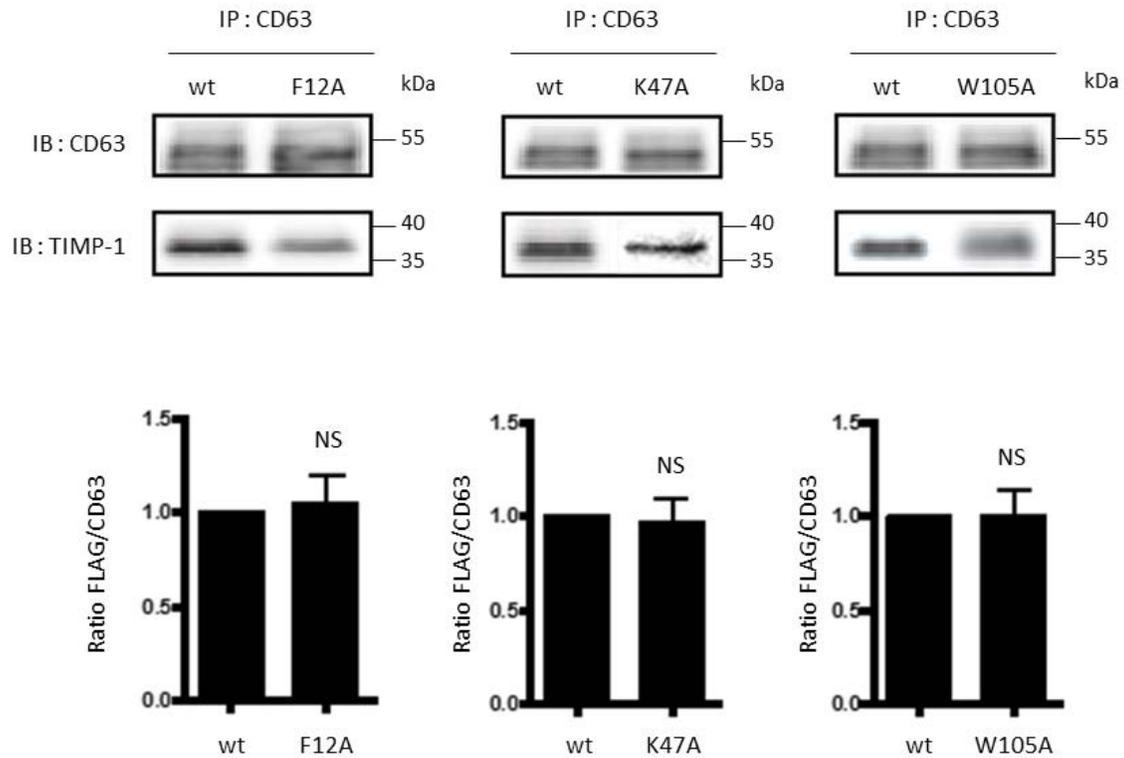


Figure 51: Etude de l'interaction des mutants du TIMP-1 avec la glycoprotéine CD63

La glycoprotéine CD63 avec un tag 6 Histidines est produite et capturée sur résine de Nickel puis incubée en présence de TIMP-1 FLAG ou des mutants. Après lavages et élution, les échantillons sont déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-CD63 et anti-TIMP-1 sont réalisées.

Les photographies sont représentatives de 3 expérimentations réalisées de manière indépendante. Les histogrammes correspondent à la quantification de 3 expériences indépendantes. NS : non significatif

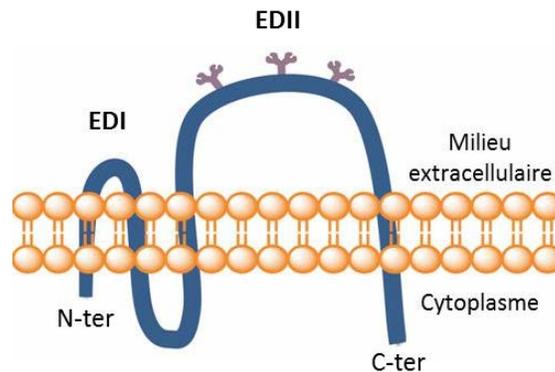


Figure 52: Schéma représentatif de la structure de la glycoprotéine CD63

I.2. Etude de l'interaction du TIMP-1 et des mutants avec CD63

Dans les cellules épithéliales mammaires MCF10A, les effets cytokiniques du TIMP-1 passent par sa liaison à la glycoprotéine CD63. Pour étudier l'interaction TIMP-1/CD63 *in vitro*, nous avons lié la glycoprotéine CD63 possédant un tag 6 histidines à une résine de Nickel puis réalisé une incubation avec le TIMP-1 FLAG ou les mutants. Après lavages et élution, les échantillons sont déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-CD63 et anti-TIMP-1 sont réalisées. La figure 51 montre que le TIMP-1 se fixe à CD63 et que les trois mutants interagissent également avec ce récepteur. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus sur la survie cellulaire. Ces données suggèrent que les mutations réalisées au sein de la région charnière ne perturbent pas l'interaction du TIMP-1 avec CD63.

II. Etude de l'interaction du TIMP-1 avec CD63

L'étude des trois mutants générés en tenant compte de la dynamique intrinsèque du TIMP-1 ne nous a pas permis d'identifier des régions impliquées dans sa liaison à CD63. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur le récepteur CD63 et d'identifier des séquences liant le TIMP-1. CD63 possède deux domaines extracellulaires susceptibles de lier le TIMP-1, le domaine EDI composé de 19 acides aminés et le domaine EDII composé de 101 acides aminés (Figure 52).

II.3.1. Etude de l'interaction du TIMP-1 avec le domaine EDII

La séquence du domaine EDII comprend les acides aminés 103 à 203 de la protéine mature. Cette séquence a été insérée dans le vecteur pQe30 (pQe30-CD63 EDII) afin d'ajouter un tag 6 histidines à son extrémité N-terminale permettant sa purification. La production de ce domaine a été réalisée par transformation de bactéries BL21 avec le vecteur pQe30-CD63 EDII. L'expression est induite par ajout d'IPTG dans le milieu de culture. Les culots cellulaires ainsi que les surnageants de culture contenant les protéines sécrétées sont analysés par électrophorèse suivie d'une coloration au bleu de Coomassie (Figure 53). La masse théorique attendue du domaine EDII est de 12,3 kDa. Différentes conditions de température et concentrations d'agent inducteur ont été testées mais nous n'avons pas réussi à produire ce domaine.

L'étude de l'interaction du TIMP-1 avec le domaine EDII n'a donc pas pu être réalisée dans le cadre de ce travail de thèse.

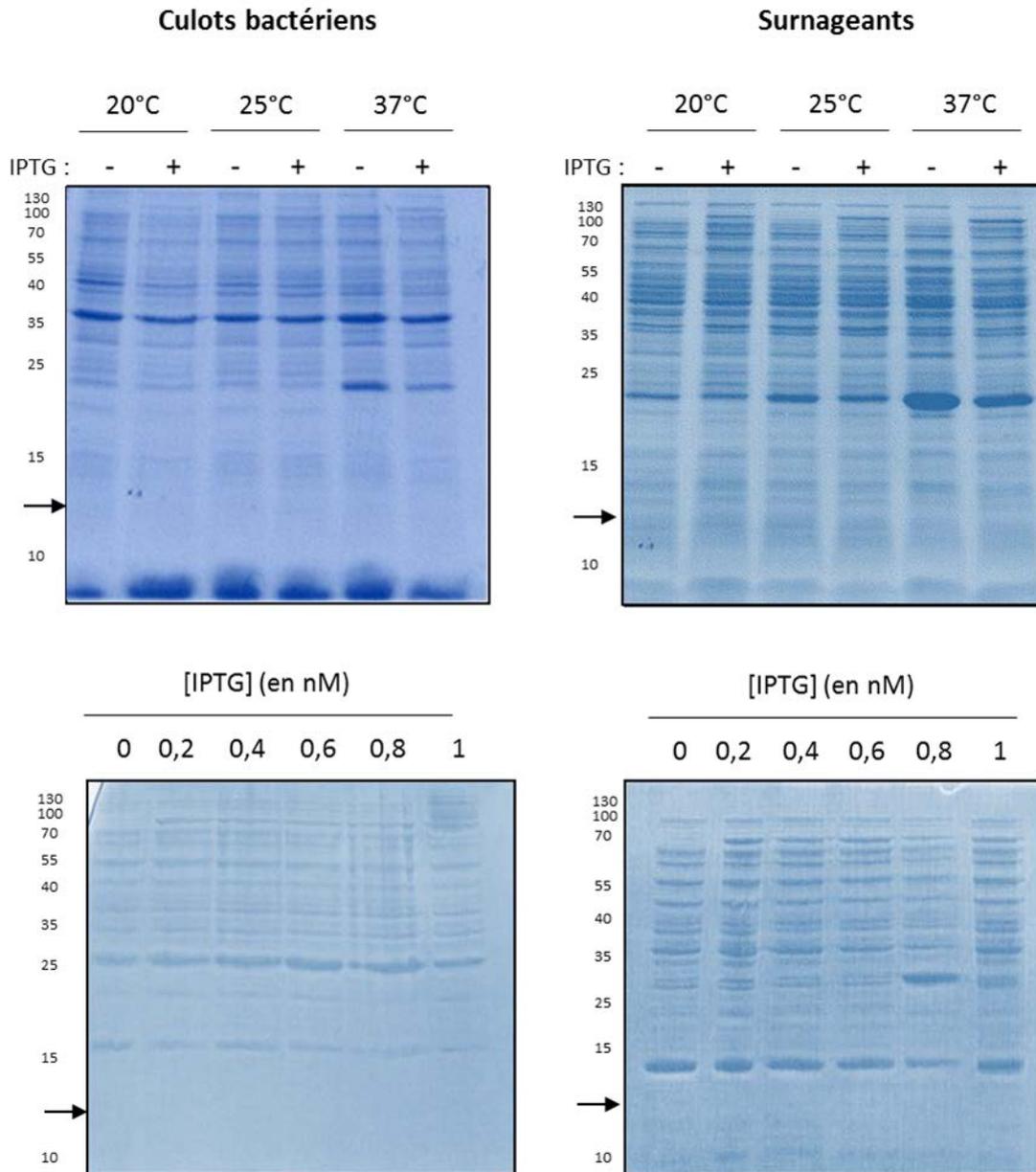


Figure 53: Etude de l'expression du domaine EDII de CD63

Différentes conditions de températures (20°C, 25°C, et 37°C) ont été testées pour une concentration en IPTG de 0,4 mM, et différentes concentrations en IPTG (de 0 à 1 mM) ont été testées à une température de 25°C. Après centrifugation, les surnageants ainsi que les culots bactériens sont déposés sur gel d'acrylamide à 15%. Une coloration au bleu de Coomassie est réalisée afin de mettre en évidence les protéines. La masse moléculaire théorique du domaine EDII est de 12,5 kDa et est indiquée sur le gel par une flèche

Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations réalisées de manière indépendante

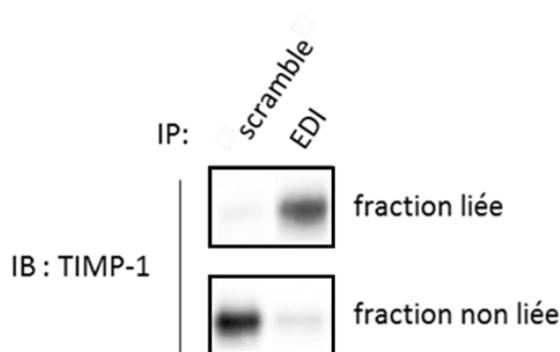
II.3.2. Etude de l'interaction du TIMP-1 avec le domaine EDI

La séquence du domaine EDI correspond aux acides aminés 33 à 51 de la protéine mature (N_{ter} - VGAQLVLSQTIIQGATPGS - C_{ter}). Ce peptide de 19 acides aminés a été produit par synthèse chimique avec ajout d'un tag 6 Histidines à son extrémité N-terminale afin de permettre sa fixation sur une résine de Nickel. Un peptide "scramble" de séquence aléatoire a été généré pour être utilisé en tant que contrôle. Après incubation avec le TIMP-1 et élution des protéines fixées, des immunoempreintes anti-TIMP-1 révèlent la présence de TIMP-1 dans la fraction liée au domaine EDI alors qu'aucune bande correspondant au TIMP-1 n'est observée dans la fraction non liée (Figure 54). Lorsque le TIMP-1 est incubé en présence du peptide scramble, le TIMP-1 est majoritairement détecté dans la fraction non liée. Ces résultats montrent que le TIMP-1 se fixe au domaine EDI de la glycoprotéine CD63.

Figure 54: Etude de la liaison du TIMP-1 au domaine EDI de CD63

Les peptides EDI et scramble avec un tag 6 Histidines sont capturés sur résine de Nickel puis incubés en présence de TIMP-1 FLAG. La fraction non liée aux billes est récupérée. Après lavages, la fraction liée aux billes est éluee. Les échantillons sont déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-TIMP-1 sont réalisées

Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations réalisées de manière indépendante



Afin d'identifier les résidus impliqués dans cette interaction, nous avons fait synthétiser des peptides tronqués du domaine EDI (Figure 55). Ces peptides ont été produits avec une séquence 6 Histidines située à leur extrémité N-terminale afin de les immobiliser sur une résine de Nickel.

EDI : Nter – VGAQLVLSQTIIQGATPGS – Cter

P1 : Nter – VGAQLVLSQ – Cter

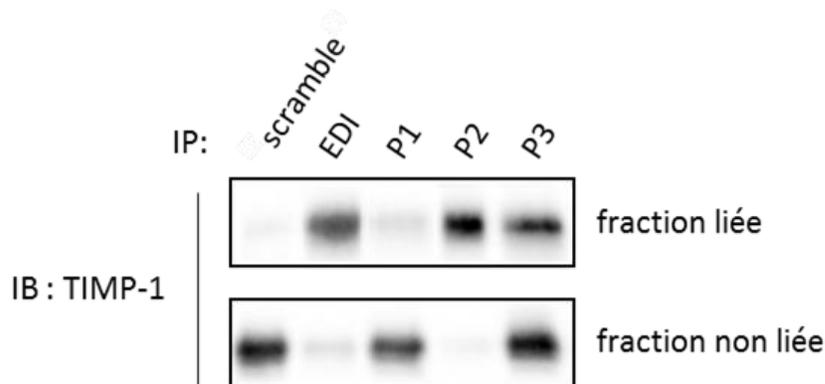
P2 : Nter – VLSQTIIQG – Cter

P3 : Nter – TIIQGATPGS – Cter

Figure 55: Schéma représentatif des peptides chevauchants P1, P2 et P3 au sein de la séquence du domaine EDI de CD63

Les séquences soulignées mettent en évidence les régions communes entre les peptides.

A



B

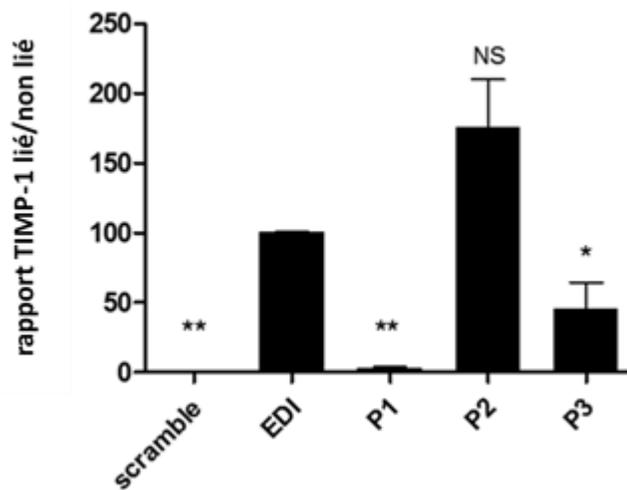


Figure 56: Etude de l'interaction du TIMP-1 avec les peptides P1, P2 et P3 issus du domaine EDI

A. Les peptides scramble, EDI, P1, P2 et P3 avec un tag 6 Histidines sont capturés sur résine de Nickel puis incubés en présence de TIMP-1 FLAG. La fraction non liée aux billes est récupérée. Après lavages, la fraction liée aux billes est éluée. Les échantillons sont déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-TIMP-1 sont réalisées.

B. Les bandes obtenues par immunoempreinte sont quantifiées à l'aide du logiciel Image J et les résultats sont exprimés en pourcentage de TIMP-1 lié par rapport TIMP-1 lié sur le peptide EDI.

Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations réalisées de manière indépendante. Test Student. NS : non significatif

Après capture des peptides P1, P2 et P3 sur la résine, le TIMP-1 est incubé pendant une nuit. Une immunoempreinte anti-TIMP-1 est réalisée sur les fractions liées et non liées aux peptides (Figure 56 A). La figure 56 montre que le TIMP-1 ne se lie pas au peptide P1, alors qu'il se lie aux peptides P2 et P3. Cependant, le rapport TIMP-1 lié/TIMP-1 non lié est plus faible avec le peptide P3 (Figure 56 B). Seule la séquence codant le peptide P2 semble permettre une liaison optimale du TIMP-1. Ces résultats montrent que la séquence TIIQG semble être la séquence minimale au sein du domaine EDI qui fixe le TIMP-1.

Pour confirmer ces résultats, nous avons fait synthétiser le peptide EDI dans lequel la séquence TIIQG a été substituée par 5 Alanines (ED1a). Des expériences de fixation similaires à celles précédemment réalisées ont été menées (Figure 57). Des immunoempreintes anti-TIMP-1 sur les fractions liées et non liées révèlent la présence de TIMP-1 dans la fraction non liée lorsque la séquence TIIQG est mutée. Ce résultat confirme que la séquence TIIQG est nécessaire à la liaison du TIMP-1 au domaine EDI de la glycoprotéine CD63.

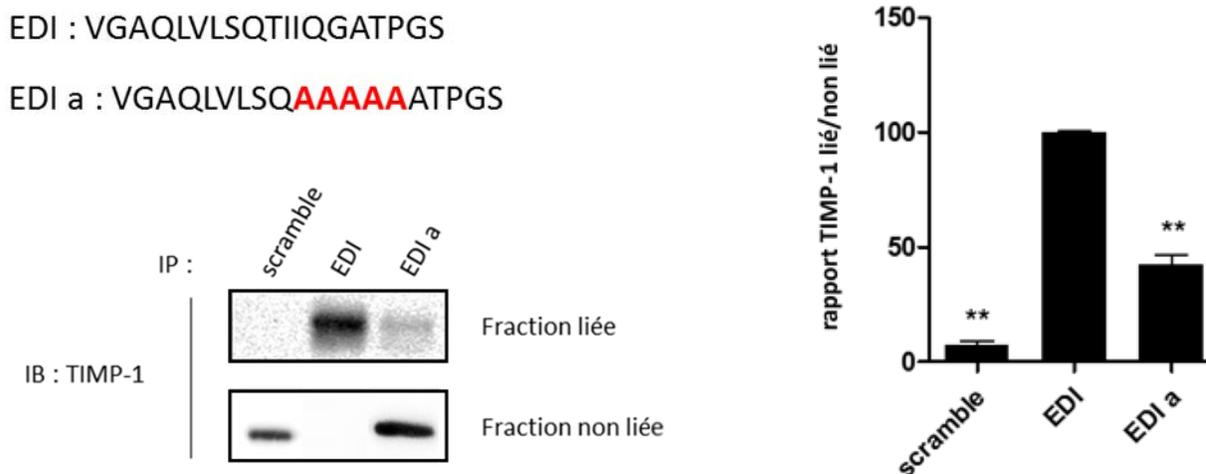


Figure 57: Etude de la liaison du TIMP-1 au peptide EDI a

A. Séquence des peptides EDI et ED1a

B. Les peptides scramble, EDI, et EDI a avec un tag 6 Histidines sont capturés sur résine de Nickel puis incubés en présence de TIMP-1 FLAG. La fraction non liée aux billes est récupérée. Après lavages, la fraction liée aux billes est éluée. Les échantillons sont déposés sur gel d'électrophorèse et des immunoempreintes anti-TIMP-1 sont réalisées

C. Les bandes obtenues par immunoempreinte sont quantifiées à l'aide du logiciel Image J et les résultats sont exprimés en pourcentage de TIMP-1 lié par rapport TIMP-1 lié sur le peptide EDI

Ces résultats sont représentatifs de 3 expérimentations réalisées de manière indépendante. ** : $p < 0,01$

DISCUSSION

L'inhibiteur tissulaire des métalloprotéases-1 (TIMP-1) contrôle de nombreux processus cellulaires physiologiques en inhibant l'activité enzymatique des MMPs (Sternlicht and Werb, 2001). En conditions pathologiques, l'inhibition de certaines MMPs pourrait permettre de limiter la progression tumorale et le développement de maladies neurodégénératives (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010; Crocker et al., 2004). Des inhibiteurs synthétiques de MMPs ont donc été développés pour une utilisation thérapeutique mais il s'avère que ces inhibiteurs induisent de nombreux effets secondaires dus à leur manque de spécificité (Vandenbroucke and Libert, 2014). Ainsi, une autre stratégie a été de développer des variants du TIMP-1 ayant une plus grande spécificité d'inhibition (Nagase and Brew, 2002; Nagase et al., 1999; Wei et al., 2003). Cependant, aucun des variants générés n'a présenté de résultat satisfaisant permettant une utilisation thérapeutique. De plus, des effets contradictoires concernant les activités biologiques de ces variants ont été observés puisque ceux-ci, de façon paradoxale, stimulent la croissance tumorale (Bigelow et al., 2009). Ces résultats viennent appuyer les études montrant que dans différents types de cancers, la surexpression du TIMP-1 est globalement associée à un mauvais pronostic (D'Angelo et al., 2014; Jung et al., 2012; Mroczko et al., 2013, 2014). L'hypothèse permettant d'expliquer ces résultats est que cette protéine possède des activités biologiques indépendantes de l'inhibition des MMPs (Ries, 2014; Stetler-Stevenson, 2008). Ces effets passent par la fixation du TIMP-1 à des complexes récepteurs membranaires et par l'activation de voies de signalisation intracellulaire (Ries, 2014). Dans les cellules cancéreuses, deux complexes récepteurs du TIMP-1 sont identifiés, le complexe récepteur CD63/intégrine β 1 (cellules de cancers mammaires et pulmonaires) et le complexe pro-MMP-9/CD44 (cellules leucémiques) (Jung et al., 2006; Lambert et al., 2009).

Dans les maladies neurodégénératives, le TIMP-1 est également surexprimé en réponse à l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Dans un modèle de culture primaire de neurones corticaux d'embryons de souris, Ould-Yahoui et ses collaborateurs ont montré que le TIMP-1 induit une diminution de la connectivité neuronale et cet effet semble être, en partie, indépendant de l'inhibition des MMPs (Ould-yahoui et al., 2009b). Cependant, aucun récepteur du TIMP-1 n'a été à ce jour identifié dans les cellules du SNC.

La protéine LRP-1 pourrait être le récepteur du TIMP-1 dans les neurones. En effet, la localisation de ce récepteur d'endocytose est modifiée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, conduisant à une diminution de la clairance des peptides A β par la circulation sanguine et augmentant ainsi la formation des plaques séniles (Donahue et al., 2006; May et al., 2004). De plus, ce récepteur interagit avec les TIMP-2 et -3 (Emonard et al., 2004; Scilabra et al., 2013).

Nous avons mis en évidence que le TIMP-1 se fixe à LRP-1 et qu'il induit une réduction de la longueur des neurites et une augmentation du volume des cônes de croissance dans des neurones corticaux d'embryons de souris. Les effets du TIMP-1 sont bloqués par l'incubation des neurones avec RAP, le ligand préférentiel de LRP-1, ou avec R2629, un anticorps bloquant spécifique de LRP-1. De plus, nous avons montré que ces effets du TIMP-1 sont indépendants de l'inhibition des MMPs car ils sont reproduits par le mutant T2G, dépourvu d'activité inhibitrice vis-à-vis des MMPs. Par ailleurs, les effets sont spécifiques du TIMP-1 puisqu'une incubation des neurones corticaux en présence de TIMP-2 n'induit pas de changement de la morphologie neuronale alors que le TIMP-2 est exprimé au niveau du système nerveux central et qu'*in vitro* il est capable de se lier au récepteur LRP-1 (Emonard et al., 2004; Pagenstecher et al., 1998).

La réduction de la longueur des neurites et l'augmentation du volume des cônes de croissance observées en réponse au TIMP-1 sont des phénotypes antagonistes. En effet, les cônes de croissance sont associés au guidage axonal et donc à la croissance neuritique (Kalil, 1996). Une étude réalisée sur les cellules ganglionnaires rétiniennes a mis en évidence qu'une augmentation des cônes de croissance pouvait être associée à un phénomène compensatoire suite à un déficit sensoriel induit par la réduction de la longueur des neurites (Davenport et al., 1999). Selon Ould-Yahoui et ses collaborateurs, cet effet du TIMP-1 sur le volume des cônes de croissance serait plutôt lié à un stress induit par la liaison du TIMP-1 à la surface des neurones corticaux (Ould-yahoui et al., 2009b). Dans tous les cas, l'augmentation du volume des cônes de croissance ne devrait pas pouvoir compenser la perte de connectivité neuronale due à la réduction du réseau neuritique. Ainsi, dans les maladies neurodégénératives et notamment dans le cadre de la maladie d'Alzheimer cet effet cytokinique du TIMP-1 pourrait contribuer à l'évolution de la maladie.

Ces résultats sont à confirmer dans d'autres modèles cellulaires car les cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de souris utilisées ne permettent pas de différencier les neurones du cortex des neurones hippocampiques. La maladie d'Alzheimer touche en premier lieu les régions du cerveau impliquées dans le langage et la mémoire, et plus particulièrement les neurones de l'hippocampe. Il serait donc intéressant d'étudier les effets du TIMP-1 sur des neurones hippocampiques puisqu'il est possible d'isoler ces cellules à partir de cerveaux de rats.

La réduction de la longueur des neurites implique généralement les kinases Erk 1/2 (Perron and Bixby, 1999). Nous avons étudié la phosphorylation de ces kinases dans les neurones incubés avec le TIMP-1 mais nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une modulation de la phosphorylation de ces protéines. Récemment, il a été montré que la liaison de ligands tels que l' α 2-macroglobuline ou le domaine hemopexine de la MMP-9 sur LRP-1 induit une croissance axonale *in vitro* et *in vivo via*

l'activation des protéines kinases Trk, protéines impliquées dans la plasticité synaptique. Ainsi, l'activation de la protéine Trk conduit à la phosphorylation de voies de signalisation Erk 1/2 et Akt (Yoon et al., 2013). Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de la protéine Trk dans la réduction de la taille des neurites induite par le TIMP-1. Nous pourrions également nous intéresser à la voie de signalisation associée aux récepteurs Notch, qui est impliquée dans la régulation de la longueur des neurites. En effet, dans le même modèle cellulaire de neurones corticaux que nous avons utilisé, il a été mis en évidence qu'une activation de la voie Notch inhibe la croissance neuritique et induit une réduction de la taille des neurites (Sestan et al., 1999). Nous avons également mis en évidence que le TIMP-1 augmente le volume des cônes de croissance des neurones corticaux d'embryons de souris. Il serait intéressant d'étudier la voie de signalisation des protéines Wnt puisque cette voie est impliquée dans le développement des cônes de croissance et la plasticité neuronale (Budnik and Salinas, 2011).

Nos résultats montrent que les effets du TIMP-1 sur la morphologie cellulaire nécessitent l'endocytose du TIMP-1 par le récepteur LRP-1. Ce récepteur est une protéine multifonctionnelle permettant la clairance de nombreuses protéines dans le milieu extracellulaire par ce processus d'endocytose ainsi que l'activation de voies de signalisation intracellulaires associées. Après avoir été endocytés, les ligands de LRP-1 peuvent être dégradés *via* la voie lysosomale ou recyclés dans le milieu extracellulaire. Emonard et ses collaborateurs ont montré que le TIMP-2 est endocyté par LRP-1 et dégradé par la voie lysosomale (Emonard et al., 2004). Nous pouvons donc supposer que l'endocytose du TIMP-1 par LRP-1 induira sa dégradation. Afin de mettre en évidence ce processus, nous pourrions réaliser des expériences de colocalisation du TIMP-1 avec le *LysoTracker*[®], une sonde fluorescente spécifique des lysosomes. La dégradation du TIMP-1 par la voie lysosomale aura pour conséquence de moduler le ratio MMP:TIMP en faveur des MMPs dans le milieu extracellulaire. Dans certaines maladies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer, ce processus augmenterait la quantité de MMP-9 active pouvant dégrader les peptides β -amyloïdes et aurait donc un effet plutôt bénéfique en limitant le développement de la pathologie.

Les effets du TIMP-1 dans les neurones passent par sa fixation aux domaines DII et DIV de LRP-1. Afin d'envisager le blocage de la liaison du TIMP-1 à LRP-1 dans le cadre d'approches thérapeutiques, nous avons décidé de caractériser cette interaction. Nous avons dans un premier temps envisagé d'utiliser des algorithmes d'arrimage moléculaire (le *docking*) qui sont particulièrement adaptés à ce type d'étude. Cependant, ces approches nécessitent des données structurales expérimentales sur le ligand et sur son récepteur. A l'heure actuelle il y a peu de données structurales concernant le récepteur LRP-1 du fait

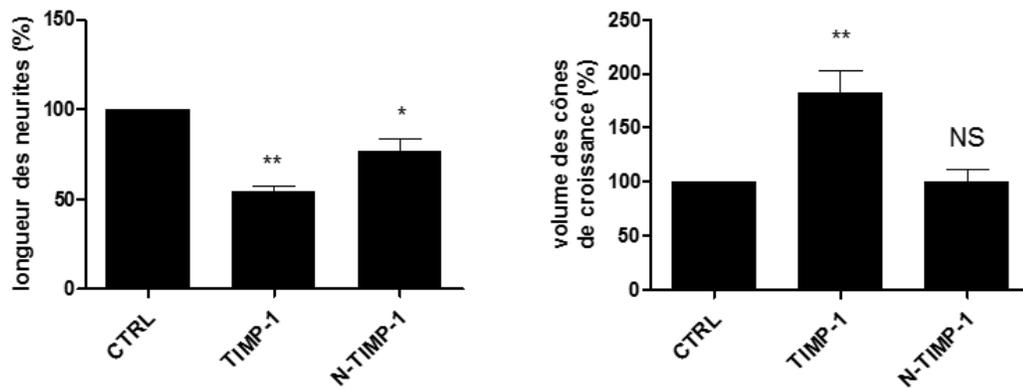


Figure 58: Etude de l'effet du N-TIMP-1 sur la morphologie neuronale.

Les neurones corticaux d'embryons de souris sont incubés en présence de TIMP-1 et de N-TIMP-1 pendant 30 minutes à 37°C. L'analyse du réseau neuritique est réalisé à l'aide du plugin Neuron J du logiciel Image J L'analyse du volume des cônes de croissance est réalisé à l'aide du logiciel AMIRA.

Ces résultats sont représentatifs de trois expérimentations réalisées de manière indépendante.

Test Student, ** : $p < 0,01$, * : $p < 0,05$, NS : non significatif

de sa masse moléculaire importante. Nous avons donc choisi de nous focaliser sur le TIMP-1 pour lequel de nombreuses données structurales sont disponibles (Gomis-Rüth et al., 1997; Grossman et al., 2010; Iyer et al., 2007). Les interactions des protéines avec leurs récepteurs impliquent le plus souvent des changements conformationnels qui peuvent être mis en évidence par l'étude de la dynamique intrinsèque des protéines (Jiang et al., 2014; Mittag et al., 2010). Nous avons donc choisi d'utiliser une approche de modélisation moléculaire permettant l'étude de la dynamique intrinsèque du TIMP-1 couplant les analyses de modes normaux et la dynamique moléculaire. Le choix de cette approche est également justifié dans le cas du TIMP-1 car des études de dynamique moléculaire ont montré la contribution de ses domaines N- et C-terminaux dans son activité inhibitrice de MMPs et donc potentiellement dans ses activités cytokiniques (Remacle et al., 2011). De plus, nous avons montré que dans le cadre de l'interaction TIMP-1/LRP-1, le domaine N-terminal du TIMP-1 ne reproduit pas les effets du TIMP-1 dans les neurones corticaux d'embryons de souris suggérant que la protéine complète est indispensable aux effets biologiques du TIMP-1 (Figure 58).

Nous avons débuté cette étude par l'analyse des modes normaux du TIMP-1, permettant de mettre en évidence les mouvements de grandes amplitudes des protéines. Les 6 premiers modes correspondent aux mouvements de translation et de rotation dans les trois dimensions de l'espace et ne sont donc pas intéressants pour l'analyse de la dynamique protéique (Hayward and de Groot, 2008; Reuter et al., 2003). A partir du mode 7, on observe les modes de grandes amplitudes de la protéine. A l'heure actuelle il est impossible de compiler l'ensemble des modes de façon à obtenir un mouvement d'ensemble de la protéine. Des résultats non publiés réalisés au sein du laboratoire (Plateau P3M) ont montré que le mode 7 contribue à hauteur de 40 % au changement de conformation du TIMP-1 (relâché/lié) nécessaire à l'interaction avec la MMP-3. La relevance physiologique de ce mouvement nous a conduits à nous focaliser sur l'étude du mode 7. Ce mode ainsi que les données de dynamique moléculaire décrivent un mouvement de pince du TIMP-1 et mettent en évidence une région charnière qui semble essentielle à l'exécution de ce mouvement. Au sein de cette région, nous avons identifié trois résidus qui pourraient être impliqués dans la réalisation du mouvement : la phénylalanine 12 (F12) et la lysine 47 (K47) qui se font face tout au long du mouvement et le tryptophane 105 (W105) qui est situé à l'entrée de la région charnière.

Afin de montrer que la dynamique du TIMP-1 est importante dans la liaison avec le récepteur LRP-1 nous avons cherché à perturber le mouvement de pince soit en le bloquant soit en le libérant. Pour bloquer le mouvement en position fermée, nous aurions pu substituer les résidus F12 et K47 par des cystéines de façon à générer un pont disulfure. Cependant, étant donné la forte probabilité que ces

mutations modifient la structure tertiaire du TIMP-1, qui possède naturellement six ponts disulfures, nous n'avons pas réalisé ces mutations. Afin de bloquer le mouvement en position ouverte, nous avons remplacé les résidus F12 et K47 soit par deux glutamates (Mutant EE) afin d'induire une répulsion électrostatique, soit par deux tryptophanes (Mutant WW) afin d'augmenter l'encombrement stérique. Ces mutants ont été générés, mais ils ne sont produits qu'en faible quantité par les cellules CHO et ne sont pas sécrétés. C'est pourquoi nous n'avons pas pu étudier les activités biologiques de ces mutants. La deuxième approche a consisté à libérer le mouvement de pince. Nous avons donc substitué les résidus par des alanines induisant une perte des interactions électrostatiques entre les résidus F12 et K47 et une perte d'encombrement stérique pour le W105. Nous avons réussi à produire et purifier ces mutants en quantité suffisante pour réaliser nos études. Afin de vérifier que ces mutations ne modifient pas la structure secondaire du TIMP-1, nous avons envisagé des analyses de dichroïsme circulaire, technique très utilisée pour mettre en évidence l'absence d'altération structurale dans des protéines mutées (Huang et al., 1996; Kelly et al., 2005). Cependant, cette technique nécessite des concentrations protéiques très élevées. Nous n'avons pas réussi à concentrer suffisamment le TIMP-1 et les mutants pour réaliser ce type d'analyse. On peut cependant supposer que la structure secondaire des mutants est similaire à celle du TIMP-1 sauvage puisque les mutants sont capables d'inhiber les MMP-1, -2, -3 et -9.

Une fois les mutants F12A, K47A et W105A purifiés, nous avons testé leur interaction avec le récepteur LRP-1 ainsi que les effets biologiques associés dans le modèle de neurones corticaux d'embryons de souris. Nous avons montré que les mutants n'induisent pas de réduction de la longueur des neurites alors qu'ils induisent une augmentation du volume des cônes de croissance. En effet, l'incubation des neurones avec chacun des trois mutants induit un phénotype intermédiaire avec des neurites de grande taille et des cônes de croissance développés.

L'augmentation du volume des cônes de croissance par les mutants est bloquée lorsque les neurones sont incubés en présence de RAP. Ces résultats suggèrent donc que les mutants sont capables d'interagir avec LRP-1. Des analyses de résonance plasmonique de surface ont confirmé que les trois mutants se lient aux domaines DII et DIV de LRP-1 avec une affinité similaire au TIMP-1 sauvage. De plus, la co-incubation des neurones avec un mélange TIMP-1/mutants dans un ratio 1:3 inhibe l'effet du TIMP-1 sur la longueur des neurites (résultats préliminaires non montrés). Ces résultats suggèrent que les mutants entrent en compétition avec le TIMP-1 sauvage et par conséquent qu'ils sont capables de se lier à LRP-1 à la surface des neurones corticaux d'embryons de souris.

Cependant, les mutants ne sont pas endocytés. Les mutations semblent donc empêcher le déclenchement de l'endocytose. Il serait intéressant d'analyser la phosphorylation de la chaîne intracellulaire du récepteur LRP-1 au niveau de la tyrosine 4507 du motif NPXY, afin de voir si les mutations altèrent cette phosphorylation essentielle au processus d'endocytose. En effet, cette phosphorylation permet de rendre accessible le second domaine NPXY de LRP-1 et la phosphorylation de la tyrosine 4473 ainsi que le recrutement de protéines adaptatrices permettant l'initiation de l'endocytose (Betts et al., 2008; Guttman et al., 2009; Li et al., 2000). Il serait également intéressant de regarder le recrutement des protéines cargo telles que la protéine AP-2, protéine impliquée dans le déclenchement de l'endocytose, au niveau du domaine intracellulaire de LRP-1. Par ailleurs, l'étude des voies de signalisation impliquées dans la réduction de la longueur des neurites induite par le TIMP-1 devrait permettre de relier le processus d'endocytose à cet effet biologique.

Les trois mutants n'étant pas endocytés *via* le récepteur LRP-1, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'ils n'induisent pas l'activation de ce récepteur. Ces résultats supposent que l'effet du TIMP-1 sur les cônes de croissance nécessite l'activation d'un co-récepteur. LRP-1 pourrait servir d'ancrage au TIMP-1 sauvage et aux mutants et permettre le recrutement d'un co-récepteur responsable du déclenchement de voies de signalisation cellulaires selon un mode d'action similaire au complexe récepteur formé par la glycoprotéine CD63 et l'intégrine β 1. Dans les cellules épithéliales mammaires le TIMP-1 se lie à la glycoprotéine CD63, permettant le recrutement de l'intégrine β 1 et l'activation de voies de signalisation cellulaires associées à cette protéine (Toricelli et al., 2013). Des études ont d'ailleurs montré que les membres de la famille des protéines LRP interagissent avec les récepteurs membranaires Frizzled par l'intermédiaire d'un adaptateur moléculaire de la famille des protéines Wnt (Cong et al., 2004). De plus, ces protéines sont impliquées dans le développement des cônes de croissance (Budnik and Salinas, 2011; Lie et al., 2005). Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de ces différentes protéines dans le développement des cônes de croissance induit par le TIMP-1.

Les résultats obtenus avec les mutants sur la morphologie neuronale ont donc mis en évidence un découplage des effets cellulaires du TIMP-1 dans les neurones. Ils ont permis d'identifier une région qui n'est pas impliquée dans la liaison avec le récepteur LRP-1 mais qui semble perturber la dynamique de la protéine. La perturbation de cette région semble empêcher l'activation du récepteur LRP-1 et plus particulièrement le processus d'endocytose, qui paraît essentiel à l'effet du TIMP-1 sur la taille des neurites. Le ciblage de cette région du TIMP-1 par des agents bloquants (anticorps, molécules chimiques...) pourrait permettre de limiter les effets du TIMP-1 sur la connectivité neuronale dans un contexte pathologique.

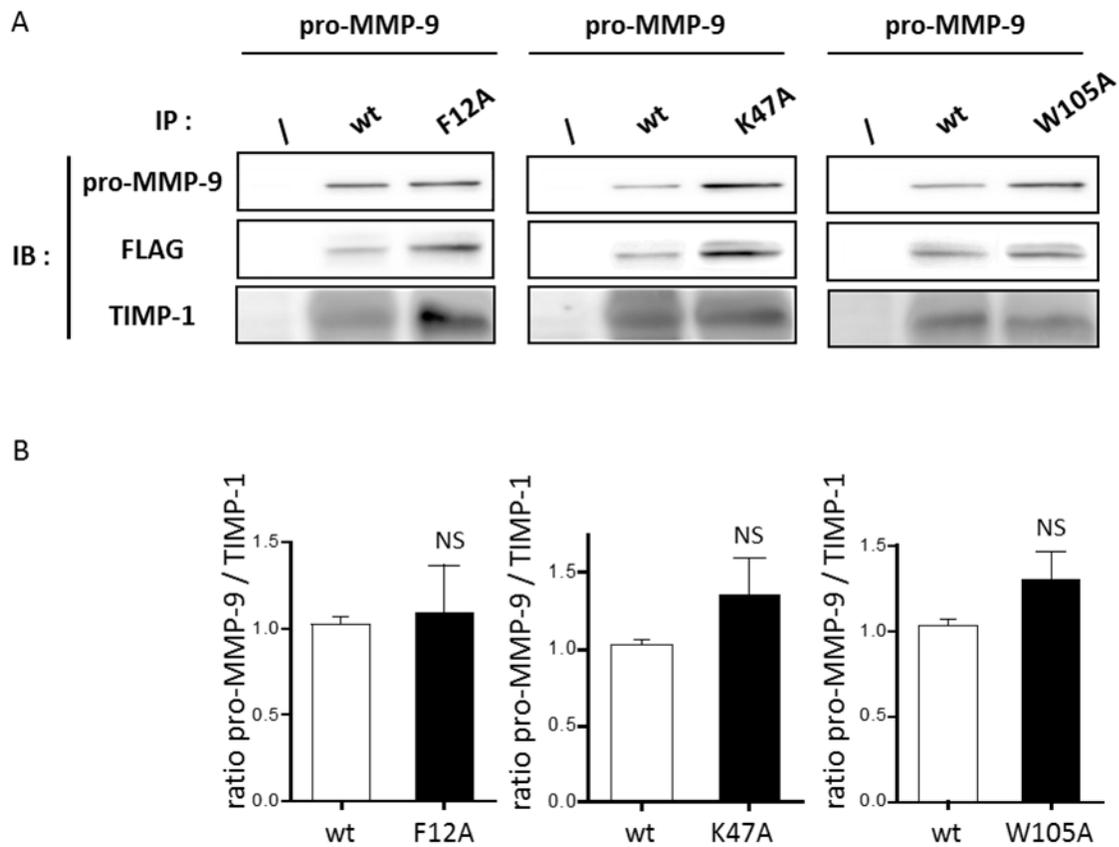


Figure 59: Etude de l'interaction entre le TIMP-1 (wt) ou les mutants et la pro-MMP-9

A. Immunoprécipitation du TIMP-1 ou des mutants à l'aide de la résine anti-FLAG et incubation en présence de pro-MMP-9. Des immunoblots anti pro-MMP-9, anti FLAG et anti-TIMP-1 sont réalisés.

B. Quantification des immunoblots grâce au logiciel Image J.

Ces résultats sont représentatifs de trois expérimentations réalisées de manière indépendante.

Test Student, NS : non significatif.

Si LRP-1 est un récepteur du TIMP-1 dans les neurones, on peut s'interroger sur l'existence d'une telle interaction dans d'autres types cellulaires. L'interaction TIMP-1/LRP-1 étant directe elle peut avoir lieu dans d'autres cellules que les neurones corticaux, ce que montrent notamment nos expériences d'endocytose et d'immunoprécipitation réalisées sur les cellules CHO. Dans les cellules épithéliales mammaires MCF10A, le TIMP-1 possède aussi des activités biologiques indépendantes de l'inhibition des MMPs *via* sa fixation au récepteur CD63/intégrine β 1. Il serait donc intéressant d'étudier le rôle éventuel de LRP-1 dans cette interaction et dans la modulation de ces effets (D'Angelo et al., 2014; Taube et al., 2006).

Malgré de nombreuses publications soulignant les effets délétères de l'interaction du TIMP-1 avec CD63 dans les cancers, l'interaction du TIMP-1 avec ce récepteur n'est toujours pas caractérisée. Nous avons donc testé la capacité des trois mutants à interagir avec la glycoprotéine CD63 et à stimuler la survie des cellules épithéliales mammaires MCF10A. Nous avons montré que les trois mutants induisent la survie des cellules MCF10A de façon similaire au TIMP-1 sauvage. De plus, nos expériences d'immunoprécipitation ont montré que les trois mutants interagissent avec la glycoprotéine CD63. Les mutations réalisées ne perturbent donc pas l'interaction du TIMP-1 avec la glycoprotéine CD63 ni ses activités biologiques associées. Des résultats similaires ont été obtenus avec les trois mutants dans les cellules érythroleucémiques UT-7 où le TIMP-1 interagit avec la pro-MMP-9 associée à la glycoprotéine CD44. Les mutations n'altèrent pas l'interaction du TIMP-1 avec la pro-MMP-9 (Figure 59). Ces résultats indiquent que la zone mutée est essentielle à l'effet du TIMP-1 passant par LRP-1 mais ne participent pas à l'interaction du TIMP-1 avec ses autres récepteurs identifiés.

L'interaction entre le TIMP-1 et le complexe récepteur CD63/intégrine β 1 est impliquée dans le développement de cancers (cancers mammaires et pulmonaires, mélanomes) en induisant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire (Egea et al., 2012; Lee et al., 2014; Vesuna et al., 2008; Xia et al., 2012). Le ciblage de cette interaction présente donc un grand intérêt thérapeutique. Les mutants du TIMP-1 que nous avons générés en tenant compte de la dynamique de la protéine ne nous ont pas permis de décrypter cette interaction. Pour apporter des données supplémentaires nous avons initié une approche expérimentale plus traditionnelle couplant la mutagenèse dirigée et des expériences de co-immunoprécipitation afin d'identifier sur le récepteur CD63 des zones d'interaction avec le TIMP-1. Pour cela, nous avons dans un premier temps essayé de produire et purifier chacun des deux domaines extracellulaires du récepteur CD63 (EDI et EDII). Cependant, nous n'avons pas réussi à produire le domaine

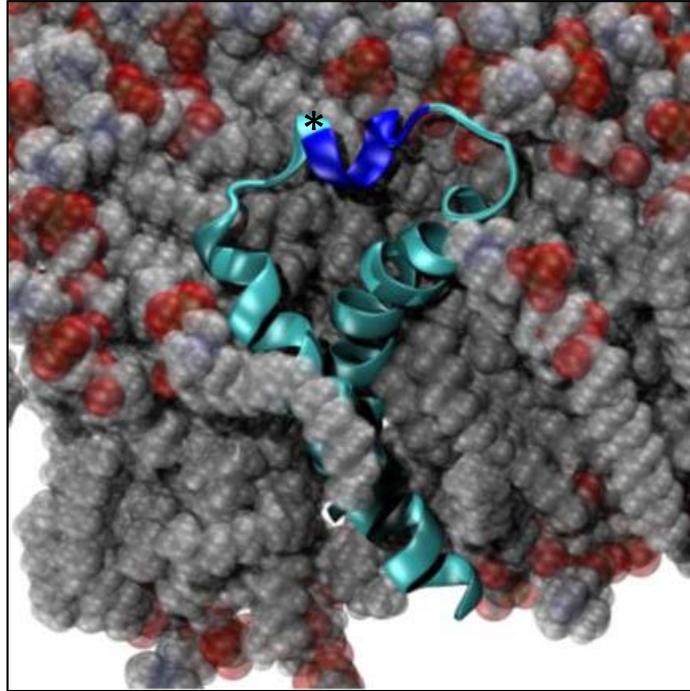


Figure 60: Simulation de l'ancrage du domaine EDI dans la membrane plasmique

Des simulations numériques ont permis de déterminer l'ancrage du domaine EDI et des domaines transmembranaires dans la membrane plasmique. La séquence TIIQG est représentée en bleu. L'étoile représente le résidu Q situé en amont de la séquence TIIQG

EDII dans un système procaryote. En effet, nous n'avons observé aucune bande de surexpression, ni dans les corps d'inclusion, ni dans le milieu de culture des bactéries. Ce résultat pourrait s'expliquer par une dégradation résultant d'une mauvaise maturation de cette protéine. Ce domaine possède 3 sites de glycosylation et subit donc habituellement des modifications post-traductionnelles qui n'ont pas lieu dans un système procaryote. Il serait intéressant de cloner ce domaine dans un vecteur d'expression permettant sa sécrétion sous forme soluble dans un système eucaryote (levures, cellules d'insectes, lignée cellulaire CHO ou HEK par exemple). La production de ce domaine devrait permettre d'étudier la fixation du TIMP-1 avec ce domaine afin de caractériser au mieux l'interaction.

Le domaine EDI de CD63 étant composé de 19 acides aminés, sa production a été réalisée par synthèse chimique. Nous avons mis en évidence que le TIMP-1 interagit avec ce domaine. Nous avons ensuite réalisé des peptides chevauchants afin de déterminer la séquence minimale d'interaction. Le TIMP-1 interagit avec les peptides P2 et P3, correspondant aux 14 derniers acides aminés du domaine EDI. Ces résultats montrent que la séquence TIIQG, commune à ces 2 peptides permet l'interaction du TIMP-1 au domaine EDI. Ces résultats ont été confirmés par la perte d'interaction du TIMP-1 avec ce domaine lorsque ces cinq résidus sont substitués par des alanines. Une quantité plus importante de TIMP-1 lié est obtenue avec le peptide P2 suggérant que celui-ci possède des résidus complémentaires à la séquence minimale favorisant l'interaction.

Nous avons modélisé la structure du domaine EDI et l'ancrage de ses domaines transmembranaires dans la membrane plasmique grâce à des expériences de simulation moléculaire (Figure 60). Ces résultats montrent que le domaine EDI se structure en hélice α à la surface de la membrane plasmique et que la séquence TIIQG participe à cette structure (représentée en bleu foncé dans la figure 60). Dans cette représentation, le résidu glutamine (représenté par une étoile) situé en amont de la séquence TIIQG semble participer à la formation de l'hélice α . La présence du résidu Q dans le peptide P2 pourrait expliquer la différence d'interaction du TIMP-1 avec les peptides P2 et P3.

L'identification de cette séquence minimale nous a permis de mettre en œuvre des expériences de docking moléculaire afin d'identifier la région du TIMP-1 interagissant avec le domaine EDI. Ce type d'analyse pour un peptide non structuré ne peut être réalisé qu'avec des séquences composées au maximum de neuf résidus. Nous avons donc utilisé la séquence complète du peptide P2.

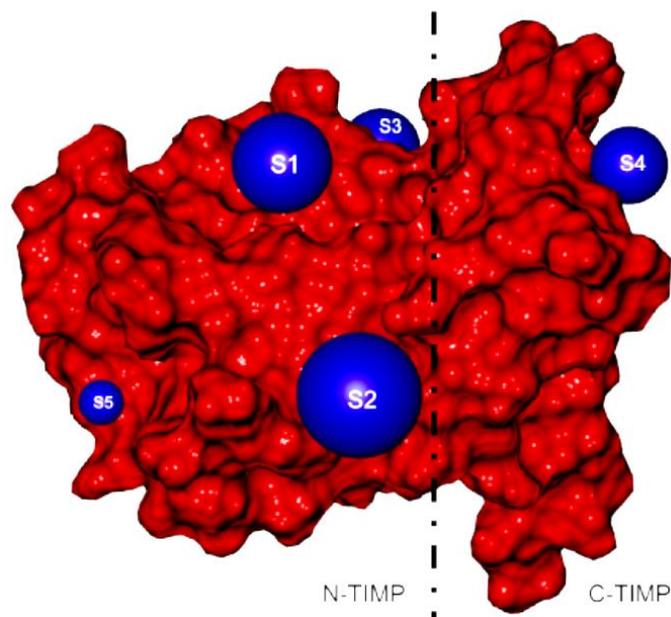


Figure 61: Représentation surfacique du TIMP 1 avec les 5 sites de liaison à forte probabilité pour le peptide P2

La surface du TIMP-1 est représentée en rouge et les sites à forte probabilité d'interaction avec le peptide P2 apparaissent sous forme de sphères bleues. Le centre de la sphère correspond au centre de gravité de la pose médoïde du peptide et le rayon de la sphère est fonction de l'effectif du groupe.

Pour réaliser ce docking, deux approches ont été utilisées afin de générer la structure tridimensionnelle du peptide P2 en utilisant le logiciel PEP FOLD. D'une part la structure 3D de la partie C-terminale du peptide P2 avec les chaînes principales et latérales flexibles (peptide P2a) et d'autre par la structure 3D du peptide P2 avec la chaîne principale rigide (peptide P2b). Les peptides ont ensuite été hydrogénés grâce au logiciel Avogadro et préparés avec AutoDockTools. Le TIMP-1 issu de la structure PDB n°1UEA est préparé de la même façon que pour réaliser les modes normaux, une minimisation est réalisée dans CHARMM avec les algorithmes *Steepest descent et Adopted Basis – Newton Raphson – ABNR*. Le docking a ensuite été réalisé selon la méthode de *Blind Docking* et 5120 poses du peptide P2 à la surface du TIMP-1 ont été obtenues.

Le docking a été réalisé selon la méthode de *Blind Docking* et 5 120 poses du peptide P2 à la surface du TIMP-1 ont été obtenues. Après analyse des énergies de liaison, cinq sites à forte probabilité d'interaction ont été identifiés (Figure 61). Parmi ceux-ci, les sites S1 et S3 correspondent à la région d'interaction du TIMP-1 avec les MMPs. Le site S2 est situé dans la région au sein de laquelle les mutations F12A, K47A et W105A ont été réalisées. Le site S4 est situé dans le domaine C-terminal et le site S5 est situé dans une zone peu étudiée du TIMP-1. Afin de déterminer le site d'interaction le plus probable, il sera nécessaire de réaliser des expériences de mutagenèse dirigée sur le TIMP-1 en ciblant des résidus situés dans ces cinq régions. Des résultats préliminaires nous laissent penser que les sites d'interaction à privilégier seraient les sites S3, S4 et S5. En effet, les mutants F12A, K47A, W105A et T2G interagissent avec le domaine EDI (Résultats non montrés).

Le peptide P2 de par sa capacité à interagir avec le TIMP-1 pourrait être utilisé comme compétiteur afin de bloquer l'interaction du TIMP-1 avec CD63. Il faudra cependant s'assurer que le domaine EDII n'est pas impliqué dans l'interaction TIMP-1/CD63. Si le peptide P2 est capable de bloquer totalement l'interaction TIMP-1/CD63 et les effets du TIMP-1 sur les cellules cancéreuses mammaires, nous pourrions envisager de tester *in vivo* les propriétés anti-cancéreuses de ce peptide. Une amélioration du peptide P2 sera cependant nécessaire. En effet, le peptide P2 présente une forte flexibilité. Une cyclisation de ce peptide par un pont disulfure est une approche très souvent utilisée pour limiter la flexibilité des peptides et augmenter leur affinité ainsi que leur stabilité.

Enfin, il pourrait être intéressant de tester l'effet du peptide P2 sur l'interaction TIMP-1/LRP-1. En effet, un blast réalisé avec la séquence QTIIQG montre de façon intéressante que celle-ci est également présente au sein d'une seule autre protéine humaine : le récepteur LRP-1. Cette séquence est située dans le domaine DI de la chaîne α du récepteur LRP-1. Il est donc probable que ce domaine participe à l'interaction TIMP-1/LRP-1 .

L'ensemble de nos travaux ont permis d'identifier un nouveau récepteur du TIMP-1 et des régions impliquées dans l'interaction du TIMP-1 avec ses différents récepteurs. Ces résultats devraient permettre le développement de nouveaux outils pharmacologiques ciblant les activités cytokiniques du TIMP-1.

BIBLIOGRAPHIE

Aaberg-Jessen, C., Christensen, K., Offenberg, H., Bartels, A., Dreehsen, T., Hansen, S., Schrøder, H.D., Brønner, N., and Kristensen, B.W. (2009). Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *J. Neurooncol.* *95*, 117–128.

Agrawal, A., Romero-Perez, D., Jacobsen, J.A., Villarreal, F.J., and Cohen, S.M. (2008). Zinc-binding groups modulate selective inhibition of MMPs. *ChemMedChem* *3*, 812–820.

Airola, K., Karonen, T., Vaalamo, M., Lehti, K., Lohi, J., Kariniemi, A.-L., Keski-Oja, J., and Saarialho-Kere, U.K. (1999). 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* *80*, 733–743.

Akahane, T., Akahane, M., Shah, A., Connor, C.M., and Thorgeirsson, U.P. (2004). TIMP-1 inhibits microvascular endothelial cell migration by MMP-dependent and MMP-independent mechanisms. *Exp. Cell Res.* *301*, 158–167.

Allan Butterfield, D. (2002). Amyloid β -peptide (1-42)-induced Oxidative Stress and Neurotoxicity: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain. A Review. *Free Radic. Res.* *36*, 1307–1313.

Amălinei, C., Căruntu, I.D., Giușcă, S.E., and Bălan, R.A. (2010). Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* *51*, 215–228.

Apte, S.S., Olsen, B.R., and Murphy, G. (1995). The Gene Structure of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-3 and Its Inhibitory Activities Define the Distinct TIMP Gene Family. *J. Biol. Chem.* *270*, 14313–14318.

Arandjelovic, S., Hall, B.D., and Gonias, S.L. (2005). Mutation of lysine 1370 in full-length human α 2-macroglobulin blocks binding to the low density lipoprotein receptor-related protein-1. *Arch. Biochem. Biophys.* *438*, 29–35.

Armstrong, R.A. (2009). The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol. Assoc. Pol. Neuropathol. Med. Res. Cent. Pol. Acad. Sci.* *47*, 289–299.

Asahi, M., Wang, X., Mori, T., Sumii, T., Jung, J.-C., Moskowitz, M.A., Fini, M.E., and Lo, E.H. (2001). Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-Out on the Proteolysis of Blood–Brain Barrier and White Matter Components after Cerebral Ischemia. *J. Neurosci.* *21*, 7724–7732.

Askari, J.A., Buckley, P.A., Mould, A.P., and Humphries, M.J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J. Cell Sci.* *122*, 165–170.

Avalos, B.R., Kaufman, S.E., Tomonaga, M., Williams, R.E., Golde, D.W., and Gasson, J.C. (1988). K562 cells produce and respond to human erythroid-potentiating activity. *Blood* *71*, 1720–1725.

Avolio, C., Ruggieri, M., Giuliani, F., Liuzzi, G.M., Leante, R., Riccio, P., Livrea, P., and Trojano, M. (2003). Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. *J. Neuroimmunol.* *136*, 46–53.

Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B., and Varner, J.A. (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 604–617.

- Axelsen, P.H., Komatsu, H., and Murray, I.V.J. (2011). Oxidative stress and cell membranes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Physiol. Bethesda Md* 26, 54–69.
- Backstrom, J.R., Lim, G.P., Cullen, M.J., and Tökés, Z.A. (1996). Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Is Synthesized in Neurons of the Human Hippocampus and Is Capable of Degrading the Amyloid- β Peptide (1–40). *J. Neurosci.* 16, 7910–7919.
- Baker, A.H., Edwards, D.R., and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.* 115, 3719–3727.
- Bao, Q., Niess, H., Djafarzadeh, R., Zhao, Y., Schwarz, B., Angele, M.K., Jauch, K.-W., Nelson, P.J., and Bruns, C.J. (2014). Recombinant TIMP-1-GPI inhibits growth of fibrosarcoma and enhances tumor sensitivity to doxorubicin. *Target. Oncol.* 9, 251–261.
- Baranger, K., Rivera, S., Liechti, F.D., Grandgirard, D., Bigas, J., Seco, J., Tarrago, T., Leib, S.L., and Khrestchatsky, M. (2014). Endogenous and synthetic MMP inhibitors in CNS pathophysiology. In *Progress in Brain Research*, B.W.-H. and A.P. Alexander Dityatev, ed. (Elsevier), pp. 313–351.
- Barczyk, M., Carracedo, S., and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell Tissue Res.* 339, 269–280.
- Barkan, D., and Chambers, A.F. (2011). β 1-Integrin: A Potential Therapeutic Target in the Battle against Cancer Recurrence. *Clin. Cancer Res.* 17, 7219–7223.
- Barkho, B.Z., Munoz, A.E., Li, X., Li, L., Cunningham, L.A., and Zhao, X. (2008). Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 3139–3149.
- Barmina, O.Y., Walling, H.W., Fiocco, G.J., Freije, J.M., López-Otín, C., Jeffrey, J.J., and Partridge, N.C. (1999). Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J. Biol. Chem.* 274, 30087–30093.
- Bauvois, B. (2012). New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim. Biophys. Acta* 1825, 29–36.
- Bellon, G., Martiny, L., and Robinet, A. (2004). Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49, 203–220.
- Benbow, U., and Brinckerhoff, C.E. (1997). The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 15, 519–526.
- Benson, C.S., Babu, S.D., Radhakrishna, S., Selvamurugan, N., and Ravi Sankar, B. (2013). Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis. Markers* 34, 395–405.
- Berditchevski, F., and Odintsova, E. (1999). Characterization of Integrin–Tetraspanin Adhesion Complexes Role of Tetraspanins in Integrin Signaling. *J. Cell Biol.* 146, 477–492.

- Berditchevski, F., Zutter, M.M., and Hemler, M.E. (1996). Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol. Biol. Cell* 7, 193–207.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2, 737–744.
- Bernardo, M.M., and Fridman, R. (2003). TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem. J.* 374, 739–745.
- Berthet, V., Rigot, V., Champion, S., Secchi, J., Fouchier, F., Marvaldi, J., and Luis, J. (2000). Role of Endoproteolytic Processing in the Adhesive and Signaling Functions of $\alpha\beta 5$ Integrin. *J. Biol. Chem.* 275, 33308–33313.
- Bertrand-Philippe, M., Ruddell, R.G., Arthur, M.J.P., Thomas, J., Mungalsingh, N., and Mann, D.A. (2004). Regulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Gene Transcription by RUNX1 and RUNX2. *J. Biol. Chem.* 279, 24530–24539.
- Betts, G.N., Geer, P. van der, and Komives, E.A. (2008). Structural and Functional Consequences of Tyrosine Phosphorylation in the LRP1 Cytoplasmic Domain. *J. Biol. Chem.* 283, 15656–15664.
- Bigelow, R.L.H., Williams, B.J., Carroll, J.L., Daves, L.K., and Cardelli, J.A. (2009). TIMP-1 overexpression promotes tumorigenesis of MDA-MB-231 breast cancer cells and alters expression of a subset of cancer promoting genes in vivo distinct from those observed in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* 117, 31–44.
- Bissett, D., O'Byrne, K.J., Pawel, J. von, Gatzemeier, U., Price, A., Nicolson, M., Mercier, R., Mazabel, E., Penning, C., Zhang, M.H., et al. (2005). Phase III Study of Matrix Metalloproteinase Inhibitor Prinomastat in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 842–849.
- Bjerre, C., Vinther, L., Belling, K.C., Würtz, S.Ø., Yadav, R., Lademann, U., Rigina, O., Do, K.N., Ditzel, H.J., Lykkesfeldt, A.E., et al. (2013). TIMP1 overexpression mediates resistance of MCF-7 human breast cancer cells to fulvestrant and down-regulates progesterone receptor expression. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 34, 3839–3851.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., and Maskos, K. (1999a). Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 55, 639–652.
- Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Grams, F., Gomis-Rüth, F.X., Nagase, H., Tschesche, H., and Maskos, K. (1999b). Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 878, 73–91.
- Bódi, J., Mihala, N., Hajnal, A., Medzihradzky, K.F., and Süli-Vargha, H. (2003). Synthesis of the C-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 9, 430–441.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 786–801.

- Bornstein, P., and Sage, E.H. (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 608–616.
- Bosman, F.T., and Stamenkovic, I. (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* *200*, 423–428.
- Bourboulia, D., and Stetler-Stevenson, W.G. (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin. Cancer Biol.* *20*, 161–168.
- Bourguignon, L.Y.W., Shiina, M., and Li, J.-J. (2014). Chapter Ten - Hyaluronan–CD44 Interaction Promotes Oncogenic Signaling, microRNA Functions, Chemoresistance, and Radiation Resistance in Cancer Stem Cells Leading to Tumor Progression. In *Advances in Cancer Research*, Melanie A. Simpson and Paraskevi Heldin, ed. (Academic Press), pp. 255–275.
- Brakebusch, C., and Fässler, R. (2005). β 1 integrin function in vivo: Adhesion, migration and more. *Cancer Metastasis Rev.* *24*, 403–411.
- Brew, K., and Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 55–71.
- Bridoux, L., Etique, N., Lambert, E., Thevenard, J., Sowa, M.-L., Belloy, N., Dauchez, M., Martiny, L., and Charpentier, E. (2013). A crucial role for Lyn in TIMP-1 erythroid cell survival signalling pathway. *FEBS Lett.* *587*, 1524–1528.
- Browner, M.F., Smith, W.W., and Castelano, A.L. (1995). Matrilysin-inhibitor complexes: common themes among metalloproteases. *Biochemistry (Mosc.)* *34*, 6602–6610.
- Buache, E., Etique, N., Alpy, F., Stoll, I., Muckensturm, M., Reina-San-Martin, B., Chenard, M.P., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2011). Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene* *30*, 3261–3273.
- Budnik, V., and Salinas, P.C. (2011). Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *21*, 151–159.
- Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a004994.
- Caterina, N.C., Windsor, L.J., Bodden, M.K., Yermovsky, A.E., Taylor, K.B., Birkedal-Hansen, H., and Engler, J.A. (1998). Glycosylation and NH₂-terminal domain mutants of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *Biochim. Biophys. Acta* *1388*, 21–34.
- Chakraborti, S., Mandal, M., Das, S., Mandal, A., and Chakraborti, T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol. Cell. Biochem.* *253*, 269–285.
- Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* *11*, S37–S43.

- Chetty, C., Vanamala, S.K., Gondi, C.S., Dinh, D.H., Gujrati, M., and Rao, J.S. (2012). MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. *Cell. Signal.* *24*, 549–559.
- Chirco, R., Liu, X.-W., Jung, K.-K., and Kim, H.-R.C. (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 99–113.
- Choi, D.-H., Kim, Y.-J., Kim, Y.-G., Joh, T.H., Beal, M.F., and Kim, Y.-S. (2011). Role of matrix metalloproteinase 3-mediated alpha-synuclein cleavage in dopaminergic cell death. *J. Biol. Chem.* *286*, 14168–14177.
- Chung, Y.C., Kim, Y.-S., Bok, E., Yune, T.Y., Maeng, S., and Jin, B.K. (2013). MMP-3 Contributes to Nigrostriatal Dopaminergic Neuronal Loss, BBB Damage, and Neuroinflammation in an MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Mediators Inflamm.* *2013*.
- Clark, I.M., Rowan, A.D., Edwards, D.R., Bech-Hansen, T., Mann, D.A., Bahr, M.J., and Cawston, T.E. (1997). Transcriptional activity of the human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) gene in fibroblasts involves elements in the promoter, exon 1 and intron 1. *Biochem. J.* *324 (Pt 2)*, 611–617.
- Cong, F., Schweizer, L., and Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the β -catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* *131*, 5103–5115.
- Cossins, J.A., Clements, J.M., Ford, J., Miller, K.M., Pigott, R., Vos, W., Van der Valk, P., and De Groot, C.J. (1997). Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *94*, 590–598.
- Crocker, S.J., Pagenstecher, A., and Campbell, I.L. (2004). The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* *75*, 1–11.
- Crocker, S.J., Whitmire, J.K., Frausto, R.F., Chertboonmuang, P., Soloway, P.D., Whitton, J.L., and Campbell, I.L. (2006). Persistent macrophage/microglial activation and myelin disruption after experimental autoimmune encephalomyelitis in tissue inhibitor of metalloproteinase-1-deficient mice. *Am. J. Pathol.* *169*, 2104–2116.
- Damm, E.-M., Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Kurzchalia, T., and Helenius, A. (2005). Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis. *J. Cell Biol.* *168*, 477–488.
- D'Angelo, R.C., Liu, X.-W., Najy, A.J., Jung, Y.S., Won, J., Chai, K.X., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2014). TIMP-1 via TWIST1 Induces EMT Phenotypes in Human Breast Epithelial Cells. *Mol. Cancer Res.* molcanres.0105.2014.
- Dassé, E., Bridoux, L., Baranek, T., Lambert, E., Salesse, S., Sowa, M.L., Martiny, L., Trentesaux, C., and Petitfrère, E. (2007). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promotes hematopoietic differentiation via caspase-3 upstream the MEKK1/MEK6/p38 α pathway. *Leukemia* *21*, 595–603.
- Davenport, R.W., Thies, E., and Cohen, M.L. (1999). Neuronal growth cone collapse triggers lateral extensions along trailing axons. *Nat. Neurosci.* *2*, 254–259.

- Davidson, M.L., Würtz, S., Rømer, M.U., Sørensen, N.M., Johansen, S.K., Christensen, I.J., Larsen, J.K., Offenberg, H., Brüner, N., and Lademann, U. (2006). TIMP-1 gene deficiency increases tumour cell sensitivity to chemotherapy-induced apoptosis. *Br. J. Cancer* *95*, 1114–1120.
- Decock, J., Thirkettle, S., Wagstaff, L., and Edwards, D.R. (2011). Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 1254–1265.
- Delany, A.M., Jeffrey, J.J., Rydziel, S., and Canalis, E. (1995). Cortisol increases interstitial collagenase expression in osteoblasts by post-transcriptional mechanisms. *J. Biol. Chem.* *270*, 26607–26612.
- Deryugina, E.I., and Quigley, J.P. (2010). Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 103–120.
- Dingemans, A.-M.C., van den Boogaart, V., Vosse, B.A., van Suylen, R.-J., Griffioen, A.W., and Thijssen, V.L. (2010). Integrin expression profiling identifies integrin alpha5 and beta1 as prognostic factors in early stage non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* *9*, 152.
- Djafarzadeh, R., Milani, V., Rieth, N., von Luettichau, I., Skrablin, P.S., Hofstetter, M., Noessner, E., and Nelson, P.J. (2009). TIMP-1-GPI in combination with hyperthermic treatment of melanoma increases sensitivity to FAS-mediated apoptosis. *Cancer Immunol. Immunother. CII* *58*, 361–371.
- Djafarzadeh, R., Conrad, C., Notohamiprodjo, S., Hipp, S., Niess, H., Bruns, C.J., and Nelson, P.J. (2014). Cell surface engineering using glycosylphosphatidylinositol anchored tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 stimulates cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* *22*, 70–76.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 857–902.
- Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., et al. (2006). RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *112*, 405–415.
- Doruker, P., Atilgan, A.R., and Bahar, I. (2000). Dynamics of proteins predicted by molecular dynamics simulations and analytical approaches: Application to α -amylase inhibitor. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *40*, 512–524.
- Douglas, D.A., Shi, Y.E., and Sang, Q.A. (1997). Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J. Protein Chem.* *16*, 237–255.
- D'Souza, C.A., Mak, B., and Moscarello, M.A. (2002). The Up-regulation of Stromelysin-1 (MMP-3) in a Spontaneously Demyelinating Transgenic Mouse Precedes Onset of Disease. *J. Biol. Chem.* *277*, 13589–13596.
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., Loyens, A., Galas, M.-C., Bousset, L., Melki, R., et al. (2014). Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One* *9*, e100760.
- Edwards, D.R., Rocheleau, H., Sharma, R.R., Wills, A.J., Cowie, A., Hassell, J.A., and Heath, J.K. (1992). Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of

metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1171*, 41–55.

Egea, V., Zahler, S., Rieth, N., Neth, P., Popp, T., Kehe, K., Jochum, M., and Ries, C. (2012). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E309–E316.

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

El-Agnaf, O.M.A., and Irvine, G.B. (2002). Aggregation and neurotoxicity of alpha-synuclein and related peptides. *Biochem. Soc. Trans.* *30*, 559–565.

Emonard, H., Bellon, G., Troeberg, L., Berton, A., Robinet, A., Henriët, P., Marbaix, E., Kirkegaard, K., Patthy, L., Eeckhout, Y., et al. (2004a). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2-TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* *279*, 54944–54951.

Emonard, H., Bellon, G., Troeberg, L., Berton, A., Robinet, A., Henriët, P., Marbaix, E., Kirkegaard, K., Patthy, L., Eeckhout, Y., et al. (2004b). Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Endocytic Clearance of Pro-MMP-2-TIMP-2 Complex through a Thrombospondin-independent Mechanism. *J. Biol. Chem.* *279*, 54944–54951.

Emonard, H., Bellon, G., de Diesbach, P., Mettlen, M., Hornebeck, W., and Courtoy, P.J. (2005). Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an “old friend.” *Biochimie* *87*, 369–376.

Enghild, J.J., Salvesen, G., Brew, K., and Nagase, H. (1989). Interaction of human rheumatoid synovial collagenase (matrix metalloproteinase 1) and stromelysin (matrix metalloproteinase 3) with human alpha 2-macroglobulin and chicken ovostatin. Binding kinetics and identification of matrix metalloproteinase cleavage sites. *J. Biol. Chem.* *264*, 8779–8785.

Etique, N., Verzeaux, L., Dedieu, S., and Emonard, H. (2013). LRP-1: a checkpoint for the extracellular matrix proteolysis. *BioMed Res. Int.* *2013*, 152163.

Fainardi, E., Castellazzi, M., Bellini, T., Manfrinato, M.C., Baldi, E., Casetta, I., Paolino, E., Granieri, E., and Dallochio, F. (2006). Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *12*, 294–301.

Farina, A.R., Cappabianca, L., DeSantis, G., Di Ianni, N., Ruggeri, P., Ragone, M., Merolle, S., Tonissen, K.F., Gulino, A., and Mackay, A.R. (2011). Thioredoxin stimulates MMP-9 expression, de-regulates the MMP-9/TIMP-1 equilibrium and promotes MMP-9 dependent invasion in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *FEBS Lett.* *585*, 3328–3336.

Fata, J.E., Leco, K.J., Voura, E.B., Yu, H.Y., Waterhouse, P., Murphy, G., Moorehead, R.A., and Khokha, R. (2001). Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. *J. Clin. Invest.* *108*, 831–841.

Fingleton, B. (2008). MMPs as therapeutic targets—Still a viable option? *Semin. Cell Dev. Biol.* *19*, 61–68.

Fisher, J.F., and Mobashery, S. (2006). Recent advances in MMP inhibitor design. *Cancer Metastasis Rev.* 25, 115–136.

Fisher, C., Beglova, N., and Blacklow, S.C. (2006). Structure of an LDLR-RAP Complex Reveals a General Mode for Ligand Recognition by Lipoprotein Receptors. *Mol. Cell* 22, 277–283.

Van der Flier, A., Kuikman, I., Baudoin, C., van der Neut, R., and Sonnenberg, A. (1995). A novel beta 1 integrin isoform produced by alternative splicing: unique expression in cardiac and skeletal muscle. *FEBS Lett.* 369, 340–344.

Floquet, N., Marechal, J.-D., Badet-Denisot, M.-A., Robert, C.H., Dauchez, M., and Perahia, D. (2006). Normal mode analysis as a prerequisite for drug design: Application to matrix metalloproteinases inhibitors. *FEBS Lett.* 580, 5130–5136.

Forbes, C., Shi, Q., Fisher, J.F., Lee, M., Hesek, D., Llarrull, L.I., Toth, M., Gossing, M., Fridman, R., and Mobashery, S. (2009). Active site ring-opening of a thiirane moiety and picomolar inhibition of gelatinases. *Chem. Biol. Drug Des.* 74, 527–534.

Fowlkes, J.L., Enghild, J.J., Suzuki, K., and Nagase, H. (1994). Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* 269, 25742–25746.

Galko, M.J., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* 289, 1365–1367.

Gardner, J., and Ghorpade, A. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 74, 801–806.

Gasson, J.C., Golde, D.W., Kaufman, S.E., Westbrook, C.A., Hewick, R.M., Kaufman, R.J., Wong, G.G., Temple, P.A., Leary, A.C., and Brown, E.L. (1985). Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity. *Nature* 315, 768–771.

Gialeli, C., Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2011). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 278, 16–27.

Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G., and Quaranta, V. (1997). Induction of Cell Migration by Matrix Metalloprotease-2 Cleavage of Laminin-5. *Science* 277, 225–228.

Gijbels, K., Galardy, R.E., and Steinman, L. (1994). Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J. Clin. Invest.* 94, 2177–2182.

Ginsberg, M.H., Partridge, A., and Shattil, S.J. (2005). Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 509–516.

Gomis-Rüth, F.X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G.P., et al. (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389, 77–81.

- Gong, M., Meng, L., Jiang, B., Zhang, J., Yang, H., Wu, J., and Shou, C. (2008). p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. *Mol. Cancer Ther.* 7, 530–537.
- Gong, Y., Scott, E., Lu, R., Xu, Y., Oh, W.K., and Yu, Q. (2013). TIMP-1 Promotes Accumulation of Cancer Associated Fibroblasts and Cancer Progression. *PLoS ONE* 8, e77366.
- Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* 52, 189–196.
- Graesser, D., Mahooti, S., and Madri, J.A. (2000). Distinct roles for matrix metalloproteinase-2 and $\alpha 4$ integrin in autoimmune T cell extravasation and residency in brain parenchyma during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 109, 121–131.
- Grant, B.J., Rodrigues, A.P.C., ElSawy, K.M., McCammon, J.A., and Caves, L.S.D. (2006). Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* 22, 2695–2696.
- Grieve, A.G., and Rabouille, C. (2014). Extracellular cleavage of E-cadherin promotes epithelial cell extrusion. *J. Cell Sci.* 127, 3331–3346.
- Gross, J., and Lapiere, C.M. (1962). COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 1014–1022.
- Grossman, M., Tworowski, D., Dym, O., Lee, M.-H., Levy, Y., Murphy, G., and Sagi, I. (2010). The intrinsic protein flexibility of endogenous protease inhibitor TIMP-1 controls its binding interface and affects its function. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 6184–6192.
- Grunnet, M., Mau-Sørensen, M., and Brønner, N. (2013). Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) as a biomarker in gastric cancer: a review. *Scand. J. Gastroenterol.* 48, 899–905.
- Gu, Z., Cui, J., Brown, S., Fridman, R., Mobashery, S., Strongin, A.Y., and Lipton, S.A. (2005). A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 6401–6408.
- Guedez, L., Mansoor, A., Birkedal-Hansen, B., Lim, M.S., Fukushima, P., Venzon, D., Stetler-Stevenson, W.G., and Stetler-Stevenson, M. (2001). Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. *Blood* 97, 1796–1802.
- Guo, L.-J., Luo, X.-H., Su, X., Zhou, H.-D., and Liao, E.-Y. (2004). [Recombinant MMP-14 catalytic domain inducing the apoptosis of human osteoblastic SaOS-2 cells]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 29, 389–392.
- Gupta, S.P., and Patil, V.M. (2012). Specificity of binding with matrix metalloproteinases. *EXS* 103, 35–56.
- Guttman, M., Betts, G.N., Barnes, H., Ghassemian, M., van der Geer, P., and Komives, E.A. (2009). Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *Proteomics* 9, 5016–5028.

- Hamacher, S., Matern, S., and Roeb, E. (2004). [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 129, 1976–1980.
- Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J.C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.O., Werb, Z., Sudhakar, A., and Kalluri, R. (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV α 3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via α V β 3 integrin. *Cancer Cell* 3, 589–601.
- Han, Y.P., Tuan, T.L., Hughes, M., Wu, H., and Garner, W.L. (2001). Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J. Biol. Chem.* 276, 22341–22350.
- Hao, M., and Maxfield, F.R. (2000). Characterization of Rapid Membrane Internalization and Recycling. *J. Biol. Chem.* 275, 15279–15286.
- Hartland, S.N., Murphy, F., Aucott, R.L., Abergel, A., Zhou, X., Waung, J., Patel, N., Bradshaw, C., Collins, J., Mann, D., et al. (2009). Active matrix metalloproteinase-2 promotes apoptosis of hepatic stellate cells via the cleavage of cellular N-cadherin. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 29, 966–978.
- Hasty, K.A., Pourmotabbed, T.F., Goldberg, G.I., Thompson, J.P., Spinella, D.G., Stevens, R.M., and Mainardi, C.L. (1990). Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 265, 11421–11424.
- Hayami, T., Kapila, Y.L., and Kapila, S. (2011). Divergent upstream osteogenic events contribute to the differential modulation of MG63 cell osteoblast differentiation by MMP-1 (collagenase-1) and MMP-13 (collagenase-3). *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 30, 281–289.
- Hayward, S., and de Groot, B.L. (2008). *Normal Modes and Essential Dynamics.* (Humana Press),.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A.S., et al. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109, 625–637.
- Hekmat, O., Munk, S., Fogh, L., Yadav, R., Francavilla, C., Horn, H., Würtz, S.Ø., Schrohl, A.-S., Damsgaard, B., Rømer, M.U., et al. (2013). TIMP-1 Increases Expression and Phosphorylation of Proteins Associated with Drug Resistance in Breast Cancer Cells. *J. Proteome Res.* 12, 4136–4151.
- Herman, M.P., Sukhova, G.K., Kisiel, W., Foster, D., Kehry, M.R., Libby, P., and Schönbeck, U. (2001). Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 107, 1117–1126.
- Herz, J., and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* 108, 779–784.
- Hijova, E. (2005). Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl. Lekárske Listy* 106, 127–132.
- Holtén-Andersen, M., G Murphy, G., and Nielsen, H. (1999). Quantitation of TIMP-1 in plasma of healthy blood donors and patients with advanced cancer. *Br. J. Cancer* 80, 495–503.

- Hornebeck, W., Lambert, E., Petitfrère, E., and Bernard, P. (2005). Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* 87, 377–383.
- Hu, J., Van den Steen, P.E., Sang, Q.-X.A., and Opdenakker, G. (2007). Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 480–498.
- Huang, H.-C., and Jiang, Z.-F. (2009). Accumulated Amyloid- β Peptide and Hyperphosphorylated Tau Protein: Relationship and Links in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 16, 15–27.
- Huang, W., Suzuki, K., Nagase, H., Arumugam, S., Van Doren, S.R., and Brew, K. (1996). Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. *FEBS Lett.* 384, 155–161.
- Huang, W., Meng, Q., Suzuki, K., Nagase, H., and Brew, K. (1997). Mutational study of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) locates an inhibitory region for matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 272, 22086–22091.
- Huang, Y., Song, N., Ding, Y., Yuan, S., Li, X., Cai, H., Shi, H., and Luo, Y. (2009). Pulmonary vascular destabilization in the premetastatic phase facilitates lung metastasis. *Cancer Res.* 69, 7529–7537.
- Huttenlocher, A., and Horwitz, A.R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005074.
- Ikari, Y., Yee, K.O., and Schwartz, S.M. (2000). Role of $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins on smooth muscle cell spreading and migration in fibrin gels. *Thromb. Haemost.* 84, 701–705.
- Imai, K., A, H., D, F., M, P., and Y, O. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor- $\beta 1$ release.
- Isacke, C.M., and Yarwood, H. (2002). The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 718–721.
- Ito, A., Mukaiyama, A., Itoh, Y., Nagase, H., Thogersen, I.B., Enghild, J.J., Sasaguri, Y., and Mori, Y. (1996). Degradation of interleukin 1 β by matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 271, 14657–14660.
- Itoh, Y. (2015). Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol.* 44–46, 207–223.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., and Itohara, S. (1998a). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 58, 1048–1051.
- Itoh, Y., Ito, A., Iwata, K., Tanzawa, K., Mori, Y., and Nagase, H. (1998b). Plasma Membrane-bound Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-2 Specifically Inhibits Matrix Metalloproteinase 2 (Gelatinase A) Activated on the Cell Surface. *J. Biol. Chem.* 273, 24360–24367.
- Iyer, S., Wei, S., Brew, K., and Acharya, K.R. (2007). Crystal structure of the catalytic domain of matrix metalloproteinase-1 in complex with the inhibitory domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J. Biol. Chem.* 282, 364–371.

- Jaworski, D.M., Beem-Miller, M., Lluri, G., and Barrantes-Reynolds, R. (2007). Potential regulatory relationship between the nested gene DDC8 and its host gene tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *Physiol. Genomics* 28, 168–178.
- Jia, F., Yin, Y.H., Gao, G.Y., Wang, Y., Cen, L., and Jiang, J.-Y. (2014). MMP-9 inhibitor SB-3CT attenuates behavioral impairments and hippocampal loss after traumatic brain injury in rat. *J. Neurotrauma* 31, 1225–1234.
- Jiang, X., Dias, J.A., and He, X. (2014). Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 424–451.
- Johansson, N., Ala-aho R., Uitto, V., Grénman, R., Fusenig, N.E., López-Otín, C., and Kähäri, V.M. (2000). Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Sci.* 113 Pt 2, 227–235.
- Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 25, 3934–3942.
- Jung, Y.S., Liu, X.-W., Chirco, R., Warner, R.B., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2012). TIMP-1 Induces an EMT-Like Phenotypic Conversion in MDCK Cells Independent of Its MMP-Inhibitory Domain. *PLoS ONE* 7, e38773.
- Kadri, Z., Petitfrère, E., Boudot, C., Freyssonier, J.M., Fichelson, S., Mayeux, P., Emonard, H., Hornebeck, W., Haye, B., and Billat, C. (2000). Erythropoietin induction of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 expression and secretion is mediated by mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 573–580.
- Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., and Seiki, M. (2001). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J. Cell Biol.* 153, 893–904.
- Kakkar, T., Boxenbaum, H., and Mayersohn, M. (1999). Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: comparisons among three methods of data analysis. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 27, 756–762.
- Kalil, K. (1996). Growth cone behaviors during axon guidance in the developing cerebral cortex. In *Progress in Brain Research*, R.R.M. and R.S. Erzurumlu, ed. (Elsevier), pp. 31–40.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438, 820–827.
- Karplus, M., and McCammon, J.A. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 9, 646–652.
- Kazantseva, M.G., Hung, N.A., Highton, J., and Hessian, P.A. (2013). MMP expression in rheumatoid inflammation: the rs11568818 polymorphism is associated with MMP-7 expression at an extra-articular site. *Genes Immun.* 14, 162–169.

- Kelly, S.M., Jess, T.J., and Price, N.C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* 1751, 119–139.
- Kerrigan, J.J., Mansell, J.P., and Sandy, J.R. (2000). Matrix Turnover. *J. Orthod.* 27, 227–233.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* 141, 52–67.
- Kim, Y.-S., and Joh, T.H. (2012). Matrix metalloproteinases, new insights into the understanding of neurodegenerative disorders. *Biomol. Ther.* 20, 133–143.
- Kim, Y.-S., Kim, S.-H., Kang, J.-G., and Ko, J.-H. (2012). Expression level and glycan dynamics determine the net effects of TIMP-1 on cancer progression. *BMB Rep.* 45, 623–628.
- Knäuper, V., Docherty, A.J.P., Smith, B., Tschesche, H., and Murphy, G. (1997). Analysis of the contribution of the hinge region of human neutrophil collagenase (HNC, MMP-8) to stability and collagenolytic activity by alanine scanning mutagenesis. *FEBS Lett.* 405, 60–64.
- Kojima, S., Itoh, Y., Matsumoto, S., Masuho, Y., and Seiki, M. (2000). Membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MT6-MMP, MMP-25) is the second glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI)-anchored MMP. *FEBS Lett.* 480, 142–146.
- Kordula, T., Güttgemann, I., Rose-John, S., Roeb, E., Osthues, A., Tschesche, H., Koj, A., Heinrich, P.C., and Graeve, L. (1992). Synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human hepatoma cells (HepG2) Up-regulation by interleukin-6 and transforming growth factor β 1. *FEBS Lett.* 313, 143–147.
- Koskivirta, I., Kassiri, Z., Rahkonen, O., Kiviranta, R., Oudit, G.Y., McKee, T.D., Kyto, V., Saraste, A., Jokinen, E., Liu, P.P., et al. (2010). Mice with Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 4 (Timp4) Deletion Succumb to Induced Myocardial Infarction but Not to Cardiac Pressure Overload. *J. Biol. Chem.* 285, 24487–24493.
- Kouwenhoven, M., Ozenci, V., Gomes, A., Yarilin, D., Giedraitis, V., Press, R., and Link, H. (2001). Multiple sclerosis: elevated expression of matrix metalloproteinases in blood monocytes. *J. Autoimmun.* 16, 463–470.
- Kuvaja, P., Würtz, S.Ø., Talvensaaari-Mattila, A., Brünner, N., Pääkkö, P., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2007). High serum TIMP-1 correlates with poor prognosis in breast carcinoma - a validation study. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* 3, 293–300.
- Lafleur, M.A., Mercuri, F.A., Ruangpanit, N., Seiki, M., Sato, H., and Thompson, E.W. (2006). Type I Collagen Abrogates the Clathrin-mediated Internalization of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) via the MT1-MMP Hemopexin Domain. *J. Biol. Chem.* 281, 6826–6840.
- Lambert, E., Boudot, C., Kadri, Z., Soula-Rothhut, M., Sowa, M.-L., Mayeux, P., Hornebeck, W., Haye, B., and Petitfrere, E. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem. J.* 372, 767–774.
- Lambert, E., Dassé, E., Haye, B., and Petitfrère, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49, 187–198.

- Lambert, E., Bridoux, L., Devy, J., Dassé, E., Sowa, M.-L., Duca, L., Hornebeck, W., Martiny, L., and Petitfrère-Charpentier, E. (2009). TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1102–1115.
- Lang, R., Braun, M., Sounni, N.E., Noel, A., Frankenne, F., Foidart, J.-M., Bode, W., and Maskos, K. (2004). Crystal Structure of the Catalytic Domain of MMP-16/MT3-MMP: Characterization of MT-MMP Specific Features. *J. Mol. Biol.* *336*, 213–225.
- Languino, L.R., and Ruoslahti, E. (1992). An alternative form of the integrin beta 1 subunit with a variant cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* *267*, 7116–7120.
- Lee, M.A., Palace, J., Stabler, G., Ford, J., Gearing, A., and Miller, K. (1999). Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain J. Neurol.* *122 (Pt 2)*, 191–197.
- Lee, M.-H., Rapti, M., and Murphy, G. (2003). Unveiling the surface epitopes that render tissue inhibitor of metalloproteinase-1 inactive against membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* *278*, 40224–40230.
- Lee, M.-H., Rapti, M., Knaüper, V., and Murphy, G. (2004). Threonine 98, the Pivotal Residue of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)-1 in Metalloproteinase Recognition. *J. Biol. Chem.* *279*, 17562–17569.
- Lee, S.Y., Kim, J.M., Cho, S.Y., Kim, H.S., Shin, H.S., Jeon, J.Y., Kausar, R., Jeong, S.Y., Lee, Y.S., and Lee, M.A. (2014). TIMP-1 modulates chemotaxis of human neural stem cells through CD63 and integrin signalling. *Biochem. J.* *459*, 565–576.
- Lehti, K., Lohi, J., Juntunen, M.M., Pei, D., and Keski-Oja, J. (2002). Oligomerization through Hemopexin and Cytoplasmic Domains Regulates the Activity and Turnover of Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 8440–8448.
- Levy, S., and Shoham, T. (2005). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiol. Bethesda Md* *20*, 218–224.
- Li, G., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (1999). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Inhibits Apoptosis of Human Breast Epithelial Cells. *Cancer Res.* *59*, 6267–6275.
- Li, Y., Marzolo, M.P., Kerkhof, P. van, Strous, G.J., and Bu, G. (2000). The YXXL Motif, but Not the Two NPXY Motifs, Serves as the Dominant Endocytosis Signal for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J. Biol. Chem.* *275*, 17187–17194.
- Liao, M.-C., and Van Nostrand, W.E. (2010). Degradation of Soluble and Fibrillar Amyloid β -Protein by Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) in Vitro. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 1127–1136.
- Lie, D.-C., Colamarino, S.A., Song, H.-J., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E.S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A.R., et al. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* *437*, 1370–1375.

- Lijnen, H.R., Uguw, F., Bini, A., and Collen, D. (1998). Generation of an Angiostatin-like Fragment from Plasminogen by Stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry (Mosc.)* 37, 4699–4702.
- Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E., and Strickland, D.K. (2008). LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. *Physiol. Rev.* 88, 887–918.
- Lin, S., Saxena, N.K., Ding, X., Stein, L.L., and Anania, F.A. (2006). Leptin Increases Tissue Inhibitor of Metalloproteinase I (TIMP-1) Gene Expression by a Specificity Protein 1/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Mechanism. *Mol. Endocrinol.* 20, 3376–3388.
- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C.M., and Shafie, S. (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284, 67–68.
- Liu, X.-W., Bernardo, M.M., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2003). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 40364–40372.
- Liu, X.-W., Taube, M.E., Jung, K.-K., Dong, Z., Lee, Y.J., Roshy, S., Sloane, B.F., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells from extrinsic cell death: a potential oncogenic activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Cancer Res.* 65, 898–906.
- Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., and Bissell, M.J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J. Cell Biol.* 139, 1861–1872.
- Lohi, J., Lehti, K., Valtanen, H., Parks, W.C., and Keski-Oja, J. (2000). Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene. *Gene* 242, 75–86.
- Lorenzl, S., Albers, D.S., Narr, S., Chirichigno, J., and Beal, M.F. (2002). Expression of MMP-2, MMP-9, and MMP-1 and their endogenous counterregulators TIMP-1 and TIMP-2 in postmortem brain tissue of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 178, 13–20.
- Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M.M., Loukinov, D., Ulery, P.G., Mikhailenko, I., Lawrence, D.A., and Strickland, D.K. (2002). Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) EVIDENCE FOR INTEGRATED CO-RECEPTOR FUNCTION BETWEEN LRP AND THE PDGF. *J. Biol. Chem.* 277, 15499–15506.
- Lu, C., Li, X.-Y., Hu, Y., Rowe, R.G., and Weiss, S.J. (2010). MT1-MMP controls human mesenchymal stem cell trafficking and differentiation. *Blood* 115, 221–229.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2011). Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005058.

- Ma, J., Wang, J., Fan, W., Pu, X., Zhang, D., Fan, C., Xiong, L., Zhu, H., Xu, N., Chen, R., et al. (2014). Upregulated TIMP-1 correlates with poor prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *7*, 246–254.
- Maeshima, Y., Yerramalla, U.L., Dhanabal, M., Holthaus, K.A., Barbashov, S., Kharbanda, S., Reimer, C., Manfredi, M., Dickerson, W.M., and Kalluri, R. (2001). Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis. *J. Biol. Chem.* *276*, 31959–31968.
- Malcor, J.-D., Payrot, N., David, M., Faucon, A., Abouzid, K., Jacquot, G., Floquet, N., Debarbieux, F., Rougon, G., Martinez, J., et al. (2012). Chemical optimization of new ligands of the low-density lipoprotein receptor as potential vectors for central nervous system targeting. *J. Med. Chem.* *55*, 2227–2241.
- Manicourt, D.-H., Fujimoto, N., Obata, K., and Thonar, E.J.-M.A. (1994). Serum levels of collagenase, stromelysin-1, and timp-1. *Arthritis Rheum.* *37*, 1774–1783.
- Mannello, F., Luchetti, F., Falcieri, E., and Papa, S. (2005). Multiple roles of matrix metalloproteinases during. *Apoptosis* *10*, 19–24.
- Maquoi, E., Assent, D., Detilleux, J., Pequeux, C., Foidart, J.-M., and Noël, A. (2012). MT1-MMP protects breast carcinoma cells against type I collagen-induced apoptosis. *Oncogene* *31*, 480–493.
- Martino, G., Adorini, L., Rieckmann, P., Hillert, J., Kallmann, B., Comi, G., and Filippi, M. (2002). Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol.* *1*, 499–509.
- Massagué, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* *134*, 215–230.
- Masson, V., Ballina, L.R. de la, Munaut, C., Wielockx, B., Jost, M., Maillard, C., Blacher, S., Bajou, K., Itoh, T., Itohar, S., et al. (2005). Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.* *19*, 234–236.
- Matsuno, H., Yudoh, K., Watanabe, Y., Nakazawa, F., Aono, H., and Kimura, T. (2001). Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand. *J. Rheumatol.* *28*, 22–28.
- May, P., Rohlmann, A., Bock, H.H., Zurhove, K., Marth, J.D., Schomburg, E.D., Noebels, J.L., Beffert, U., Sweatt, J.D., Weeber, E.J., et al. (2004). Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8872–8883.
- McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A., Clark-Lewis, I., and Overall, C.M. (2000). Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* *289*, 1202–1206.
- Mecham, R.P. (2012). Overview of extracellular matrix. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Editor. Board Juan Bonifacino *AI Chapter 10*, Unit 10.1.
- Meng, Q., Malinovskii, V., Huang, W., Hu, Y., Chung, L., Nagase, H., Bode, W., Maskos, K., and Brew, K. (1999). Residue 2 of TIMP-1 is a major determinant of affinity and specificity for matrix metalloproteinases but effects of substitutions do not correlate with those of the corresponding P1' residue of substrate. *J. Biol. Chem.* *274*, 10184–10189.

- Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., and Clevers, H.C. (1991). CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* *266*, 3239–3245.
- Min, B.S., Kim, N.K., Jeong, H.C., and Chung, H.C. (2012). High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncol. Lett.* *4*, 123–130.
- Mishra, S.K., Hawryluk, M.J., Brett, T.J., Keyel, P.A., Dupin, A.L., Jha, A., Heuser, J.E., Fremont, D.H., and Traub, L.M. (2004). Dual Engagement Regulation of Protein Interactions with the AP-2 Adaptor α Appendage. *J. Biol. Chem.* *279*, 46191–46203.
- Mitsiades, N., Yu, W., Poulaki, V., Tsokos, M., and Stamenkovic, I. (2001). Matrix Metalloproteinase-7-mediated Cleavage of Fas Ligand Protects Tumor Cells from Chemotherapeutic Drug Cytotoxicity. *Cancer Res.* *61*, 577–581.
- Mittag, T., Kay, L.E., and Forman-Kay, J.D. (2010). Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition. *J. Mol. Recognit. JMR* *23*, 105–116.
- Mohammed, F.F., Smookler, D.S., Taylor, S.E.M., Fingleton, B., Kassiri, Z., Sanchez, O.H., English, J.L., Matrisian, L.M., Au, B., Yeh, W.-C., et al. (2004). Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat. Genet.* *36*, 969–977.
- Moore, C.S., Milner, R., Nishiyama, A., Frausto, R.F., Serwanski, D.R., Pagarigan, R.R., Whitton, J.L., Miller, R.H., and Crocker, S.J. (2011). Astrocytic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) promotes oligodendrocyte differentiation and enhances CNS myelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 6247–6254.
- Morrison, C.J., and Overall, C.M. (2006). TIMP Independence of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 Activation by Membrane Type 2 (MT2)-MMP Is Determined by Contributions of Both the MT2-MMP Catalytic and Hemopexin C Domains. *J. Biol. Chem.* *281*, 26528–26539.
- Motrescu, E.R., Blaise, S., Etique, N., Messaddeq, N., Chenard, M.-P., Stoll, I., Tomasetto, C., and Rio, M.-C. (2008). Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* *27*, 6347–6355.
- Mott, J.D., Thomas, C.L., Rosenbach, M.T., Takahara, K., Greenspan, D.S., and Banda, M.J. (2000). Post-translational Proteolytic Processing of Procollagen C-terminal Proteinase Enhancer Releases a Metalloproteinase Inhibitor. *J. Biol. Chem.* *275*, 1384–1390.
- Mroczo, B., Groblewska, M., and Barcikowska, M. (2013). The role of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the pathophysiology of neurodegeneration: a literature study. *J. Alzheimers Dis. JAD* *37*, 273–283.
- Mroczo, B., Groblewska, M., Zboch, M., Kulczyńska, A., Koper, O.M., Szmitkowski, M., Kornhuber, J., and Lewczuk, P. (2014). Concentrations of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *40*, 351–357.

- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Broaddus, V.C., and Nishimura, S.L. (2002). The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J. Cell Biol.* *157*, 493–507.
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* *12*, 233.
- Murphy, F.R., Issa, R., Zhou, X., Ratnarajah, S., Nagase, H., Arthur, M.J.P., Benyon, C., and Iredale, J.P. (2002). Inhibition of Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells by Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Is Mediated via Effects on Matrix Metalloproteinase Inhibition IMPLICATIONS FOR REVERSIBILITY OF LIVER FIBROSIS. *J. Biol. Chem.* *277*, 11069–11076.
- Murphy, G., Koklitis, P., and Carne, A.F. (1989). Dissociation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) from enzyme complexes yields fully active inhibitor. *Biochem. J.* *261*, 1031–1034.
- Murphy, G., Cockett, M.I., Ward, R.V., and Docherty, A.J. (1991a). Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem. J.* *277 (Pt 1)*, 277–279.
- Murphy, G., Houbrechts, A., Cockett, M.I., Williamson, R.A., O’Shea, M., and Docherty, A.J. (1991b). The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 8097–8102.
- Murphy, G., Nguyen, Q., Cockett, M.I., Atkinson, S.J., Allan, J.A., Knight, C.G., Willenbrock, F., and Docherty, A.J. (1994). Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J. Biol. Chem.* *269*, 6632–6636.
- Murzin, A.G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* *12*, 861–867.
- Nagase, H., and Brew, K. (2002). Engineering of tissue inhibitor of metalloproteinases mutants as potential therapeutics. *Arthritis Res.* *4 Suppl 3*, S51–S61.
- Nagase, H., Suzuki, K., Cawston, T.E., and Brew, K. (1997). Involvement of a region near valine-69 of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in the interaction with matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1). *Biochem. J.* *325 (Pt 1)*, 163–167.
- Nagase, H., Meng, Q., Malinovskii, V., Huang, W., Chung, L., Bode, W., Maskos, K., and Brew, K. (1999). Engineering of selective TIMPs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *878*, 1–11.
- Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* *69*, 562–573.
- Naor, D., Wallach-Dayana, S.B., Zahalka, M.A., and Sionov, R.V. (2008). Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin. Cancer Biol.* *18*, 260–267.
- Neels, J.G., Berg, B.M.M. van den, Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H., and Zonneveld, A.-J. van (1999). The Second and Fourth Cluster of Class A Cysteine-rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Share Ligand-binding Properties. *J. Biol. Chem.* *274*, 31305–31311.

- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in Cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* 2, 213–219.
- Nübling, G., Levin, J., Bader, B., Israel, L., Bötzel, K., Lorenzl, S., and Giese, A. (2012). Limited cleavage of tau with matrix-metalloproteinase MMP-9, but not MMP-3, enhances tau oligomer formation. *Exp. Neurol.* 237, 470–476.
- Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R.M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D.B., et al. (2001). The Membrane-Anchored MMP Inhibitor RECK Is a Key Regulator of Extracellular Matrix Integrity and Angiogenesis. *Cell* 107, 789–800.
- Olson, M.W., Gervasi, D.C., Mobashery, S., and Fridman, R. (1997). Kinetic Analysis of the Binding of Human Matrix Metalloproteinase-2 and -9 to Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J. Biol. Chem.* 272, 29975–29983.
- Ortiz, G.G., Pacheco-Moisés, F.P., Macías-Islas, M.Á., Flores-Alvarado, L.J., Mireles-Ramírez, M.A., González-Renovato, E.D., Hernández-Navarro, V.E., Sánchez-López, A.L., and Alatorre-Jiménez, M.A. (2014). Role of the Blood-Brain Barrier in Multiple Sclerosis. *Arch. Med. Res.*
- Ould-yahoui, A., Tremblay, E., Sbai, O., Ferhat, L., Bernard, A., Charrat, E., Gueye, Y., Lim, N.H., Brew, K., Risso, J.-J., et al. (2009a). A New Role for TIMP-1 in Modulating Neurite Outgrowth and Morphology of Cortical Neurons. *PLoS ONE* 4.
- Ould-yahoui, A., Tremblay, E., Sbai, O., Ferhat, L., Bernard, A., Charrat, E., Gueye, Y., Lim, N.H., Brew, K., Risso, J.-J., et al. (2009b). A new role for TIMP-1 in modulating neurite outgrowth and morphology of cortical neurons. *PloS One* 4, e8289.
- Overall, C.M. (2001). Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules and exosites. Overview and experimental strategies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 151, 79–120.
- Pagenstecher, A., Stalder, A.K., Kincaid, C.L., Shapiro, S.D., and Campbell, I.L. (1998). Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am. J. Pathol.* 152, 729–741.
- Parton, R.G., and Howes, M.T. (2010). Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome. *J. Cell Biol.* 191, 439–441.
- Patterson, B.C., and Sang, Q.A. (1997). Angiostatin-converting Enzyme Activities of Human Matrilysin (MMP-7) and Gelatinase B/Type IV Collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* 272, 28823–28825.
- Patterson, M.L., Atkinson, S.J., Knäuper, V., and Murphy, G. (2001). Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* 503, 158–162.
- Pei, D. (1999). CA-MMP: a matrix metalloproteinase with a novel cysteine array, but without the classic cysteine switch. *FEBS Lett.* 457, 262–270.
- Pei, D., and Weiss, S.J. (1995). Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375, 244–247.

- Pei, D., Kang, T., and Qi, H. (2000). Cysteine Array Matrix Metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 Is a Type II Transmembrane Matrix Metalloproteinase Regulated by a Single Cleavage for Both Secretion and Activation. *J. Biol. Chem.* *275*, 33988–33997.
- Perron, J.C., and Bixby, J.L. (1999). Distinct Neurite Outgrowth Signaling Pathways Converge on ERK Activation. *Mol. Cell. Neurosci.* *13*, 362–378.
- Perrot, G., Langlois, B., Devy, J., Jeanne, A., Verzeaux, L., Almagro, S., Sartelet, H., Hachet, C., Schneider, C., Sick, E., et al. (2012). LRP-1--CD44, a new cell surface complex regulating tumor cell adhesion. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 3293–3307.
- Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kalé, L., and Schulten, K. (2005). Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* *26*, 1781–1802.
- Pilcher, B.K., Dumin, J.A., Sudbeck, B.D., Krane, S.M., Welgus, H.G., and Parks, W.C. (1997). The Activity of Collagenase-1 Is Required for Keratinocyte Migration on a Type I Collagen Matrix. *J. Cell Biol.* *137*, 1445–1457.
- Piperi, C., and Papavassiliou, A.G. (2012). Molecular mechanisms regulating matrix metalloproteinases. *Curr. Top. Med. Chem.* *12*, 1095–1112.
- Pohar, N., Godenschwege, T.A., and Buchner, E. (1999). Invertebrate tissue inhibitor of metalloproteinase: structure and nested gene organization within the synapsin locus is conserved from *Drosophila* to human. *Genomics* *57*, 293–296.
- Pols, M.S., and Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp. Cell Res.* *315*, 1584–1592.
- Porter, J.F., Shen, S., and Denhardt, D.T. (2004). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 stimulates proliferation of human cancer cells by inhibiting a metalloproteinase. *Br. J. Cancer* *90*, 463–470.
- Py, N.A., Bonnet, A.E., Bernard, A., Marchalant, Y., Charrat, E., Checler, F., Khrestchatisky, M., Baranger, K., and Rivera, S. (2014). Differential spatio-temporal regulation of MMPs in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: evidence for a pro-amyloidogenic role of MT1-MMP. *Front. Aging Neurosci.* *6*.
- Radisky, E.S., and Radisky, D.C. (2010). Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* *15*, 201–212.
- Rao, B.G. (2005). Recent developments in the design of specific Matrix Metalloproteinase inhibitors aided by structural and computational studies. *Curr. Pharm. Des.* *11*, 295–322.
- Rapti, M., Atkinson, S.J., Lee, M.-H., Trim, A., Moss, M., and Murphy, G. (2008). The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem. J.* *411*, 433–439.
- Ratnikov, B.I., Rozanov, D.V., Postnova, T.I., Baciú, P.G., Zhang, H., DiScipio, R.G., Chestukhina, G.G., Smith, J.W., Deryugina, E.I., and Strongin, A.Y. (2002). An alternative processing of integrin alpha(v) subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 7377–7385.

- Raza, S.L., Nehring, L.C., Shapiro, S.D., and Cornelius, L.A. (2000). Proteinase-activated Receptor-1 Regulation of Macrophage Elastase (MMP-12) Secretion by Serine Proteinases. *J. Biol. Chem.* *275*, 41243–41250.
- Redondo-Muñoz, J., Ugarte-Berzal, E., García-Marco, J.A., del Cerro, M.H., Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Terol, M.J., and García-Pardo, A. (2008). Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* *112*, 169–178.
- Ree, A.H., Florenes, V.A., Berg, J.P., Maelandsmo, G.M., Nesland, J.M., and Fodstad, O. (1997). High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *3*, 1623–1628.
- Remacle, A.G., Rozanov, D.V., Fugere, M., Day, R., and Strongin, A.Y. (2006). Furin regulates the intracellular activation and the uptake rate of cell surface-associated MT1-MMP. *Oncogene* *25*, 5648–5655.
- Remacle, A.G., Shiryayev, S.A., Radichev, I.A., Rozanov, D.V., Stec, B., and Strongin, A.Y. (2011). Dynamic interdomain interactions contribute to the inhibition of matrix metalloproteinases by tissue inhibitors of metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* *286*, 21002–21012.
- Reuter, N., Hinsén, K., and Lacapère, J.-J. (2003). Transconformations of the SERCA1 Ca-ATPase: A Normal Mode Study. *Biophys. J.* *85*, 2186–2197.
- Ricard-Blum, S., and Salza, R. (2014). Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp. Dermatol.* *23*, 457–463.
- Ridnour, L.A., Dhanapal, S., Hoos, M., Wilson, J., Lee, J., Cheng, R.Y.S., Brueggemann, E.E., Hines, H.B., Wilcock, D.M., Vitek, M.P., et al. (2012). Nitric oxide-mediated regulation of β -amyloid clearance via alterations of MMP-9/TIMP-1. *J. Neurochem.* *123*, 736–749.
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 659–672.
- Rivera, S., Tremblay, E., Timsit, S., Canals, O., Ben-Ari, Y., and Khrestchatsky, M. (1997). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) Is Differentially Induced in Neurons and Astrocytes after Seizures: Evidence for Developmental, Immediate Early Gene, and Lesion Response. *J. Neurosci.* *17*, 4223–4235.
- Rivera, S., Jourquin, J., Ogier, C., Bernard, A., Charton, G., Tremblay, É., and Khrestchatsky, M. (2004). Le système MMP/TIMP dans le système nerveux. *Médecine/sciences* *20*, 55–60.
- Robinet, A., Fahem, A., Cauchard, J.-H., Huet, E., Vincent, L., Lorimier, S., Antonicelli, F., Soria, C., Crepin, M., Hornebeck, W., et al. (2005). Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J. Cell Sci.* *118*, 343–356.
- Roderfeld, M., Graf, J., Giese, B., Salguero-Palacios, R., Tschuschner, A., Müller-Newen, G., and Roeb, E. (2007). Latent MMP-9 is bound to TIMP-1 before secretion. *Biol. Chem.* *388*, 1227–1234.

- Roeb, E., Graeve, L., Müllberg, J., Matern, S., and Rose-John, S. (1994). TIMP-1 protein expression is stimulated by IL-1 β and IL-6 in primary rat hepatocytes. *FEBS Lett.* *349*, 45–49.
- Rothenberg, M.L., Nelson, A.R., and Hande, K.R. (1999). New Drugs on the Horizon: Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *STEM CELLS* *17*, 237–240.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *12*, 697–715.
- Rydziel, S., Varghese, S., and Canalis, E. (1997). Transforming growth factor beta1 inhibits collagenase 3 expression by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in osteoblast cultures. *J. Cell. Physiol.* *170*, 145–152.
- Saido, T., and Leissring, M.A. (2012). Proteolytic Degradation of Amyloid β -Protein. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*.
- Samii, A., Nutt, J.G., and Ransom, B.R. (2004). Parkinson's disease. *The Lancet* *363*, 1783–1793.
- Sandberg, H., Lütkemeyer, D., Kuprin, S., Wrangel, M., Almstedt, A., Persson, P., Ek, V., and Mikaelsson, M. (2006). Mapping and partial characterization of proteases expressed by a CHO production cell line. *Biotechnol. Bioeng.* *95*, 961–971.
- Sato, T., Ito, A., and Mori, Y. (1990). Interleukin 6 enhances the production of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) but not that of matrix metalloproteinases by human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *170*, 824–829.
- Sato, T., Foged, N.T., and Delaissé, J.-M. (1998). The Migration of Purified Osteoclasts Through Collagen Is Inhibited by Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *J. Bone Miner. Res.* *13*, 59–66.
- Schrohl, A.-S., Meijer-van Gelder, M.E., Holten-Andersen, M.N., Christensen, I.J., Look, M.P., Mouridsen, H.T., Brünnner, N., and Foekens, J.A. (2006). Primary tumor levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are predictive of resistance to chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *12*, 7054–7058.
- Scilabra, S.D., Troeberg, L., Yamamoto, K., Emonard, H., Thøgersen, I., Enghild, J.J., Strickland, D.K., and Nagase, H. (2013). Differential regulation of extracellular tissue inhibitor of metalloproteinases-3 levels by cell membrane-bound and shed low density lipoprotein receptor-related protein 1. *J. Biol. Chem.* *288*, 332–342.
- Seiki, M. (2002). The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 624–632.
- Sestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., and Rakic, P. (1999). Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. *Science* *286*, 741–746.
- Seubert, B., Grünwald, B., Kobuch, J., Cui, H., Schelter, F., Schaten, S., Siveke, J.T., Lim, N.H., Nagase, H., Simonavicius, N., et al. (2014). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatol. Baltim. Md.*

- Sever, S., Chang, J., and Gu, C. (2013). Dynamin Rings: Not Just for Fission. *Traffic* 14, 1194–1199.
- Shibue, T., and Weinberg, R.A. (2009). Integrin β 1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 10290–10295.
- Shibley, J.M., Doyle, G.A.R., Fliszar, C.J., Ye, Q.-Z., Johnson, L.L., Shapiro, S.D., Welgus, H.G., and Senior, R.M. (1996). The Structural Basis for the Elastolytic Activity of the 92-kDa and 72-kDa Gelatinases ROLE OF THE FIBRONECTIN TYPE II-LIKE REPEATS. *J. Biol. Chem.* 271, 4335–4341.
- Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., Polo, S., Scita, G., and Fiore, P.P.D. (2012). Endocytosis and Signaling: Cell Logistics Shape the Eukaryotic Cell Plan. *Physiol. Rev.* 92, 273–366.
- Si-Tayeb, K., Monvoisin, A., Mazzocco, C., Lepreux, S., Decossas, M., Cubel, G., Taras, D., Blanc, J.-F., Robinson, D.R., and Rosenbaum, J. (2006). Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am. J. Pathol.* 169, 1390–1401.
- Skjaerven, L., Hollup, S.M., and Reuter, N. (2009). Normal mode analysis for proteins. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 898, 42–48.
- Smiljanic, K., Obradovic, M., Jovanovic, A., Djordjevic, J., Dobutovic, B., Jevremovic, D., Marche, P., and Isenovic, E.R. (2014). Thrombin stimulates VSMC proliferation through an EGFR-dependent pathway: involvement of MMP-2. *Mol. Cell. Biochem.* 396, 147–160.
- Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., Brenz, R., McGrath, C.M., Russo, J., Pauley, R.J., Jones, R.F., and Brooks, S.C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res.* 50, 6075–6086.
- Srichai, M.B., and Zent, R. (2010). Integrin Structure and Function. In *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, R. Zent, and A. Pozzi, eds. (Springer New York), pp. 19–41.
- Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., and Opdenakker, G. (2002). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 37, 375–536.
- Van den Steen, P.E., Van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S.K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M.R., et al. (2006). The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J. Biol. Chem.* 281, 18626–18637.
- Steinman, D.H., Curtin, M.L., Garland, R.B., Davidsen, S.K., Heyman, H.R., Holms, J.H., Albert, D.H., Magoc, T.J., Nagy, I.B., Marcotte, P.A., et al. (1998). The design, synthesis, and structure-activity relationships of a series of macrocyclic MMP inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 2087–2092.
- Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001a). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463–516.
- Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001b). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463–516.

- Stetler-Stevenson, W.G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Invest.* *103*, 1237–1241.
- Stetler-Stevenson, W.G. (2008). Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Cell Signaling: Metalloproteinase-Independent Biological Activities. *Sci. Signal.* *1*, re6–re6.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 106–112.
- St. John, T., Meyer, J., Idzerda, R., and Gallatin, W.M. (1990). Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells. *Cell* *60*, 45–52.
- Storey, and Cappai (1999). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the A β peptide. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *25*, 81–97.
- St-Pierre, Y., Couillard, J., and Van Themsche, C. (2004). Regulation of MMP-9 gene expression for the development of novel molecular targets against cancer and inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* *8*, 473–489.
- Sung, J.Y., Park, S.M., Lee, C.-H., Um, J.W., Lee, H.J., Kim, J., Oh, Y.J., Lee, S.-T., Paik, S.R., and Chung, K.C. (2005). Proteolytic Cleavage of Extracellular Secreted α -Synuclein via Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* *280*, 25216–25224.
- Szymocha, R., Akaoka, H., Brisson, C., Beurton-Marduel, P., Chalon, A., Bernard, A., Didier-Bazes, M., Belin, M.F., and Giraudon, P. (2000). Astrocytic Alterations Induced by HTLV Type 1-Infected T Lymphocytes: A Role for Tax-1 and Tumor Necrosis Factor α . *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *16*, 1723–1729.
- Taherian, A., Li, X., Liu, Y., and Haas, T.A. (2011). Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer* *11*, 293.
- Takino, T., Miyamori, H., Kawaguchi, N., Uekita, T., Seiki, M., and Sato, H. (2003). Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *304*, 160–166.
- Tanjore, H., Zeisberg, E.M., Gerami-Naini, B., and Kalluri, R. (2008). Beta1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 75–82.
- Taube, M.E., Liu, X.-W., Fridman, R., and Kim, H.-R.C. (2006). TIMP-1 regulation of cell cycle in human breast epithelial cells via stabilization of p27(KIP1) protein. *Oncogene* *25*, 3041–3048.
- Teoh, C.M., Tam, J.K.C., and Tran, T. (2012). Integrin and GPCR Crosstalk in the Regulation of ASM Contraction Signaling in Asthma. *J. Allergy* *2012*, 1–9.
- Terpos, E., Dimopoulos, M.A., Shrivastava, V., Leitzel, K., Christoulas, D., Migkou, M., Gavriatopoulou, M., Anargyrou, K., Hamer, P., Kastiris, E., et al. (2010). High levels of serum TIMP-1 correlate with advanced disease and predict for poor survival in patients with multiple myeloma treated with novel agents. *Leuk. Res.* *34*, 399–402.

Thevenard, J., Verzeaux, L., Devy, J., Etique, N., Jeanne, A., Schneider, C., Hachet, C., Ferracci, G., David, M., Martiny, L., et al. (2014). Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Mediates Endocytic Clearance of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 and Promotes Its Cytokine-Like Activities. *PLoS ONE* 9.

Toole, B.P. (2003). Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Academic Press), pp. 371–389.

Toricelli, M., Melo, F.H.M., Peres, G.B., Silva, D.C.P., and Jasiulionis, M.G. (2013). Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Mol. Cancer* 12, 22.

Trim, J.E., Samra, S.K., Arthur, M.J.P., Wright, M.C., McAulay, M., Beri, R., and Mann, D.A. (2000). Upstream Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) Element-1, a Novel and Essential Regulatory DNA Motif in the Human TIMP-1 Gene Promoter, Directly Interacts with a 30-kDa Nuclear Protein. *J. Biol. Chem.* 275, 6657–6663.

Troyanovsky, B., Levchenko, T., Månsson, G., Matvijenko, O., and Holmgren, L. (2001). Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J. Cell Biol.* 152, 1247–1254.

Ukaji, T., SASAZAWA, Y., UMEZAWA, K., and SIMIZU, S. (2014). Involvement of conserved tryptophan residues for secretion of TIMP-2. *Oncol. Lett.* 7, 631–634.

Vandenbroucke, R.E., and Libert, C. (2014). Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 904–927.

Velasco, G., Pendás, A.M., Fueyo, A., Knäuper, V., Murphy, G., and López-Otín, C. (1999). Cloning and Characterization of Human MMP-23, a New Matrix Metalloproteinase Predominantly Expressed in Reproductive Tissues and Lacking Conserved Domains in Other Family Members. *J. Biol. Chem.* 274, 4570–4576.

Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J.H., and Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 235–241.

Vincenti, M.P. (2001). The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 151, 121–148.

Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92, 827–839.

Vlieghe, P., and Khrestchatsky, M. (2010). Peptide-based vectors for blood-brain barrier targeting and delivery of drugs to the central nervous system. *Ther. Deliv.* 1, 489–494.

Vlieghe, P., and Khrestchatsky, M. (2013). Medicinal Chemistry Based Approaches and Nanotechnology-Based Systems to Improve CNS Drug Targeting and Delivery. *Med. Res. Rev.* 33, 457–516.

- Vu, T.H., and Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* *14*, 2123–2133.
- Wang, C.-S., Wu, T.-L., Tsao, K.-C., and Sun, C.-F. (2006). Serum TIMP-1 in gastric cancer patients: a potential prognostic biomarker. *Ann. Clin. Lab. Sci.* *36*, 23–30.
- Wang, N., Zhu, M., Tsao, S.-W., Man, K., Zhang, Z., and Feng, Y. (2012). Up-regulation of TIMP-1 by genipin inhibits MMP-2 activities and suppresses the metastatic potential of human hepatocellular carcinoma. *PLoS One* *7*, e46318.
- Wang, T., Lv, J.-H., Zhang, X.-F., Li, C.-J., Han, X., and Sun, Y.-J. (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects MCF-7 breast cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis by decreasing the stability of cyclin B1. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *126*, 362–370.
- Van Wart, H.E., and Birkedal-Hansen, H. (1990). The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 5578–5582.
- Weber, G.F., Ashkar, S., and Cantor, H. (1997). Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc. Assoc. Am. Physicians* *109*, 1–9.
- Wei, S., Chen, Y., Chung, L., Nagase, H., and Brew, K. (2003). Protein engineering of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) inhibitory domain. In search of selective matrix metalloproteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* *278*, 9831–9834.
- Westermarck, J., and Kähäri, V.-M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.* *13*, 781–792.
- Williamson, R.A., Marston, F.A., Angal, S., Koklitis, P., Panico, M., Morris, H.R., Carne, A.F., Smith, B.J., Harris, T.J., and Freedman, R.B. (1990). Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem. J.* *268*, 267–274.
- Williamson, R.A., Bartels, H., Murphy, G., and Freedman, R.B. (1994). Folding and stability of the active N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Protein Eng.* *7*, 1035–1040.
- Willnow, T.E., Orth, K., and Herz, J. (1994). Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* *269*, 15827–15832.
- Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., and Friedl, P. (2007). Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* *9*, 893–904.
- Wu, Z.-S., Wu, Q., Yang, J.-H., Wang, H.-Q., Ding, X.-D., Yang, F., and Xu, X.-C. (2008). Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int. J. Cancer* *122*, 2050–2056.
- Würtz, S.O., Schrohl, A.-S., Mouridsen, H., and Brünner, N. (2008). TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer--an update. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *47*, 580–590.

- Xia, Y., Yeddula, N., Leblanc, M., Ke, E., Zhang, Y., Oldfield, E., Shaw, R.J., and Verma, I.M. (2012). Reduced cell proliferation by IKK2 depletion in a mouse lung-cancer model. *Nat. Cell Biol.* *14*, 257–265.
- Yan, P., Hu, X., Song, H., Yin, K., Bateman, R.J., Cirrito, J.R., Xiao, Q., Hsu, F.F., Turk, J.W., Xu, J., et al. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 Degrades Amyloid- β Fibrils in Vitro and Compact Plaques in Situ. *J. Biol. Chem.* *281*, 24566–24574.
- Yang, Z., Strickland, D.K., and Bornstein, P. (2001). Extracellular Matrix Metalloproteinase 2 Levels Are Regulated by the Low Density Lipoprotein-related Scavenger Receptor and Thrombospondin 2. *J. Biol. Chem.* *276*, 8403–8408.
- Yauch, R.L., Kazarov, A.R., Desai, B., Lee, R.T., and Hemler, M.E. (2000). Direct extracellular contact between integrin $\alpha(3)\beta(1)$ and TM4SF protein CD151. *J. Biol. Chem.* *275*, 9230–9238.
- Yoon, C., Van Niekerk, E.A., Henry, K., Ishikawa, T., Orita, S., Tuszynski, M.H., and Campana, W.M. (2013). Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-dependent cell signaling promotes axonal regeneration. *J. Biol. Chem.* *288*, 26557–26568.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* *14*, 163–176.
- Yunta, M., and Lazo, P.A. (2003). Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell. Signal.* *15*, 559–564.

Etude de l'interaction du TIMP-1 avec ses récepteurs

Le TIMP-1, inhibiteur naturel des métalloprotéinases matricielles, exerce des effets pléiotropes indépendants de l'inhibition des MMPs et participe au développement de certains cancers et maladies neurodégénératives. Ces effets cytokiniques du TIMP-1 impliquent sa liaison à des récepteurs membranaires dont certains sont caractérisés, la glycoprotéine CD63/intégrine β 1 et le complexe pro-MMP-9/CD44. Cependant les acides aminés ou les domaines du TIMP-1 se liant à ces récepteurs ne sont pas identifiés. Les travaux réalisés au cours de cette thèse mettent en évidence un nouveau récepteur du TIMP-1, la protéine LRP-1. Dans les neurones corticaux murins, le TIMP-1 se fixe aux domaines DII et DIV de LRP-1, est endocyté et induit une réduction de la taille des neurites ainsi qu'une augmentation du volume des cônes de croissance. Afin de caractériser cette interaction, nous avons utilisé une approche originale de modélisation moléculaire associant les analyses de modes normaux et la dynamique moléculaire. Ces analyses *in silico* ont permis d'identifier un mouvement de pince entre les domaines N- et C-terminaux du TIMP-1. Nous avons muté trois résidus (F12, K47 et W105) localisés dans une région essentielle d'un point de vue énergétique à l'exécution de ce mouvement. Ces trois mutants n'ont pas d'effet sur la longueur du réseau neuritique et ne sont pas endocytés par LRP-1. En revanche, ils interagissent avec les 2 autres récepteurs (CD63 et proMMP-9) et reproduisent les effets du TIMP-1 sauvage. De plus, nous avons identifié une séquence de 6 acides aminés localisée dans le domaine extracellulaire I de CD63 et essentielle à la liaison avec le TIMP-1. L'ensemble de ces travaux a permis l'identification de régions impliquées dans l'interaction du TIMP-1 avec ses différents récepteurs et pourrait permettre le développement de nouveaux outils pharmacologiques ciblant les activités cytokiniques du TIMP-1.

Mots clefs : TIMP-1, LRP-1, neurones corticaux, CD63, modélisation moléculaire

Study of TIMP-1 interaction with its receptors

TIMP-1, a natural inhibitor of matrix metalloproteinases, exerts pleiotropic effects independent of MMP inhibition and thus participate in the development of some cancers and neurodegenerative disorders. These cytokine-like activities require TIMP-1 binding to membrane receptors. Up to date two receptors, CD63/integrin β 1 and proMMP-9/CD44, have been characterized. Nevertheless, TIMP-1 residues or regions binding these receptors remain unknown. In this work, we have identified the protein LRP-1 as a new receptor for TIMP-1. In mouse cortical neurons, TIMP-1 preferentially binds DII and DIV domains of LRP-1, is internalized *via* a LRP-1-dependent endocytosis, reduces neurite length and increases growth cone volume. To go deeper into TIMP-1/LRP-1 interaction, we used an original molecular modeling approach which combined normal mode analysis and molecular dynamic. These *in silico* studies allowed us to point out a clamp movement between the N- and C-terminal domains of TIMP-1. Three residues localized in a region that seems essential for the movement have been mutated (F12, K47 and W105) and single mutants have been produced. These mutants do not reduce neurite outgrowth and are not internalized by LRP-1. In contrast, they interact with the two others receptors proMMP-9 and CD63 and induce associated biological effects. Furthermore, we have identified a sequence of six residues localized in the CD63 extracellular domain I and essential for TIMP-1 binding. The set of our data highlighted new regions of TIMP-1 interacting with its receptors and could lead to design novel therapeutic agents targeting the TIMP-1 cytokine-like activities.

Key words: TIMP-1, LRP-1, cortical neurons, CD63, molecular modeling

Laboratoire Signalisation et Récepteurs Matriciels (SiRMA)
UMR CNRS-URCA n°7369 Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC)
UFR Sciences Exactes et Naturelles,
Campus Moulin de la Housse BP 1039 51687 Reims cedex 2, France.