UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE –ARDENNE
ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE

T H E S E

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Discipline : ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE
Spécialité : Biochimie-Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement
Par :

Amandine SCANDOLERA

Le 11 février 2015

Ciblage thérapeutique du Complexe Récepteur de l'Elastine dans le cadre de l'invasion tumorale du mélanome : Aspects mécanistiques et impact de l'âge

Membres du jury :

Rapporteurs :	Madame le Docteur Marie-Paule JACOB-LENET (Paris) Monsieur le Professeur Dominique DELMAS (Dijon)
Examinateurs : Président :	Madame le Docteur Emilie SICK (Strasbourg) Monsieur le Professeur Laurent MARTINY (Reims)
Membre invité :	Monsieur Romain REYNAUD (Reims)
Directeurs de thèse :	Monsieur le Professeur Laurent DEBELLE (Reims) Monsieur le Docteur Laurent DUCA (Reims)

RESUME

L'élastine est la protéine de la matrice extracellulaire responsable de l'élasticité des tissus. Elle est synthétisée en abondance dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques tels que la peau, les poumons, et les artères. Ce biopolymère présente une demi-vie longue de 70 ans et est par conséquent sujet aux altérations liées à l'âge. De plus, l'élastine est dégradée lors de la progression tumorale, notamment celle du mélanome. Sa dégradation entraîne la libération de peptides dérivés de l'élastine (EDP) dotés d'activités biologiques propres et pouvant être impliqués dans l'invasion tumorale (prolifération, angiogenèse, sécrétion de protéases, invasion, survie). Nous avons été les premiers à démontrer que les EDP sont capables de fortement promouvoir le développement de mélanome *in vivo* dans un modèle murin au travers de l'augmentation de la prolifération et de l'invasion des cellules tumorales impliquant la collagènase-1 ou MMP-1. Ces données suggèrent ainsi que le récepteur de ces peptides, le complexe récepteur de l'élastine (CRE), pourrait constituer une cible thérapeutique innovante afin de lutter contre ce cancer pour lequel un manque flagrant de thérapies efficientes prévaut à l'heure actuelle. Dans le cadre de cette étude, nous avons développé différentes stratégies thérapeutiques basées sur le ciblage du récepteur CRE. Nous démontrons pour la première fois que le ciblage thérapeutique du CRE permet de limiter de manière efficace la progression du mélanome *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin. De plus, le vieillissement étant un des facteurs de risque majeur du mélanome, nous avons évalué l'impact de l'âge du stroma sur les effets des EDP et le développement tumoral associé.

Mots clés : mélanome, CRE, peptides d'élastine, stroma tumoral, vieillissement

---

ABSTRACT

Elastin is the extracellular matrix protein responsible for tissue elasticity. It is abundant in tissues experiencing important mechanical constraints such as skin, lungs and arteries. This biopolymer possesses a half-life of 70 years and, consequently, it is subjected to age-related alterations. Moreover, elastin is degraded during tumor progression, notably that of melanoma. Its degradation results in the release of elastin-derived peptides (EDP) which possess their own biological activities that can be linked to tumor invasion (proliferation, angiogenesis, proteases secretion, invasion, survival). We have been the first to show that EDP can promote melanoma development in an *in vivo* mouse model by raising the proliferation and invasion of tumor cells through collagenase-1 (MMP-1) up-regulation. These data thus suggest that the receptor for these peptides, the elastin receptor complex, could constitute a novel therapeutic target to fight against this type of cancer for which no therapies are efficient now. In this study, we have developed therapeutic strategies targeting the ERC complex. We show for the first time that the therapeutic targeting of the ERC could efficiently limit melanoma progression in an *in vitro* and *in vivo* murine model. Additionally, as aging is one of melanoma major risk factors, we have evaluated the impact of stromal age on EDP effects and the associated tumor development.

Keywords: melanoma, ERC, elastin peptides, tumor stroma, aging

Ma thèse de doctorat s'est effectuée au sein de l'Unité UMR URCA / CNRS 7369 « Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire » (MEDyC) et je tiens dans un premier temps à remercier son directeur, le Professeur François-Xavier MAQUART.

J'adresse toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements au Professeur Laurent MARTINY, Directeur du Laboratoire « Signalisation et Récepteurs Matriciels » (SiRMa) de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles appartenant à l'unité MEDyC de l'URCA, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je présente tous mes remerciements aux Professeurs Marie-Paule JACOB-LENET et Dominique DELMAS de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie également le Docteur Emilie SCIK d'avoir acceptée de siéger à mon jury de thèse en tant qu'examinateur de ce travail de thèse.

Je tiens également à adresser mes plus sincères remerciements à Romain REYNAUD Responsable R&D de la société Soliance-Givaudan d'avoir accepté cette invitation.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et un grand respect au Professeur Laurent DEBELLE et au Docteur Laurent DUCA pour avoir dirigé ce travail de thèse.

Un travail de thèse ne peut être mené à bien sans le soutien financier de nombreux organismes. Ainsi, je tiens à adresser à mes sincères remerciements au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, au Centre National de la Recherche Scientifique, à la Fondation de France et à l'Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA).

Je ne pouvais pas écrire mes remerciements personnels sans commencer par toi Dude. Je t'adresse toute ma reconnaissance pour m'avoir soutenue, encouragée et guidée durant ces trois années de thèse, qui n'ont pas toujours été faciles, mais tu as su être là. J'ai beaucoup appris au cours de ces années, tant scientifiquement qu'humainement, et comme tu me l'as dit un jour : « tu es ma fille scientifique ». Sache que ce sentiment est partagé.

Je remercie également le Professeur Laurent DEBELLE, pour son soutien, ses conseils et le temps qu'il m'a consacré. Comme vous me l'avez souvent fait remarquer, j'ai cette fâcheuse tendance à me sous-estimer. Vous avez su me montrer que j'étais capable d'y arriver et je vous en remercie.

Merci au Professeur Emmanuelle DEVARENNE pour son investissement dans le bon fonctionnement du laboratoire. Vous avez su prendre les bonnes décisions nous permettant malgré les difficultés financières de tenir bon.

Je remercie très chaleureusement Jean-Luc Breda dit « Lulu » notre animalier préféré. Merci de m'avoir aidé pour les expériences *in vivo*, d'avoir pris soin de mes vieilles souris et d'avoir été présent quand j'ai eu besoin de toi. Merci pour tout et surtout pour ton amitié.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Michel TARPIN pour son aide dans la rédaction des projets d'expérimentations animales et ses nombreux conseils avec les animaux.

Merci aux Docteurs Christine TERRYN et Jérôme DEVY pour m'avoir permis d'accéder à la plateforme PICT. J'ai ainsi pu utiliser des techniques innovantes de microscopie confocale et d'imagerie du petit animal, me permettant de valoriser mes travaux de thèse. Merci « Mr DEVY » pour l'aide que vous m'avez apportée pour les reconstructions des tumeurs et pour vos nombreux conseils.

Je remercie également la plateforme P3M et son équipe de choc, composée du Professeur Manuel DAUCHEZ, des Docteurs Nicolas BELLOY, Stéphanie BAUD et Jessica JONQUET. Merci de m'avoir permis d'accéder à la modélisation moléculaire et au super-calculateur « ROMEO ». Vos nombreux conseils et nos discussions ont été très enrichissants et m'ont permis de mieux comprendre votre métier. Sans oublier votre bonne humeur au quotidien.

J'adresse un très grand merci particulièrement au Docteur Stéphanie BAUD pour m'avoir initiée à la modélisation moléculaire. Le docking moléculaire et la dynamique n'ont plus aucun secret pour moi ou presque ☺. Ça a été un réel plaisir de découvrir ton univers et j'espère

continuer sur ma lancée. Merci du temps que tu m'as consacré et de l'aide que tu m'as apportée pour déchiffrer toutes ces données de bio-informatique.

Je tiens à remercier également le Docteur Pascal MAURICE pour nos nombreuses conversations scientifiques, ses conseils et son aide. Tu es pour un moi un modèle de réussite scientifique et j'espère un jour pouvoir t'égaler.

Merci au Docteur Sébastien BLAISE pour nos nombreuses discussions, ses conseils et sa reconnaissance. Merci pour ces grands moments matinaux avec les souris et pour ton aide très précieuse concernant les animaux.

Merci au Docteur Hervé SARTELET dit « Callaghan » pour sa bonne humeur au quotidien, ses conseils, son soutien, son amitié et ses encouragements pendant ces trois années.

Merci à Annie CARLIER pour m'avoir enseigné la technique de l'immunohistochimie et pour son aide avec les marquages à haut débit. J'adresse également mes remerciements à Cathy, Marie-Line, Isa et Laetitia pour leur investissement au sein du laboratoire, leur aide et leur sympathie.

Je remercie le Bureau BI18 : Titoff, Olivier, Albin et Marie-Line pour leur bonne humeur au quotidien, pour leur investissement dans la collectivité et surtout pour les goûters partagés. Une mention spéciale pour Olivier avec qui la chanson est devenue un rituel en culture cellulaire et pour tes blagues « à 2 balles » que je ne comprends pas toujours. Et merci de m'avoir TOUJOURS laissé l'étuve à laver pendant nos tours de nettoyage, et oui je m'en suis rendue compte !!!! ;)

Je souhaite également dire merci à mes collègues du midi : Katia, Niketik, Dude, Hervé, La coq, Bétrix, Camille, Florence, Chantal, Compagne, Carine, Charlotte, et les autres… ainsi que l'ensemble des personnes que je n'ai pas encore cité, pour ces moments de convivialité.

A tous les doctorants Romain, Louis, Alex, Ludivine, Laetitia, et future doctorante Amandine merci pour les moments de convivialité pendant les manipes. Je vous souhaite bon courage pour la suite.

Anthony, l'homme étrange de ce laboratoire ☺, je te souhaite tout le meilleur pour ta carrière scientifique et merci de ton amitié. Je n'oublierai pas ces discussions sans queue ni tête à refaire le monde pour toi et à le découvrir pour moi.

Merci Charlotte pour tous ces moments partagés ces dernières années dans notre bureau. Merci de ton amitié et de ta bonne humeur quotidienne. Même épuisée avec des cernes jusqu'aux genoux, tu gardes la pêche. Je te souhaite une super dernière année de thèse, une bonne rédaction, plein de résultats et l'accomplissement de tes projets pour la suite.

Merci aux collègues SDRPiens JF, Barbara, Julie, Alessandro et les autres… pour ces moments passés ensemble et ces bières partagées à la BH du vendredi soir.

Je ne peux oublier de remercier LA rencontre de ces trois années Carine dit « Caca la super Bombe ». Ton arrivée au laboratoire a tout changé pour moi et je ne te remercierai jamais assez pour ça. Merci de tous ces moments au labo à travailler, à rigoler, à se comprendre sans un mot, à faire les LDP et sans oublier nos lendemains difficiles souvent accompagnés d'un niveau de performance exceptionnelle. Merci de ton soutien, tes encouragements et de toujours croire que je suis la meilleure. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, professionnellement et personnellement, tu le mérites. Si tu n'y crois pas, parce que je sais que c'est ce que tu dirais « mouais », et bien sache que j'y crois suffisamment pour deux. Et avant que tu proposes, c'est toujours NON pour Mehdi ;).

Un grand merci à mes amis. Céline pour ces moments de RUN hebdomadaires souvent transformés en mensuels ☺ et à bientôt pour apprendre la musique avec toi. Flo où l'homme qui s'auto défie mais qui visiblement n'est pas plus fort que lui-même. Arnal celui qui est de l'avis de tout le monde ;). Ibib, celui qui soi-disant à des « limites », Hedi l'expatrié Réunionnais. Roxane, promis un jour j'arriverai jusqu'à Bordeaux. Marina, Gilles, Eliott et la petite Charlie merci pour tous ces moments passés ensemble. Ophélie et Erwan mes coachs personnels ;) et MERCI à tous ceux que j'ai probablement oubliés.

Un petit mot à la Famille SELLAMI : merci pour vos encouragements et ces moments passés avec vous.

J'adresse ma plus grande reconnaissance à mes parents, mon frère Romain, Lise, ma sœur Marinette, Don Diego et leur petit bébé Gaby dit Pépito. Merci pour votre soutien, votre compréhension et pour m'avoir écoutée répéter mes présentations pour les congrès alors que pour vous c'était du chinois. Merci d'avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments et d'avoir toujours cru en moi.

Et je garde le meilleur pour la fin, Mehdi. Merci de partager ma vie depuis toutes ces années, et de me supporter surtout en cette période de fin de thèse. Je ne te remercierai jamais assez de

m’avoir facilité la vie au quotidien pour me permettre d’avoir plus de temps pour travailler. Alors, merci de n’avoir JAMAIS fait la vaisselle, ni le ménage, ni étendu le linge et j’en passe et des meilleures. Comme tu dis toujours il faut se dépasser et bien sache que j’ai relevé le défi. J’ai su écrire une thèse tout en gérant ton « bordel » au quotidien. Je pense que je peux tout affronter maintenant et que tu devrais m’épouser :). SURTOUT ne changes rien, avec toi je ne m’ennuierai jamais c’est certain ;) et c’est surement pour ça que je t’aime :) . Ou par-ce que tu es chef d’entreprise va savoir :).

Table des matières

Liste des abréviations ---- *14*

Liste des tableaux ---- *19*

Liste des figures ---- *21*

I. Introduction ---- *25*

A. La peau ---- **25**

1. L'épiderme ---- 26
2. Le derme ---- 27
3. L'hypoderme ---- 28
4. Fonctions biologiques de la peau ---- 28

B. La Matrice Extracellulaire ---- **29**

1. Les protéoglycanes ---- 30
2. Les glycoprotéines ---- 31
3. Les collagènes ---- 31
4. L'élastine ---- 32

C. Les fibres élastiques ---- **32**

1. La fibre élastique ---- 32
2. Organisation des fibres élastiques ---- 34
   a) Les microfibrilles ---- 34
      (1) Les fibrillines ---- 35
      (2) Les MAGPs ---- 36
      (3) Les protéoglycanes ---- 37
      (4) Les autres molécules ---- 37
   b) Le cœur d'élastine ---- 38

D. L'élastine ---- **39**

1. Structure du gène de l'élastine ---- 39
2. Régulation de la transcription de la tropoélastine ---- 41
3. Sécrétion de la tropoélastine ---- 42
4. Incorporation de la tropoélastine aux fibres élastiques ---- 42
5. La coacervation de la tropoélastine ---- 44
6. Formation des liaisons croisées de l'élastine ---- 44
7. L'élastine mature ---- 46

E. Les peptides d'élastine ---- **46**

1. Nature et origine ---- 46
2. Rôle biologique des peptides d'élastine ---- 47

F. Les récepteurs de d'élastine ---- **48**

1. Le complexe récepteur de l'élastine ---- 48
   a) L'Elastin Binding Protein (EBP) ---- 49
   b) La protective protein/ Cathepsin A (PPCA) ---- 51
   c) La neuraminidase-1 ---- 51
   d) Autres récepteurs des peptides d'élastine ---- 51
2. Complexe récepteur de l'élastine et signalisation intracellulaire ---- 52

G. Cancer et Peptides d'élastine ---- **55**

1. Le cancer ---- 55

2. Peptides d'élastine et cancer ---- 55

H. Le mélanome ---- 56

1. Généralités ---- 56
2. Épidémiologie ---- 56
3. Facteurs de risque ---- 57
   a) Les facteurs de risque extrinsèques ---- 57
   b) Les facteurs de risques intrinsèques ---- 58
4. Progression tumorale du mélanome ---- 60
5. Angiogenèse tumorale ---- 61

I. Mélanome et stroma tumoral ---- 63

1. Structure du stroma du mélanome ---- 63
2. Importance du stroma dans le mélanome ---- 64
   a) Facteurs de croissance et cytokines ---- 64
   b) Métalloprotéinases matricielles (MMPs) ---- 65
   c) Rôle des fibroblastes ---- 66
   d) Mélanome et fragmentation de l'élastine ---- 67
   e) Mélanome et vieillissement du stroma ---- 69

II. But de l'étude ---- 73

III. Matériels et Méthodes ---- 79

A. Modèles cellulaires ---- 79

1. Lignée cellulaire de mélanome B16F1 ---- 79
2. Cellules primaires ---- 79
   a) Les fibroblastes ---- 79
   b) Les cellules endothéliales HUVECs ---- 80

B. Culture cellulaire ---- 80

1. Décongélation de cellules primaires et de la lignée cellulaire ---- 80
2. Conditions de culture ---- 81
   a) Les lignée de mélanome B16F1 ---- 81
   b) Les fibroblastes ---- 81
      1) Obtention des fibroblastes ---- 81
      2) Entretien des fibroblastes ---- 82
   c) Les cellules endothéliales HUVECs ---- 82
3. Mise au repos des cellules ---- 82
4. Traitements des cellules ---- 83
   a) Préparation de kappa élastine ---- 83
   b) Stimulation avec de la kappa élastine ---- 85
   c) Stimulation avec des peptides synthétiques ---- 85
   d) Inhibiteurs utilisés ---- 85
      1) Inhibiteur de la Neuraminidase-1 ---- 85
      2) Antagoniste de l'Elastin Binding Protein (EBP) ---- 86

C. Analyse du phénotype cellulaire ---- 86

1. Mise en place d'un modèle de vieillissement *in vitro* appliqué à des cellules primaires endothéliales et fibroblastes dermiques humains ---- 86
2. Mesure de la prolifération cellulaire par numération ---- 87
3. Détection de la β-galactosidase acide (pH 6) ---- 87
4. Etude de la migration cellulaire ---- 88

D. Analyse des expressions protéiques et de leur fonctionnalité ---- 88

1. Dosage de la sécrétion de la MMP-1 par ELISA ---- 88

2. Obtention d'extraits protéiques totaux cellulaires ---- 88
3. Obtention des protéines membranaires « crude membrane » ---- 89
4. Analyse de l'expresion protéique par Western Blot ---- 89
5. Analyse de l'activité sialidase ---- 91
a) Mesure de l'activité sialidase ---- 91
b) Analyse de la production de lactosylcéramide ---- 92
c) Analyse du GM_3 par imagerie d'immunofluorescence ---- 93

E. Analyse de l'expression des ARN messagers (ARNm) ---- 93
1. Extraction des ARNm ---- 93
2. Dosage et vérification de la qualité des ARNs ---- 94
3. Rétrotranscription des ARNs et PCR de vérification ---- 94
4. RT-qPCR ---- 96

F. Etude de l'angiogenèse ---- 99
1. Formation de pseudotubes sur Matrigel® et marquage à la calcéine ---- 99
2. Analyse *ex vivo* de l'angiogenèse par la méthode des anneaux aortiques ---- 99
3. Analyse *in vivo* par méthode de « Matrigel plugs » ---- 100

G. Etude du développement tumoral en modèle murin ---- 100
1. Analyse du développement tumoral *in vivo* ---- 100
2. Analyse par immunohistochimie des tumeurs ---- 101

H. Etude *in silico* ---- 102
1. Docking moléculaire ---- 102
a) Principe ---- 103
b) Conditions expérimentales ---- 106
1) Docking EBP – VGVAPG ---- 107
2) Docking V14 – VGVAPG ---- 107
3) Docking EBP – V14 ---- 108
c) Analyses des résultats ---- 109
2. Dynamique moléculaire ---- 110
a) Principe ---- 110
b) Conditions expérimentales ---- 113
1) Préparation du système ---- 113
2) Minimisation de l'énergie ---- 115
3) Chauffage ---- 116
4) Equilibrage ---- 116
5) Dynamique moléculaire : phase de production ---- 116
c) Analyses des résultats ---- 117
1) Analyses de l'interaction VGVAPG-protéine ---- 117
2) Analyses des structures secondaires ---- 118

I. Analyse statistique des résultats obtenus ---- 119

IV. Résultats ---- 122

A. Ciblage thérapeutique de la neuraminidase-1 dans le développement tumoral du mélanome ---- 122
1. Impact *in vitro* de l'inhibition de Neu-1 lors du développement du mélanome ---- 125
a) Impact de l'inhibition de Neu-1 sur la prolifération induite par les peptides d'élastine ---- 125
b) Impact de l'inhibition de Neu-1 sur l'invasion induite par les peptides d'élastine ---- 126
c) Impact de l'inhibition de Neu-1 sur la signalisation des peptides d'élastine. ---- 128
2. Impact *in vivo* de l'inhibition de Neu-1 ---- 129
3. Influence de l'inhibition de Neu-1 sur l'angiogenèse ---- 132

a) Impact *in vitro* de l'inhibition de Neu-1 ----132
b) Impact *ex vivo* de l'inhibition de Neu-1----133
c) Impact *in vivo* de l'inhibition de Neu-1 ----134

B. Ciblage thérapeutique de la sous-unité EBP dans le développement tumoral du mélanome.---- 136

1. Développement d'une nouvelle approche par étude *in silico* ----136
   a) Docking moléculaire V14-VGVAPG ----137
   b) Dynamique moléculaire V14-VGVAPG ----140
2. Effet du V14 seul ou combiné au Dana sur l'invasion du mélanome *in vitro.* ----147
3. Impact de l'antagoniste V14 seul ou combiné au Dana sur le développement tumorale du mélanome *in vivo.* ----152
4. Influence de l'inhibition de l'EBP combiné ou non à l'inhibition de la sous-unité Neu-1 sur l'angiogenèse ----155

C. Vieillissement et ciblage thérapeutique du CRE---- 159

1. Impact de l'âge sur le développement du mélanome stimulé par les EDPs et sur le ciblage thérapeutique du CRE *in vivo*----159
2. Analyse *in vitro* des effets des EDPs sur les fibroblastses dermiques et les cellules endothéliales au cours du viellissement *in vitro*----163

D. Analyse de l'étude du découplage du CRE au cours du vieillissement ---- 170

1. Impact de l'âge sur l'expression du CRE----170
2. Altération de la fonctionalité du CRE au cours de l'âge----176
   a) Influence du viellissement sur l'activité sialidase du CRE ----177
   b) Influence du viellissement sur la production de LacCer ----178

V. Discussion et Perspectives ---- 182

A. Discussion---- 182

B. Perspectives ---- 193

VI. Annexes ---- 200

VII. Communications ---- 202

VIII. Références bibliographiques ---- 206

Liste des abréviations

I. Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADT	*Autodock Tools*
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	*Activator protein 1*
ARNm	Acide ribonucléique messager
BCA	*Bicinchoninic acid*
BET	Bromure d'éthidium
bFGF	*Basic fibroblast growth factor*
β-gal	β-galactosidase
BSA	*Bovine serum albumin*
cbEGF	*Calcium binding epidermal growth factor*
CD31	PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*)
CDK4	*Cyclin-dependent kinase 4*
CDKN2A	*Cyclin dependent kinase 2a / p16*
CRE	Complexe récepteur de l'élastine
DAB	3, 3'-diaminobenzidine
Dana	*2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid*
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSSP	*Dictionary of secondary structure of proteins*
EBP	*Elastin binding protein*
ECBM	*Endothelial cell basal medium*
ECGM2	*Endothelial cell growth medium 2*
ECGS	*Endothelial Cell Growth Supplement*
EDTA	*Ethylene diamine tetraacetic acid*
EDP	*Elastin-derived peptides*

EGF	*Epidermal growth factor*
EGFR	*Epidermal Growth factor receptor*
EGTA	*Ethylene glycol tetraacetic acid*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ELN	Elastine (gène)
ERK 1/2	*Extracellular signal-regulated kinase*
FAP	*Fibroblast activation protein*
FBLN 5	Fibuline 5
FBN	Fibrilline (gène)
FITC	*Fluorescein isothiocyanate*
GAGs	Glycosaminoglycanes
Gal-3	Galectine-3
GM_3	Acide N-acétylneuraminique-α (2-3)-galactosyl-β (1-4)-glucosyl-β (1-1')-céramide
HAS	Haute Autorité de Santé
HPLC	*High performance liquid chromatography*
HRP	*Horseradish peroxidase*
HUVEC	*Human umbilical vein endothelial cell*
IGF-1	*Insulin-like growth factor-1*
IGFR	*Insulin growth factor receptor*
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IL-1β	Interleukine-1β
INCA	Institut National du Cancer
INVS	Institut National de Veille sanitaire
kDa	kilo Dalton
kE	Kappa-élastine
LacCer	Lactosylcéramide
LOX	Lysyl oxidase

LTBP	*Latent TGF-β binding protein*
mAb	*Monoclonal antibody*
MAGP	*Microfibril-associated glycoprotein*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
M-ColA	*Mouse collagenase*
MCR1	*Human melanocortin 1 receptor*
MEC	Matrice extracellulaire
MEK 1/2	*MAP ERK kinase 1/2*
MES	*2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid*
MITF	*Microphthalmia associated transcription factor*
MMP	*Matrix metalloproteinase*
MoMa	Monocyte Macrophage
MT-MMP	*Membrane Type Matrix Metalloproteinase*
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
Neu-1	Neuraminidase-1
Neu-3	Neuraminidase-3
NF1	*Nuclear factor-1*
p/v	Poids/volume
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	*Polymerization Chain Reaction*
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PDGFR	*Platelet-derived growth factor receptor*
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Protéoglycane
pH	Potentiel hydrogène
PIC	*Protease inhibitor cocktail*
PI3K	*Phosphatidylinositol-3-kinase*
PKA	Protéine kinase A

PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PPCA	*Protective protein/Cathepsin A*
RGP	*Radial growth phase*
R3-IGF	*Recombinant long R insulin-like growth factor-1*
Rh-EGF	*Recombinant human Epithelial Growth Factor*
Rh-FGFB	*Recombinant human fibroblast growth factor B*
RMSD	*Root-mean-square deviation*
ROS	*Reactive Oxygen Species*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute medium*
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
SEM	*Standard error of the mean*
S-Gal	*Spliced-galactosidase*
SP1	*Specificity protein-1*
SVF	Sérum de veau foetal
TBS	*Tris buffered saline*
TBS-T	*Tris buffered saline-Tween*
TEM	Tris-EDTA-$MgCl_2$
TGF-β	*Transforming growth factor-β*
TIMP	*Tissue inhibitor of metalloproteinase*
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor-alpha*
UI	Unité internationale
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
VGP	*Vertical growth phase*
VMD	*Visual Molecular Dynamics*
v/v	Volume/volume
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

Liste des tableaux

II. Liste des tableaux

Tableau 1. Phototypes cutanés 59

Tableau 2. Anticorps utilisés en Western Blot 90

Tableau 3. Listes des amorces utilisées en PCR 96

Tableau 4. Liste des amorces utilisées en qPCR. 98

Liste des figures

III. Liste des figures

Figure 1. Représentation tridimensionnelle d'une coupe de peau. 25

Figure 2. Structure des différentes couches de l'épiderme. 26

Figure 3. Coupe histologique de peau démontrant le derme papillaire et réticulaire.. 28

Figure 4. Représentation schématique d'une fibre élastique.. 33

Figure 5. Organisation tissu-dépendante des fibres élastiques.. 33

Figure 6. Les fibres élastiques de la peau (Naylor et al., 2011).. 34

Figure 7. Représentation schématique des étapes de l'élastogenèse. 39

Figure 8. Structure en domaine du gène de la tropoélastine humaine.. 41

Figure 9. Représentation schématique de l'incorporation de la tropoélastine aux fibres élastiques matures.. 43

Figure 10. Formation des liaisons croisées de l'élastine.. 45

Figure 11. Représentation schématique du complexe récepteur de l'élastine. 49

Figure 12. Représentation schématique des transcrits primaires de la β-galactosidase et de l'EBP. 50

Figure 13. Voies de signalisation intracellulaires mises en jeu suite à l'interaction peptides d'élastine – CRE 53

Figure 14. Progression tumorale biphasique du mélanome. 61

Figure 15. Illustration de la mise en place de l'angiogenèse tumorale. 63

Figure 16. Représentation schématique hypothétique de l'effet des peptides d'élastine sur le stroma tumoral du mélanome.. 68

Figure 17. Effets des peptides d'élastine sur la croissance et l'invasion du mélanome *in vivo* et *in vitro*.. 75

Figure 18. Rôle de la MMP-1 dans l'invasion du mélanome médiée par les peptides d'élastine.. 76

Figure 19. Schéma d'un cycle de PCR.. 95

Figure 20. Représentation schématique d'une grille calculée par AutoGrid. 104

Figure 21. Histogramme des différents clusters obtenus après un docking moléculaire 106

Figure 22. Représentation de la boite de calcul utilisée pour le docking du VGVAPG sur l'EBP 107

Figure 23. Représentation de la boite de calcul utilisée pour le docking du VGVAPG sur le peptide V14 108

Figure 24. Représentation des interactions internes (liées) et externes (non liées) d'une molécule. 110

Figure 25. Représentation des différentes contributions liantes et de leurs profils énergétiques..... 111

Figure 26. Représentation des différents termes impliqués dans l'énergie potentielle d'une molécule pour les interactions non liantes.. 112

Figure 27. Exemple d'une boîte de simulation remplie d'eau contenant une molécule d'intérêt..... 115

Figure 28. Création des 26 images autour du système initial pour appliquer les conditions périodique aux limites 117

Figure 29. Exemple d'analyse structurale après simulation en utilisant l'algorithme STRIDE dans VMD.. 119

Figure 30. Représentation schématique de l'influence du Dana sur les effets pro-tumoraux des EDPs.. 123

Figure 31. Les effets des peptides d'élastine dans les cellules B16F1 impliquent le CRE..... 124

Figure 32. Inhibition de la prolifération induite par les peptides d'élastine par le Dana..... 126

Figure 33. Le Dana inhibe la migration et l'expression de la MMP-1 induites par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1. 127

Figure 34. Le Dana inhibe l'activation d'ERK1/2 induite par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1.. 128

Figure 35. Le Dana réduit la croissance tumorale médiée par les peptides d'élastine *in vivo*. 130

Figure 36. Analyse par immunohistochimie du Ki67, VEGF et de la MMP-1 dans les tumeurs issues des allogreffes de cellules B16F1.. 131

Figure 37. Effet du Dana sur l'angiogenèse *in vitro*.. 133

Figure 38. Impact du Dana sur l'angiogenèse *ex vivo*. 134

Figure 39. Impact du Dana sur l'angiogenèse *in vivo*.. 135

Figure 40. Représentation schématique de la stratégie adoptée pour lutter contre les effets pro-tumoraux des peptides d'élastine : inhibition de la sous-unité EBP, inhibition conjointe des sous-unités EBP et Neu-1..... 136

Figure 41. Représentation des différents clusters obtenus en fonction de leur énergie..... 138

Figure 42. Visualisation des conformations majoritaires obtenues après le docking moléculaire des deux systèmes..... 139

Figure 43. Représentation de l'évolution de la distance entre QDEA (V14/EBP) et GV(VGVAPG) au cours du temps..... 141

Figure 44. Carte de contacts représentant les distances entre les résidus du V14 et de VGVAPG..... 143

Figure 45. Pourcentage de structures secondaires formées entre V14 et VGVAPG..... 145

Figure 46. Structures secondaires formées entre V14 et VGVAPG.. 146

Figure 47. Représentation des structures secondaires entre V14 et VGVAPG corrélées à la distance entre ces deux molécules au cours du temps. 147

Figure 48. Inhibition de la prolifération induite par les peptides d'élastine par le V14 seul ou combiné au Dana. 148

Figure 49. Le V14 seul ou combiné au Dana inhibe la migration et l'expression de la MMP-1 induites par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1. 150

Figure 50. Le V14 seul ou combiné au Dana réduit l'activation d'ERK1/2 médiée par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1. 151

Figure 51. Le V14 seul ou combiné au Dana réduit la croissance tumorale médiée par les peptides d'élastine *in vivo*.. 153

Figure 52. Analyse par immunohistochimie du Ki67, VEGF et de la MMP-1 dans les tumeurs issues des allogreffes de cellules B16F1 traitées au V14 seul ou combiné au Dana..... 154

Figure 53. Effet du V14 seul ou combiné au Dana sur l'angiogenèse *in vitro*..... 156

Figure 54. Impact du V14 seul ou combiné au Dana sur l'angiogenèse *ex vivo*. 157

Figure 55. Effet du Dana, du V14 seul ou de la combinaison des deux sur la croissance tumorale médiée par les peptides d'élastine *in vivo*. 160

Figure 56. Modulation de la croissance tumorale en fonction de l'âge *in vivo*.. 161

Figure 57. Analyse par immunohistochimie du Ki67, VEGF et de la MMP-1 dans les tumeurs issues des allogreffes sur souris âgées..... 162

Figure 58. Caractérisation du modèle de vieillissement *in vitro*.. 165

Figure 59. Impact de l'âge et des différents traitements sur les fibroblastes du stroma.. 167

Figure 60. Impact de l'âge et des différents traitements sur les cellules endothéliales du stroma. 169

Figure 61. Expression des ARNm des trois sous-unités du CRE au cours du vieillissement *in vitro*. 173

Figure 62. Analyse de l'expression protéique de Neu-1 et PPCA au cours du vieillissement *in vitro*. 175

Figure 63. Localisation de Neu-1 et PPCA au cours du vieillissement *in vitro*. 176

Figure 64. Impact de l'âge sur l'activité sialidase induite par les peptides d'élastine. 178

Figure 65. Impact de l'âge sur la production de LacCer induite par les peptides d'élastine..... 179

Introduction

I. Introduction

A. La peau

La peau, également appelée membrane cutanée, est connue comme l'enveloppe externe protectrice du corps humain qui sépare les organes des agressions environnementales comme le froid, la chaleur, ou d'autres agents extérieurs. Par ailleurs, elle permet à l'Homme de percevoir différentes sensations telles que les sensations tactiles, thermiques et douloureuses. La peau est l'organe le plus lourd (environ 3,5 kg) et le plus étendu (1,80 m²) chez l'Homme. Elle possède une structure complexe en multicouches (épiderme, derme et hypoderme) dont l'épaisseur varie selon la localisation anatomique, le sexe et l'âge. Chaque couche de la peau présente une composition structurale et moléculaire différente, lui donnant ainsi des fonctions spécifiques. La structure complexe de la peau lui confère des propriétés mécaniques dont l'élasticité reste la plus connue.

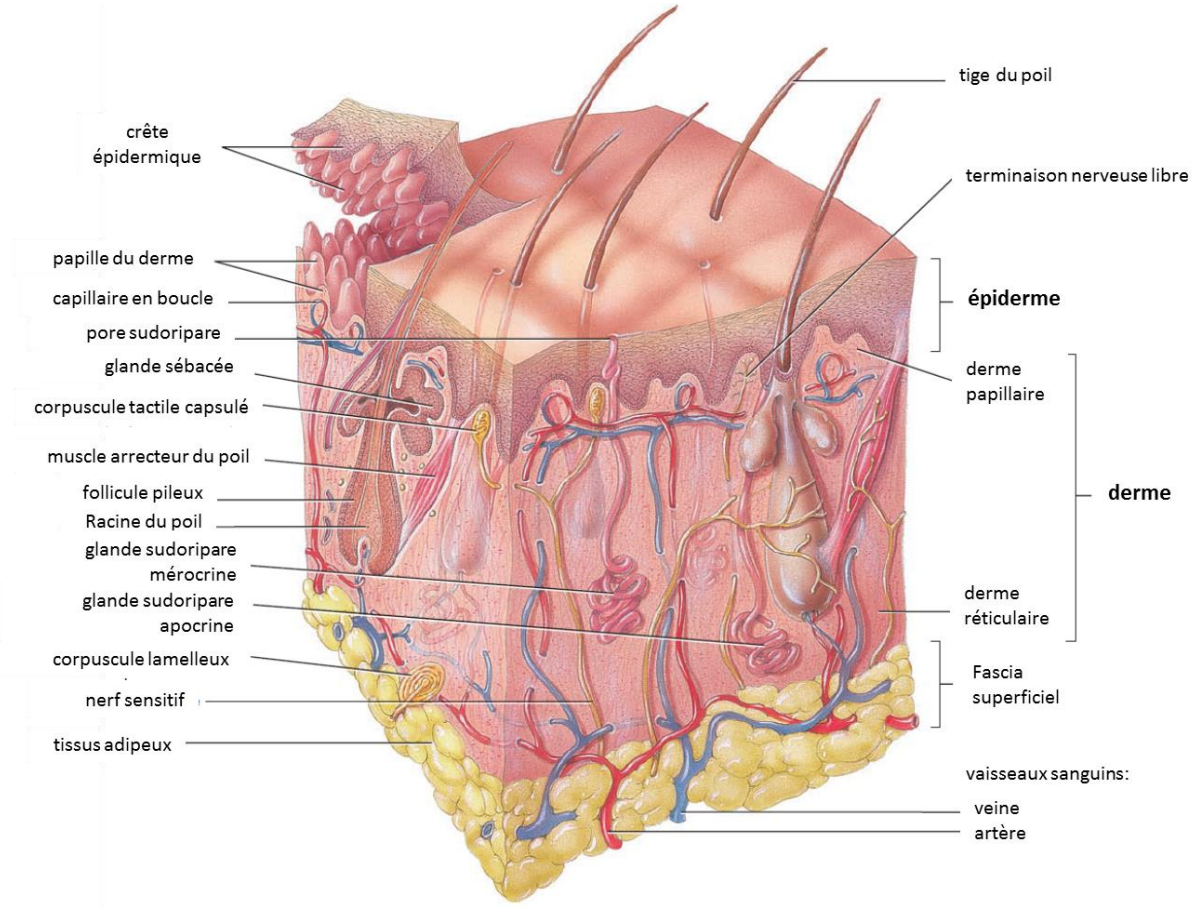


Figure 1. Représentation tridimensionnelle d'une coupe de peau.
(D'apès G. Tortora and B. Derrickson, Principles of anatomy and physiology, Editions de Boeck, 2011

1. L'épiderme

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau. Elle est composée d'un épithélium squameux stratifié et kératinisé d'une épaisseur d'environ 0,1 mm en moyenne. Il est constitué de quatre types cellulaires majoritaires que sont les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Le kératinocyte est le type cellulaire majoritaire, représentant 90% des cellules de l'épiderme. Ils sont organisés en quatre (ou cinq) couches cellulaires, selon la localisation dans le corps humain, qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle : les couches basale, épineuse, granuleuse, (claire) et cornée (Figure 2) (Simpson et al., 2011).

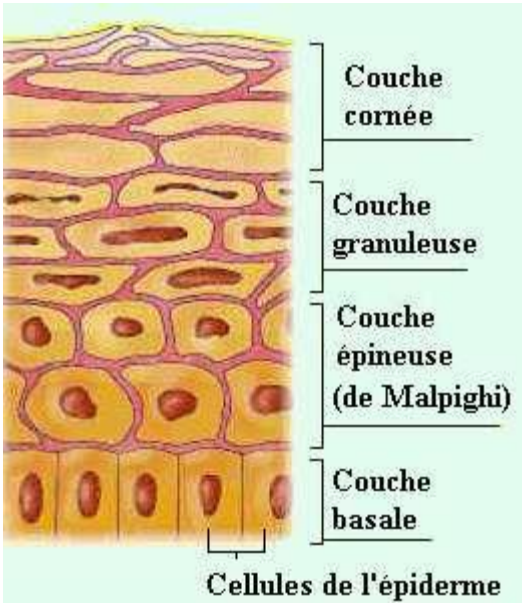


Figure 2. Structure des différentes couches de l'épiderme. Les kératinocytes sont organisés en quatre ou cinq couches cellulaires qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle : les couches basale, épineuse, granuleuse, (claire), et cornée. D'après http://www.galopin-fr.net/peau/peau1.htm

Les kératinocytes produisent de la kératine, une protéine très résistante et fibreuse qui aide à protéger la peau et les tissus sous-jacents de la chaleur, des microbes et des produits chimiques. Le mélanocyte est le deuxième type cellulaire majoritaire de l'épiderme représentant 8% des cellules. Ils sont localisés entre les kératinocytes. L'une des caractéristiques principales des mélanocytes est la synthèse d'un pigment, la mélanine, qui est responsable de la couleur de la peau pouvant aller du jaune-rouge au marron-noir. Représentant 2 à 4% des cellules de l'épiderme, les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques qui participent à la réponse immunitaire mise en place lors d'une agression de la peau d'origine

microbienne. Les cellules de Merkel situées dans la couche basale représentent le quatrième type cellulaire de l'épiderme le moins représenté. D'origine neuroendocrinienne, les cellules de Merkel jouent un rôle de mécanorécepteur responsable de la sensation tactile. D'une manière générale, l'épiderme joue un rôle de barrière contre les agressions extérieures protégeant ainsi l'intégrité des tissus et des organes sous-jacents (Tortora and Derrickson, 2008).

2. Le derme

Le derme, couche la plus épaisse de la peau, est situé sous l'épiderme dont il est séparé par la jonction dermo-épidermique. Il est composé de tissu conjonctif contenant des fibroblastes, des fibres de collagènes et d'élastine, des glandes, des follicules pileux, des nerfs et des vaisseaux sanguins. Le derme est subdivisé en deux régions de la plus superficielle à la plus profonde : le derme papillaire et le derme réticulaire.

Le derme papillaire se trouve sous l'épiderme et forme les papilles dermiques entre les crêtes épidermiques. C'est un tissu conjonctif lâche constitué de fines fibrilles de collagènes et d'élastine. Un plexus vasculaire sous les crêtes papillaires délimite la limite inférieure du derme papillaire.

Le derme réticulaire plus profond est un tissu conjonctif plus dense composé d'un entrecroisement de fibres de collagène et d'élastine matures présentant une orientation préférentiellement parallèle à la surface de la peau (Figure 3). Un plexus vasculaire profond marque la transition entre le tissu fibreux et le tissu adipeux sous-jacent. Dans la peau, le nombre de cellules diminue et la taille des structures fibreuses augmente progressivement depuis le derme jusqu'à l'hypoderme. L'association des fibres de collagènes et des fibres élastiques confère à la peau sa résistance, son extensibilité et son élasticité (Kielty et al., 2002; Sherratt, 2009).

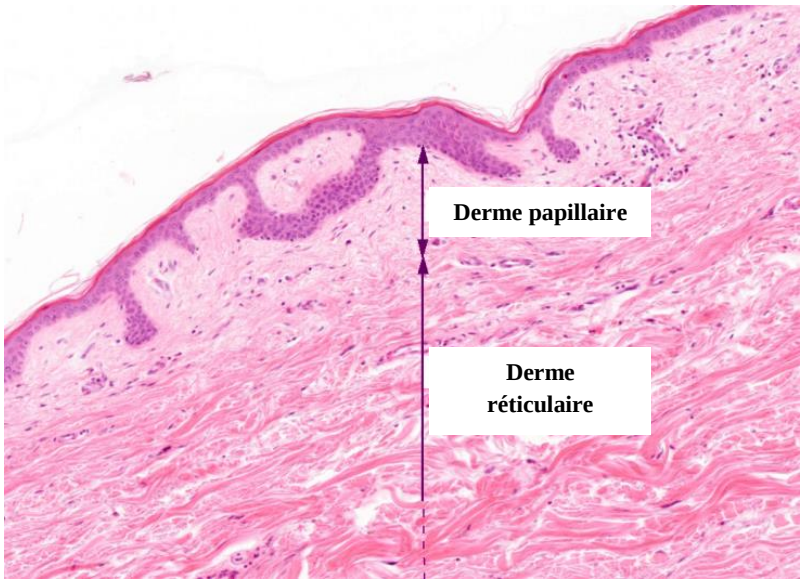


Figure 3. Coupe histologique de peau montrant les dermes papillaire et réticulaire. Le derme papillaire est situé sous l'épiderme séparé par la jonction dermo-épidermique au sein des crêtes épidermiques. Le derme réticulaire se trouve plus en profondeur et présente la particularité d'être enrichi en élastine. Issue de la bibiliothèque icônographique de l'hôpital de Genève.

3. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau située sous le derme. Egalement appelé *fascia* superficielle, l'hypoderme est majoritairement constitué de cellules adipeuses organisées en lobules séparés par du tissu conjonctif lâche et parcouru de vaisseaux sanguins. Les propriétés d'accumulation et de stockage que possèdent les cellules adipeuses confèrent à l'hypoderme le rôle de réserve énergétique (Cronjé, 2000; Tortora and Derrickson, 2008).

4. Fonctions biologiques de la peau

La peau fournit une protection au corps humain de différentes manières. Elle joue un rôle de barrière mécanique protégeant le tissu sous-jacent des microbes, de l'abrasion, de la chaleur et des produits chimiques. Elle constitue également une barrière chimique, d'une part avec la libération de lipides par les granules lamellaires qui protègent la peau de la déshydratation, mais également par la sécrétion de sébum provenant des glandes sébacées qui possède des propriétés antibactériennes. De plus, la synthèse de mélanine protége la peau des effets nocifs du rayonnement ultraviolet et le pH acide de la transpiration permet de retarder la croissance de certains microorganismes. Enfin, la peau est une barrière biologique puisqu'elle contient des cellules de l'immunité, les cellules de Langerhans, capables de déclencher une réponse immunitaire vis-à-vis d'un pathogène.

L'une des autres fonctions bien connues de la peau est son action dans la thermorégulation par deux phénomènes bien distincts. La peau est capable de réguler la température corporelle, d'une part, en libérant la sueur à la surface de l'organisme et d'autre part, en modulant le débit sanguin intradermique dépendant de la température ambiante et de l'activité physique.

La peau présente de nombreuses fonctions biologiques et mécaniques comme nous l'avons précédemment cité. Cependant, elle a également d'autres propriétés. En effet, la peau peut être considérée comme un véritable réservoir sanguin de par son vaste réseau vasculaire intradermique. Par ailleurs, la peau peut être un lieu de synthèse moléculaire incluant la synthèse de la vitamine D impliquée notamment dans l'absorption du calcium. En effet, la synthèse de la vitamine D exige l'activation dans la peau d'une molécule précurseur par les rayons ultraviolets du soleil. Cette dernière diffuse alors dans la circulation sanguine pour être ensuite transformée par les enzymes du foie et des reins afin de produire la forme active de la vitamine D, le calcitriol, impliquée dans l'absorption du calcium (Tortora and Derrickson, 2008).

B. La Matrice Extracellulaire

La Matrice ExtraCellulaire (MEC) est une entité non cellulaire complexe présente dans tous les tissus et organes d'un organisme. La MEC fournit non seulement un support physique essentiel au maintien des cellules au sein du tissu mais également les signaux biomécaniques et biochimiques cruciaux pour leur survie.

La MEC est un réseau tridimensionnel de macromolécules qui participent activement à un grand nombre de processus cellulaires physiopathologiques. Ces mécanismes impliquent la libération de facteurs solubles tels que les hormones, les cytokines ou les facteurs de croissance, ou bien des interactions cellules/MEC capables de réguler l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Tanzer, 2006).

La MEC est composée de quatre grandes familles de macromolécules que sont les collagènes, l'élastine, les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure (Mecham, 2011). Au sein de la MEC, les fibres de collagènes et d'élastine forment un réseau dense qui assure la résistance aux tensions, alors que les protéoglycanes et les glycoprotéines s'organisent en un réseau plus lâche permettant de résister aux forces de compression (Culav et al., 1999). La composition de la MEC varie selon les tissus, orientant ainsi les propriétés mécaniques de ceux-

ci. Ainsi, la peau a des propriétés élastiques dues à sa richesse en fibres élastiques comparativement à des tissus plus rigides et incompressibles comme l'os très riche en collagènes.

La MEC est soumise à un remodelage perpétuel, alternant synthèse et dégradation. Ce processus dynamique implique de nombreuses activités enzymatiques et non enzymatiques. Les protéines de la MEC sont principalement synthétisées par les fibroblastes et leur dégradation est assurée par des enzymes protéolytiques comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs), les protéases à sérine (système plasminogène-plasmine) et les protéases à cystéine (cathepsines) (Mecham, 2011; Page-McCaw et al., 2007).

La dégradation de la MEC est une étape importante dans le développement, la réparation tissulaire et le remodelage. La protéolyse matricielle se produit généralement dans des conditions physiologiques contrôlées et régulées, comme la cicatrisation (Moses et al., 1996) ou le vieillissement (Jacob, 2003), mais elle peut aussi résulter d'un dérèglement, à l'origine de diverses pathologies telles que le cancer ou encore la fibrose. (Brilla et al., 1992; Hornebeck et al., 2002). La MEC cutanée est constituée des quatre familles de molécules, les protéoglycanes, les glycoprotéines, les collagènes et l'élastine.

1. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des macromolécules complexes, composées d'un corps protéique sur lequel se lient de façon covalente une à plusieurs chaînes de glycosaminoglycane (GAG) formés de résidus osidiques. Tous les GAGs sont liés à une protéine et adoptent ce type de structure hormis le hyaluronane qui est non lié. De par la présence de groupes sulfatés et carboxylate, les GAGs sont des molécules chargées négativement et ont la capacité de fixer de nombreuses molécules d'eau. L'hydratation que les protéoglycanes confèrent aux tissus est essentielle pour ceux qui subissent de fortes variations de pression (Jacob, 2006). Les protéoglycanes peuvent être séparés en trois groupes : les protéoglycanes des membranes basales, les hyalectanes et les petits protéoglycanes riches en leucine. Ces trois groupes de protéoglycanes se différencient dans leur localisation, leur fonction et leur composition en GAGs. Les protéoglycanes participent à de nombreux processus biologiques. Ils sont impliqués dans l'organisation tissulaire, dans la croissance cellulaire et la maturation des tissus spécialisés. Ils sont également connus pour jouer un rôle de filtre biologique, pour moduler l'activité des facteurs de croissance et réguler la fibrillogenèse des collagènes (Kalamajski and

Oldberg, 2010). Ils interviennent également dans un contexte plus pathologique en affectant l'invasion et la croissance cellulaire tumorale notamment en régulant des facteurs de croissance tels que le TFG-β, bFGF, et d'autres ou encore la prolifération (Iozzo, 1998).

Les protéoglycanes et les GAGs de la peau sont nombreux et participent à l'hydratation, à la résistance et à l'élasticité de la peau. Parmi eux, nous retrouvons l'acide hyaluronique qui est synthétisé en abondance dans l'épiderme et le derme (Nusgens, 2010). Le sulfate de chondroitine, le sulfate de dermatane, le sulfate de kératane, et l'héparine sont les principaux GAGs qui, liés à des protéines, forment les protéoglycanes de la peau (Poggi et al., 1999; Waller and Maibach, 2006). L'ensemble des protéoglycanes et des GAGs de la peau sont synthétisés en grande partie par les fibroblastes et les kératinocytes (Azevedo et al., 2007).

2. Les glycoprotéines

Les glycoprotéines matricielles sont des protéines sur lesquelles sont liés des groupements glucidiques et qui possèdent des structures et des fonctions variées. Ces protéines jouent un rôle très important dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice. Elles sont, par conséquent, impliquées dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire. Les glycoprotéines les plus connues sont la fibronectine, les fibrillines, les ténascines, les laminines et les trombospondines (Halper and Kjaer, 2014). Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous focaliserons principalement sur les glycoprotéines composant les microfibrilles des fibres élastiques qui seront détaillées dans la partie « C.2.a Fibres élastiques » page 32.

3. Les collagènes

Les collagènes représentent la famille de protéines matricielles la plus abondante de l'organisme humain avec environ 30% des protéines totales. Ces protéines peuvent représenter jusqu'à 80% des protéines de la MEC selon le tissu. La superfamille des collagènes est très complexe. Elle montre une grande diversité dans leur organisation moléculaire et supramoléculaire, leur distribution tissulaire et dans leurs fonctions biologiques (Ricard-Blum, 2011). D'une manière générale, ils jouent un rôle dans l'intégrité biologique et structurale de différents tissus et organes incluant les os, la peau, les vaisseaux sanguins et d'autres (Kolácná et al., 2007). Cependant, tous les membres de cette famille partagent une caractéristique structurale commune qu'est la présence d'au moins un domaine triple hélice. Cette structure hélicoïdale particulière est due à la succession de résidus $(G\text{-}X\text{-}Y)_n$, X et Y étant respectivement une proline (40% des cas) et une hydroxyproline (10% des cas) (Ricard-Blum and Ruggiero,

2005). Le domaine triple hélice des collagènes est constitué de chaînes α formées de structures polypeptidiques reliées entre elles par des liaisons hydrogène inter-chaînes. Plusieurs conformations supramoléculaires sont possibles, les trois chaînes α pouvant être identiques et formant ainsi un homotrimère ou seulement deux chaines sont identiques (2 chaînes α1) et la troisième diffère (chaîne α2) formant ainsi un hétérotrimère. Les chaînes α sont caractéristiques de chaque type de collagène donnant par exemple pour l'homotrimère du collagène de type III [$\alpha1(III)_3$] (Shoulders and Raines, 2009). Cette organisation supramoléculaire est responsable de la grande stabilité thermique et de la résistance mécanique des collagènes. A ce jour, on connaît 28 types de collagènes différents numérotés de I à XXVIII chez les Vertébrés (Gordon and Hahn, 2010). Dans la peau, on retrouve majoritairement du collagène de type I, bien que du collagène de type IV soit également présent dans les membranes basales telles que la jonction dermo-épidermique et les vaisseaux sanguins.

4. L'élastine

L'élastine est la deuxième protéine fibreuse majoritaire de la MEC dans les tissus présentant des propriétés élastiques importantes. Elle est synthétisée en abondance dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques dont la peau fait partie. Elle est également présente dans d'autres tissus et organes comme les poumons ou les artères. Cette protéine est décrite en détails dans les partie C et D.

C. Les fibres élastiques

1. La fibre élastique

La résilience des tissus des Vertébrés est due à la présence de fibres élastiques dans leur espace extracellulaire. Ces fibres élastiques sont synthétisées en abondance dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques où la résilience est essentielle. Ces propriétés élastiques sont indispensables au bon fonctionnement des artères, qui sont soumises à des cycles répétés d'extension et de retour à leur structure d'origine, des poumons, de la peau et d'autres tissus dynamiques (Kielty et al., 2002). Comme le montre la Figure 4, la fibre élastique est issue d'un assemblage macromoléculaire dont le composé principal et central est l'élastine, une protéine insoluble de la MEC. C'est elle qui assure l'élasticité des fibres. Elle y est entourée d'un manteau de microfibrilles riche en fibrillines (Duca et al., 2004; Kielty et al., 2002; Wagenseil and Mecham, 2007).

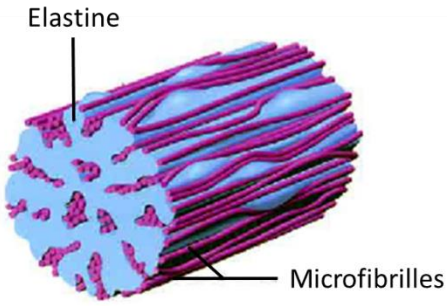


Figure 4. Représentation schématique d'une fibre élastique. Le coeur d'élastine (en bleu) est entouré par un manteau de microfibrilles (en violet).

L'élastine est une protéine insoluble, amorphe, hydrophobe et extrêmement réticulée dont l'expression et l'organisation dépendent du tissu comme le montre la figure 4 (Mithieux and Weiss, 2005). En effet, l'élastine et, plus généralement, les fibres élastiques se présentent sous forme de fibres individualisées dans la peau, de fibres entrelacées dans les ligaments, de lames élastiques dans l'aorte ou bien en nid d'abeille dans le cartilage (Figure 5).

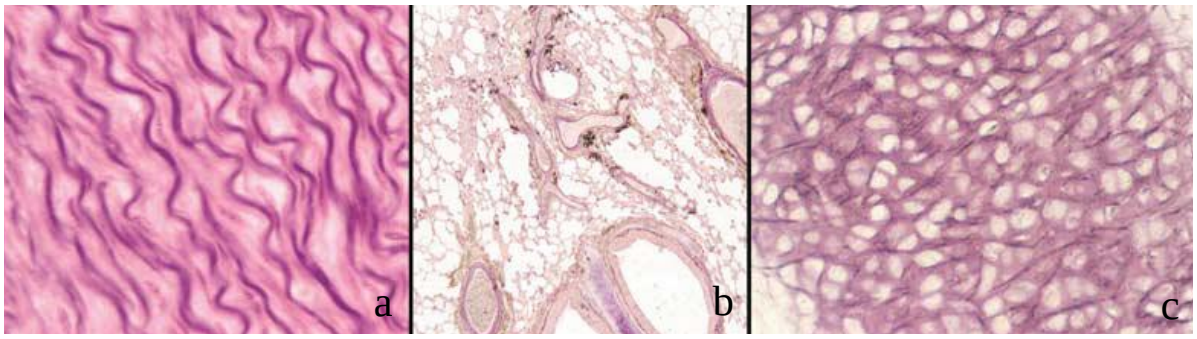


Figure 5. Organisation tissu-dépendante des fibres élastiques. **a.** Lame élastique de l'aorte, **b**. Lattices dans les poumons et **c.** Nid d'abeille dans le cartilage (Mithieux and Weiss, 2005).

Les fibres élastiques peuvent avoir des dénominations différentes selon la proportion d'élastine présente dans ces fibres. Les fibres contenant peu ou pas d'élastine sont nommées fibres oxytalanes. Les fibres possédant un taux faible d'élastine sont appelées fibres d'élaunine et les fibres possédant plus de 90% d'élastine sont dénommées fibres élastiques (Kielty et al., 2002). La peau constitue un bon exemple de la variabilité de ces fibres élastiques. En effet, le tissu cutané a la particularité de posséder chacune de ces fibres d'élastine comme le montre la Figure 6. Les fibres oxytalanes et d'élaunine se trouvent respectivement dans le derme papillaire au niveau des crêtes dermiques et au début du derme réticulaire. Ces deux types de fibres sont orientées perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique. Contrairement aux fibres

précédentes, les fibres élastiques sont majoritairement retrouvées au niveau du derme réticulaire profond et sont orientées parallèlement à la surface de la peau ainsi qu'à la jonction dermo-épidermique (Naylor et al., 2011).

Les fibres élastiques sont synthétisées au cours de l'élastogenèse qui désigne l'ensemble des processus cellulaires et extracellulaires conduisant à l'assemblage des fibres élastiques fonctionnelles. L'élastogenèse débute au stade fœtal et atteint un pic à la naissance ; par la suite, ce processus subit un ralentissement jusqu'à la puberté et devient quasi nul au-delà (Swee et al., 1995; Uitto et al., 1991).

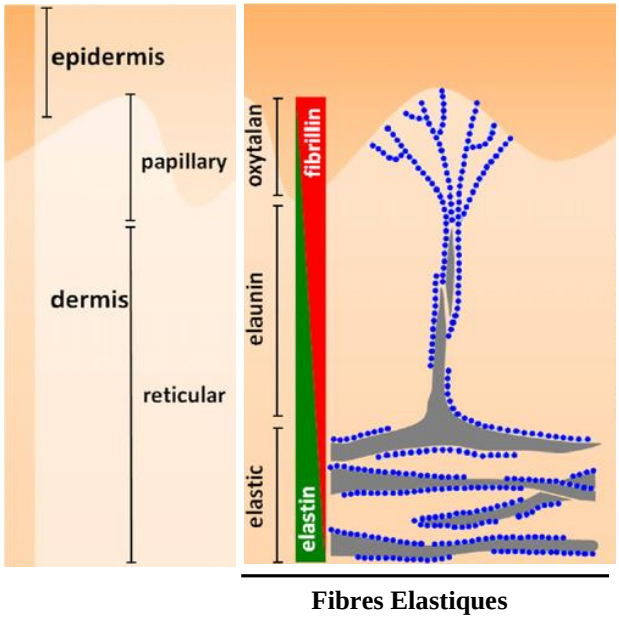


Figure 6. Les fibres élastiques de la peau (Naylor et al., 2011). Les fibres oxytalanes et d'élaunine se trouvent respectivement dans le derme papillaire au niveau des crêtes dermiques et au début du derme réticulaire. Ces deux types de fibres sont orientées perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique. Contrairement aux fibres élastiques qui sont majoritairement retrouvées au niveau du derme réticulaire profond et sont orientées parallèlement à la surface de la peau.

2. Organisation des fibres élastiques

Les fibres élastiques sont des assemblages macromoléculaires très complexes constitués majoritairement d'un cœur d'élastine entouré de microfibrilles.

a) Les microfibrilles

Les microfibrilles sont des structures composées de glycoprotéines matricielles. Elles s'associent à l'élastine et participent à la formation de la fibre élastique mature. En effet, les

microfibrilles facilitent l'alignement des monomères de tropoélastine avant que ceux-ci ne soient liés de façon covalente à la fibre élastique en cours de formation suite à l'action des lysyl oxydases (LOX) (Kielty et al., 2002). Les microfibrilles permettent également de lier les cellules aux fibres élastiques dans la MEC. Les microfibrilles sont constituées principalement de fibrillines qui s'associent avec les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP), les fibulines et l'émiline-1 (Wagenseil and Mecham, 2007).

(1) Les fibrillines

Les fibrillines sont des glycoprotéines de 350 kDa riches en cystéine et constituent l'élément structural majeur des microfibrilles (Sakai et al., 1986). Actuellement trois fibrillines ont été identifiées, les fibrillines-1, -2 et -3 (Maddox et al., 1989). La structure primaire des fibrillines est constituée de domaines "calcium-binding epidermal growth factor-like" lesquels adoptent une structure en « spindle » en présence de calcium (Knott et al., 1996). Les fibrillines possèdent des séquences de type "RGD" (Arginine, Glycine, Aspartate), lesquelles interagissent avec les intégrines (Jovanovic et al., 2007; Sakamoto et al., 1996), et des domaines de liaison héparine interagissant avec des protégoglycanes du type héparane sulfate de surface (Ritty et al., 2003). Au travers de ces interactions, les fibrillines jouent un rôle important dans la migration cellulaire, l'adhérence cellulaire, la signalisation et les interactions protéine-protéine. Les fibrillines participent également à la liaison et à la séquestration de facteurs de croissance tel que le TGF-β dans la MEC (Davis and Summers, 2012; Taipale et al., 1996).

Les trois fibrillines connues (-1,-2 et -3) sont codées respectivement par les gènes FBN1, FBN2 et FBN3.

La fibrilline-1 est codée par le gène FBN1, localisé sur le chromosome 15q15-21 (Magenis et al., 1991; Yeh et al., 1994), c'est un composé essentiel de la MEC qui est associé à la bonne organisation du tissu élastique (Mariencheck et al., 1995; Ritty et al., 2003; Wagenseil and Mecham, 2007). Par ailleurs, les mutations dans le gène FBN-1 entraînent une perturbation du tissu conjonctif et causent le syndrome de Marfan, une maladie autosomale (Dietz and Pyeritz, 1995; Robinson and Godfrey, 2000). Cette pathologie provoque de multiples symptômes affectant principalement les systèmes oculaire, squelettique et cardiaque (Kaitila et al., 2012).

La fibrilline-2 est codée par le gène FBN2, localisé sur le chromosome 5q23-31 (Li et al., 1993; Magenis et al., 1991). La fibriline-2 semble servir de matrice de soutien à la fibrilline-

1 dans la formation des fibres élastiques (Pereira et al., 1997). En effet, elle peut se lier à la fibrilline-1 par sa région N-terminale (Lin et al., 2002). Les mutations de la fibrilline-2 mènent à une arachnodactylie congénitale avec contractures, provoquant des symptômes semblables au syndrome de Marfan (Tunçbilek and Alanay, 2006).

La découverte de la fibrilline-3 est relativement récente ce qui explique le peu de données disponibles dans la littérature. Néanmoins, nous savons que la fibrilline-3 est codée par le gène FBN3 du chromosome 19p13.3-13.2 (Urbanek et al., 2007). Tout comme le fibrilline-2, la fibrilline-3 est exprimée au cours du développement embryonnaire (Quondamatteo et al., 2002). Isolée pour la première fois à partir du cerveau (Nagase et al., 2001), elle sera ensuite retrouvée au niveau du poumon, des reins, de la peau, des muscles et dans le périchondre fœtal (Corson et al., 2004; Sabatier et al., 2011).

(2) Les MAGPs

Les MAGPs également appelées *« microfibril-associated glycoproteins »* sont des petites glycoprotéines d'environ 20 kDa impliquées dans la structuration des microfibrilles. A ce jour, seuls deux membres ont été décrits, MAGP-1 et MAGP-2 (Wagenseil and Mecham, 2007). Toutes deux sont associées aux microfibrilles contenant des fibrillines et jouent un rôle essentiel en participant au maintien de l'intégrité structurale des microfibrilles (Gibson et al., 1998; Henderson et al., 1996).

MAGP-1 est une glycoprotéine de 31 kDa (183 résidus) liant l'élastine. Elle possède deux domaines distincts : un domaine N-terminal acide, riche en proline qui comporte un regroupement de glutamine, et un domaine C-terminal chargé positivement possédant 13 résidus cystéine (Kielty et al., 2002). MAGP-1 est localisée dans les zones globulaires des microfibrilles et est liée aux fibrillines par un pont disulfure et des liaisons croisées (Henderson et al., 1996). MAGP-1 peut lier à la fois la tropoélastine et les fibrillines. En effet, l'interaction MAPG-1 avec la région N-terminale de la fibrilline-1 est impliquée dans le processus d'assemblage des microfibrilles. La liaison de MAGP-1 à la tropoélastine peut servir à stabiliser l'interaction entre les microfibrilles et l'élastine dans les étapes tardives de la formation des fibres élastiques (Jensen et al., 2001; Rock et al., 2004).

MAGP-2 est une glycoprotéine matricielle de 25kDa (173 résidus) localisée dans des microfibrilles associées à l'élastine dans de nombreux tissus tels que les poumons, les ligaments, l'aorte et dans d'autres tissus dépourvus d'élastine comme les reins, le muscle

squelettique ou le cœur (Gibson et al. 1998). MAPG-2 est structuralement proche de MAPG-1 principalement dans la région centrale de 60 acides aminés. En dehors de cette région commune, MAGP-2 est riche en résidus sérine et thréonine et contient un motif RGD impliqué dans la liaison aux intégrines tels que l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (Gibson et al., 1999; Kielty et al., 2002). Bien que MAGP-1 et MAGP-2 soient structuralement proches, MAGP-2 montre une localisation et une expression développementale plus restreinte (Gibson et al., 1998). MAGP-2 participe à l'assemblage des microfibrilles et des fibres élastiques (Lemaire et al., 2007), alors que MAGP-1 participe principalement à l'intégrité structurale des microfibrilles (Segade et al., 2002).

(3) Les protéoglycanes

Comme nous l'avons décrit précédemment dans ce manuscrit, les protéoglycanes (PG) sont constitués d'un corps protéique sur lequel sont greffées plusieurs chaînes de GAGs. Plusieurs PGs jouent un rôle important dans l'interaction avec les microfibrilles, contribuant ainsi à leur intégration au niveau de la fibre élastique au sein de la MEC (Baccarani-Contri et al., 1990). Parmi eux, deux membres de la famille des petits PGs riches en leucine, le biglycane et la décorine, sont retrouvés dans le derme au sein des fibres élastiques. Le biglycane entre dans la composition du cœur d'élastine et la décorine dans celle des microfibrilles (Kielty et al., 2002). L'utilisation d'approches ultrastructurales a permis de montrer que les PGs à chondroïtine sulfate sont associés aux régions globulaires des microfibrilles (Kielty et al., 1996). Il a également été décrit que le versicane intervient dans l'organisation globulaire des microfibrilles suite à l'interaction avec ces dernières (Zimmermann et al., 1994).

(4) Les autres molécules

D'autres protéines que celles décrites précédemment interviennent dans la formation des fibres élastiques. Ces molécules participent principalement au dépôt de la tropoélastine sur les microfibrilles et à connecter les fibres élastiques avec la surface cellulaire.

Les fibulines sont des protéines de 50 à 200 kDa possédant des domaines de type EGF liant le calcium suivis d'un domaine C-terminal de type fibuline (Argraves et al., 2003; Timpl et al., 2003). Cinq membres composent la famille : la fibuline-1, -2, -3, -4 et -5 (Argraves et al., 2003; Kobayashi et al., 2007). Cependant seulement quatre sont fortement impliqués dans la biologie de la fibre élastique : les fibulines-1, -2, -4 et -5 (Kielty et al., 2002). La fibuline-1 est localisée dans le cœur amorphe de la fibre élastique mais pas dans les microfibrilles riches en fibrillines (Kostka et al., 2001). La fibuline-2 lie fortement la tropoélastine et est localisée

préférentiellement à l'interface microfibrilles-cœur d'élastine. Dans certains tissus tels que la peau, elle colocalise avec la fibrilline-1 (Sasaki et al., 1999). Plus récemment, l'utilisation d'un modèle murin déficient pour le gène de la fibuline-2 a démontrée que cette dernière n'est pas indispensable à la formation des fibres élastiques (Sicot et al., 2008). La fibuline-4 lie la tropoélastine et joue un rôle essentiel dans l'assemblage des fibres élastiques au cours du développement (McLaughlin et al., 2006). Tout comme la fibuline-4, la fibuline-5 participe à l'assemblage des fibres élastiques. L'importance de la fibuline-5 a été démontrée dans l'élastogenèse au travers de l'utilisation de souris déficientes (*FBLN5*$^{-/-}$) conduisant au développement anormal des fibres élastiques (Choi et al., 2009; Kobayashi et al., 2007; Nakamura et al., 2002; Yanagisawa et al., 2002).

L'émiline est une protéine que l'on trouve à l'interface élastine-microfribrilles et fibre élastique-surface cellulaire. C'est une glycoprotéine de 136 kDa localisée dans les fibres élastiques (Bressan et al., 1993; Doliana et al., 1999). Quatre membres sont identifiés dans la famille : les émiline-1, -2, -3 et -4 (ou multimérine). Toutes possèdent une longue région centrale en « coiled-coil » (Colombatti et al., 2000). Les émiline-1 et -2 possèdent un court domaine en triple hélice et un domaine de trimérisation en C-terminal similaire aux domaines C1q et NC1 des collagènes de type VIII et X (Kielty et al., 2002). A l'heure actuelle, l'émiline-1 est le seul membre de la famille décrit comme associé à la formation des fibres élastiques (Zanetti et al., 2004).

b) Le cœur d'élastine

Le cœur d'élastine des fibres élastiques est composé d'élastine, le polymère insoluble de la tropoélastine. Cette dernière est une protéine matricielle de 60-70 kDa composée de domaines lysine, contenant des liaisons croisées, alternés de domaines hydrophobes responsables de l'élasticité de l'élastine (Debelle and Alix, 1999). L'élastine est un bio-polymère insoluble dans tous les solvants possédant une forte hydrophobie ainsi qu'une très grande résistance aux dégradations chimiques, physiques et enzymatiques. A l'inverse, son monomère la tropoélastine est soluble. La stabilité de l'élastine est due à la formation des liaisons croisées, intra- et inter-chaînes, formées à partir des lysines des monomères de tropoélastine suite à l'action des lysyl oxydases (LOX) (Mithieux and Weiss, 2005).

La synthèse, la sécrétion, l'assemblage et la régulation de l'élastine sont décrits en détail dans la partie D.

D. L'élastine

La formation des fibres élastiques exige la coordination de plusieurs processus complexes. Ces derniers impliquent une régulation intracellulaire au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, la sécrétion extracellulaire et l'assemblage des monomères de tropoélastine au site d'élastogenèse, suivis de la maturation de la fibre élastique impliquant l'association des microfibrilles et la formation des liaisons croisées (Figure 7).

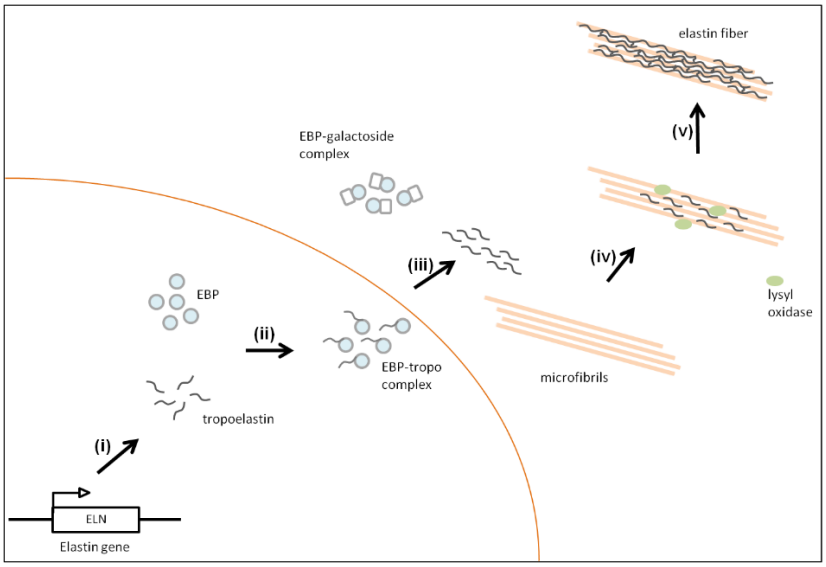


Figure 7. Représentation schématique des étapes de l'élastogenèse. (i) La tropoélastine est transcrite et traduite à partir du gène de l'élastine ELN puis (ii) transportée à la membrane plasmique par l'EBP. (iii) La tropoélastine est relarguée et agrégée à la surface cellulaire. (iv) L'agrégat de tropoélastine est oxydé par les lysyl oxydases menant à de l'élastine réticulée, s'accumule sur l'échaffaudage de microfibrilles, participant à l'assemblage correct de la fibre élastique mature en cours de formation (v). (Nivison-Smith and Weiss, 2011)

1. Structure du gène de l'élastine

La tropoélastine humaine est codée par un gène unique localisé sur le chromosome 7 dans la région 7q11.2 (Fazio et al., 1991). Après traduction, le transcrit primaire donne naissance à un polypeptide de 70 kDa nommé tropoélastine qui correspond au précurseur soluble de l'élastine insoluble (Fazio et al., 1991; Perrin and Foster, 1997). Le transcrit primaire de 40 kb contient de petits exons insérés entre de longs introns donnant un ratio intron/exon exceptionnellement faible (19:1) (Bashir et al., 1989; Piontkivska et al., 2004). Cette séquence code pour un ARNm de 3,5 kb, lequel comprend un segment codant de 2,2 kb et une région 3', relativement grande et non traduite, de 1,3 kb (Rosenbloom et al., 1991). La tropoélastine contiendrait 36 exons mais, suite à l'évolution des primates, les exons 34 et 35 ont été perdus. Actuellement, la tropoélastine humaine contient 34 exons. Néanmoins, ces deux exons

persistent dans le génome des bovins, du porc, du chat, du chien et de la souris (Szabó et al., 1999).

Le gène de l'élastine code pour des domaines fonctionnellement distincts hydrophobes et hydrophiles portés par des exons différents (Figure 8). Les domaines hydrophiles de la tropoélastine sont riches en lysine permettant par la suite la formation de liaisons croisées impliquées dans la stabilisation de la fibre élastique mature. Les domaines hydrophobes, composés de motifs répétés riche en glycine, valine et proline, confèrent à l'élastine ses propriétés élastiques (Mithieux and Weiss, 2005; Vrhovski and Weiss, 1998).

Le gène de la tropoélastine est connu pour comprendre au moins sept exons épissés alternativement (Indik et al, 1987). Parmi eux se trouvent : les exons 22, 23, 24, 26A, 30, 32 et 33 (Parks and Deak, 1990). Le domaine 24 du gène de la tropoélastine correspond à la zone de reconnaissance de l'EBP (Boyd et al., 1991). Bien que cet exon soit sujet à l'épissage alternatif, la présence de multiples sites de liaison de l'EBP assure que toutes les formes épissées de la tropoélastine puissent entrer dans la voie de la sécrétion (Rodgers and Weiss, 2004). L'isoforme de tropoélastine humaine la plus fréquemment retrouvée ne comporte pas de séquence codée par l'exon 26A. Cet exon est rarement exprimé, excepté dans certaines pathologies telles que l'hypertension, dans lequel il serait à l'origine des altérations des fibres élastiques observées (Debelle and Tamburro, 1999; M.J. Lipta and , M.D. Bolney, R.P. Mecham, J. Rosenbloom,J.D. Cooper, L.R. Kaiser, 1991). Le gene de l'élastine se termine par un domaine C-terminal essentiel au cours de l'élastogenèse et qui se termine par la sequence RKRK correspondant au domaine de liaison des intégrines (Bax et al., 2009; Brown et al., 1992). Trois pathologies humaines sont associées à des altérations génétiques du gène de l'élastine : les *cutis laxa*, la sténose aortique supra-valvaire et le syndrome de Williams-Beuren.

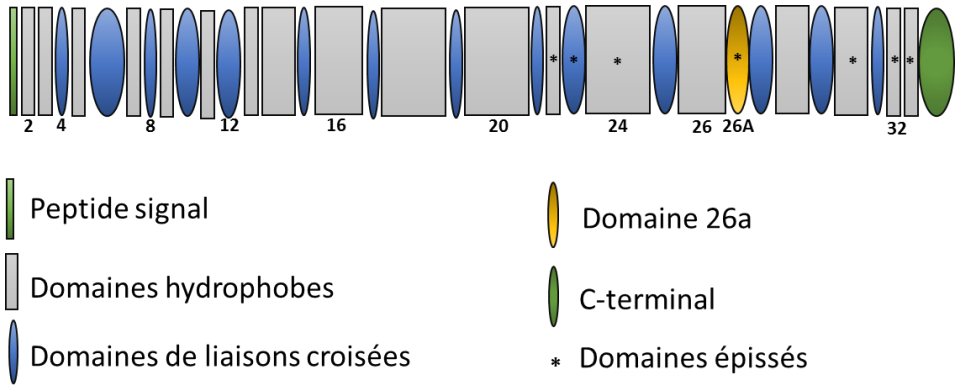


Figure 8. Structure en domaines du gène de la tropoélastine humaine. Le gène de la tropoélastine contient 34 domaines comprenant une alternance d'exons hydrophobes et hydrophiles. Les domaines hydrophiles sont impliqués dans la formation de liaisons croisées au cours de la maturation des fibres élastiques. Les exons 22, 23, 24, 26A, 30, 32 et 33 sont sujets à un épissage alternatif au cours de la maturation de l'ARN prémessager(Bashir et al., 1989).

2. Régulation de la transcription de la tropoélastine

L'élastogenèse se produit principalement pendant les périodes fœtale et néonatale précoce. L'élastine est synthétisée et sécrétée à partir de plusieurs types cellulaires incluant les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les chondroblastes et les cellules mésothéliales (Uitto et al., 1991), avec une expression tissu-spécifique de l'élastine au cours du développement (Swee et al., 1995). Une fois l'élastine déposée, sa synthèse cesse ; elle est très peu renouvelée au cours de la vie d'un adulte, exposant ainsi les fibres élastiques aux altérations. Le gène de l'élastine est contrôlé par plusieurs élèments. Le promoteur du gène humain présente à la fois des sites de régulations positifs et négatifs (Rosenbloom et al., 1991). La région 5' flanquante du gène possède des séquence promotrices CAAT (Bashir et al., 1989; Fazio et al., 1990). Cette région promotrice montre de multiples sites de liaison pour des facteurs de transcription SP1 et AP-1 et -2 (Hämäläinen et al., 1993). De plus, huit points d'initiation à la transcription ont été décrits, indiquant que l'expression de la tropoélastine est modulée par un mécanisme complexe (Bashir et al., 1989; Rosenbloom et al., 1991, 1993). Une baisse de l'expression de l'élastine est observée au cours de la période post-natale ce qui suggère des mécanismes post-transcriptionnels et transcriptionnels. En effet, des études ont permis de mettre en évidence une baisse de l'activité promoteur de la tropoélastine et des mécanismes de déstabilisation de l'ARNm (Johnson et al., 1995).La synthèse de l'élastine est régulée par divers facteurs exogènes impliqués soit dans la stabilisation de l'ARNm ou dans la régulation de la synthèse (Perrin and Foster, 1997). En effet, les membres de la famille du nuclear factor-1 (NF-1) module la transcription du gène de l'élastine en régulant l'activité promotrice (Degterev and Foster, 1999). L'*insulin-like growth factor-1*(IGF-1) module

l'élastogenèse en stimulant la transcription et le niveau d'ARNm de la tropoélastine (Conn et al., 1996; Wolfe et al., 1993). Le *basic fibroblast growth factor* (bFGF) et le *tumor necrosis factor* (TNF) inhibent la transcription du gène de la tropoélastine en modulant l'activité promotrice impliquant le complexe AP-1/Fos/Jun (Carreras et al., 2002; Kähäri et al., 1992; Rich et al., 1999). L'interleukine-1β diminue la transcription du gène de la tropoélastine *via* l'activation de NFκB (Mauviel et al., 1993) alors que l'interleukine-10 la stimule et potentialise les effets du TGF-β, impliqué dans la stabilisation de l'ARNm de l'élastine (Reitamo et al., 1994).

3. Sécrétion de la tropoélastine

Après l'épissage de l'ARNm mature de la tropoélastine, ce dernier est exporté en dehors du noyau. La traduction se produit à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER) formant ainsi un polypeptide de 70 kDa avec une séquence signal de 26 acides aminés qui est clivée lorsque la protéine entre dans la lumière du RER (Grosso and Mecham, 1988). Après relargage du peptide signal, la protéine est transportée jusqu'à l'appareil de Golgi. La tropoélastine est chaperonnée par une protéine liant l'élastine nommée EBP (*Elastin Binding Protein*) limitant ainsi l'auto-agrégation intracellulaire et la dégradation prématurée de cette dernière (Hinek, 1995; Hinek and Rabinovitch, 1994). La tropoélastine est ensuite transportée à la surface de la membrane plasmique grâce à son interaction avec l'EBP (Hinek et al., 1995).

4. Incorporation de la tropoélastine aux fibres élastiques

Après la sécrétion de la tropoélastine et de l'EBP à la surface membranaire, cette dernière s'assemble aux sous-unités Neu-1 et PPCA formant ainsi le complexe récepteur de l'élastine (CRE) fonctionnel. L'activité sialidase de Neu-1 induit la désialylation des glycoprotéines constitutives des fibres élastiques en cours de synthèse provoquant l'accès aux résidus galactosyls. Ainsi, ces galactosides se lient au site galactolectine de l'EBP entraînant la libération du monomère de tropoélastine suite à une diminution de l'affinité de l'EBP pour cette dernière. La tropoélastine libre est ensuite incorporée au réseau de microfibrilles présent au niveau du site de formation des fibres élastiques (Privitera et al., 1998). Après relarguage de la protéine, l'EBP est recyclée dans une vésicule endosomale intracellulaire et peut de nouveau accompagner une molécule de tropoélastine néosynthétisée (Hinek et al., 1995) (Figure 9).

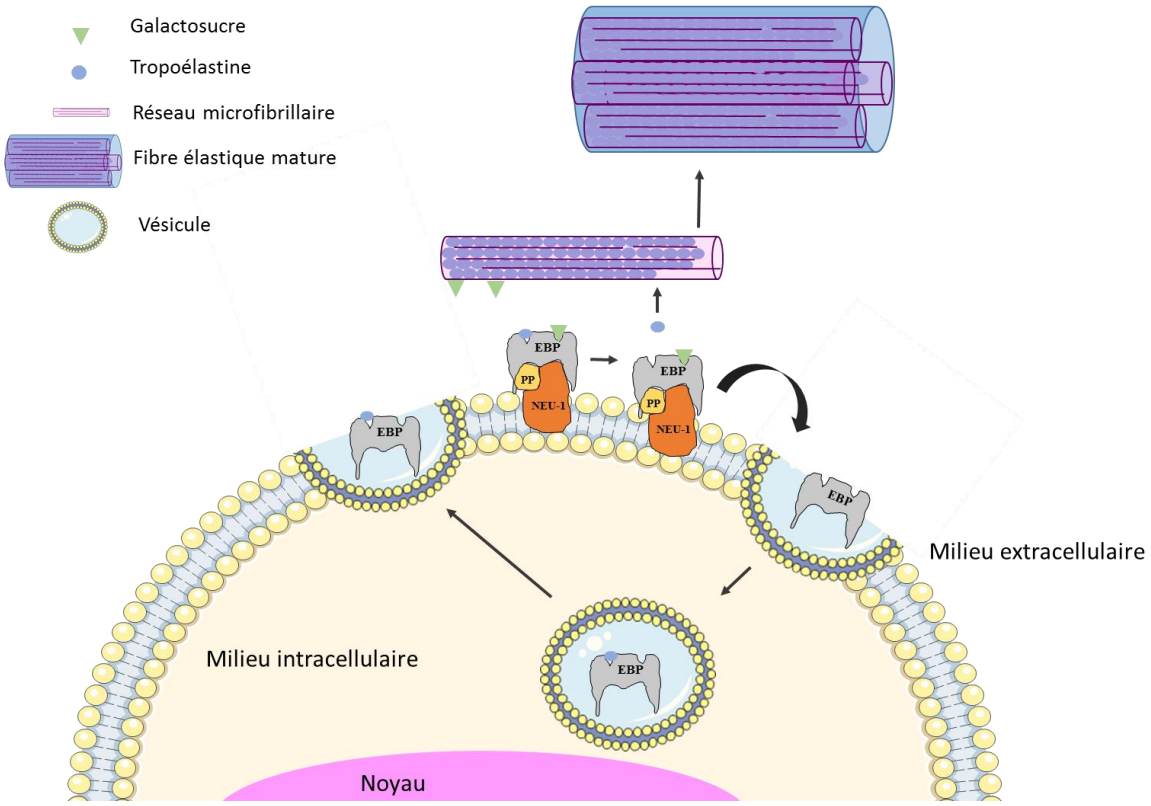


Figure 9. Représentation schématique de l'incorporation de la tropoélastine aux fibres élastiques matures. La tropoélastine est transportée par l'EBP à la surface cellulaire où l'EBP interagit avec deux autres protéines, la neuraminidase-1 et PPCA, pour former le complexe récepteur de l'élastine (CRE). La désialylation des glycoprotéines constitutives des fibres élastines par la neuraminidase-1 entraîne l'accès aux galactosides. La liaison de ces galactosides provenant des microfibrilles au site galactolectine de l'EBP entraine une diminution de l'affinité de l'EBP pour la tropoélastine induisant son relargage au site de formation des fibres élastiques. Le réseau microfibrillaire permet une bonne orientation de la tropoélastine et participe à l'élongation correcte des fibres élastiques **(**Hinek et al., 1995**)**.

L'incorporation de la tropoélastine nouvellement déposée au réseau microfibrillaire lui confère une orientation correcte pour l'assemblage aux fibres élastiques en cours de formation. Cette interaction est stabilisée de manière covalente par la formation de liaisons croisées spécifiques médiée par une transglutaminase entre la fibrilline-1 et les domaines hydrophiles de la tropoélastine (Rock et al., 2004) et améliorée par la liaison calcium dépendante des MAGP-1 à la tropoélastine (Clarke and Weiss, 2004). La région C-terminale de la tropoélastine joue un rôle central dans le dépôt du monomère au polymère d'élastine en cours de formation (Brown-Augsburger et al., 1996; Kozel et al., 2003). Les deux processus majeurs, essentiels à l'incorporation de la tropoélastine à la fibre élastique en croissance, sont la coacervation et la réticulation.

5. La coacervation de la tropoélastine

La coacervation est un mécanisme moléculaire impliqué dans l'association et l'alignement des monomères de tropoélastine dans le but de faciliter la formation de liaisons croisées entre les lysines rapprochées (Rapaka and Urry, 1978). La coacervation est une transition de phase inverse au cours de laquelle les molécules de tropoélastine s'agrègent avec l'augmentation de la température. C'est un processus réversible qui implique des interactions entre les domaines hydrophobes de la tropoélastine. Les molécules d'eau forment des liaisons hydrogènes qui s'arrangent en une configuration ordonnée dite « clathrate » autour des régions hydrophobes. Lorsque la température augmente, la structure « clathrate » se désorganise rendant ainsi les domaines hydrophobes libres de se replier et d'interagir entre eux, notamment au travers des séquences répétées GVGVP, GGVP et GVGAP, pour former un coacervat (Vrhovski and Weiss, 1998). La coacervation optimale de la tropoélastine s'effectue à 37°C, 150 mM de NaCl, pH = 7-8. Ce processus moléculaire est une étape essentielle dans la fibrillogenèse de l'élastine (Vrhovski et al., 1997).

6. Formation des liaisons croisées de l'élastine

Les molécules de tropoélastine sont liées de façon covalente dans l'espace extracellulaire suite à l'action d'amine oxydases dépendantes du cuivre nommées lysyl oxydases (LOX) (Noblesse et al., 2004). Les LOX catalysent la déamination oxydative des groupements NH_2-ε des résidus lysine de la tropoélastine (Kagan and Sullivan, 1982) conduisant à la formation d'aldéhydes très réactifs tels que l'allysine, précurseur des liaisons covalentes intra- et inter-moléculaires retrouvées dans l'élastine. Ces liaisons sont formées par la condensation spontanée non enzymatique d'allysine à allysine ou avec d'autres résidus lysyl non modifiés. Cette modification post-traductionnelle est essentielle aux fonctions de l'élastine et permet sa réticulation (Clarke et al., 2006; Debelle and Tamburro, 1999; Kagan and Cai, 1995; Umeda et al., 2001). Il existe différents types de liaisons croisées, les liaisons bi-fonctionnelles, incluant les allysine-aldols et la lysinonorleucine, les tri-fonctionnelles mérodesmosine, et les tétra-fonctionnelles regroupant la desmosine et l'isodesmosine (Partridge et al., 1964; Reiser et al., 1992; Vrhovski and Weiss, 1998).

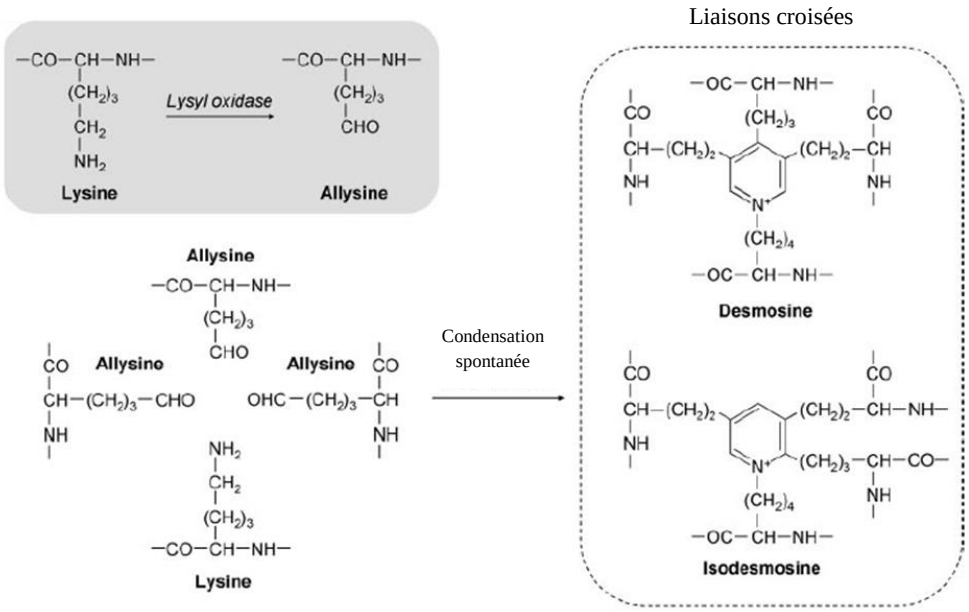


Figure 10. Formation des liaisons croisées de l'élastine. D'après Oitate et al., 2007.

Dans la tropoélastine humaine, il existe deux types de domaines impliqués dans la formation des liaisons croisées. Tous deux enrichis en lysine, ils présentent des caractéristiques différentes. Les premiers, nommés domaines KA, présentent des résidus de lysine typiquement regroupés par deux ou trois, séparés par deux ou trois résidus d'alanine et formant une structure en hélice α facilitant la formation de la liaison croisée entre les lysines de type tétra-fonctionnelles (Brown-Augsburger et al., 1995). Les domaines KA sont codés par les exons 6, 15, 17, 19, 21, 3, 25, 27, 29 et 31. L'autre type de domaine impliqué dans les liaisons croisées est le domaine KP, codé par les exons 4, 8, 10 et 12. Dans ces domaines KP, les paires de lysine sont séparées par une ou plusieurs proline impliquant une contrainte stérique ne permettant pas la formation d'une structure hélicoïdale (Brown-Augsburger et al., 1995). D'autres résidus lysine impliqués potentiellement dans les liaisons croisées de l'élastine sont retrouvés dans les domaines 13, 14 et 36.

Après modification par les LOX, la tropoélastine est incorporée au réseau élastique par polymérisation irréversible induisant la croissance de la fibre élastique (Debelle and Tamburro, 1999). Par ailleurs, l'inhibition de cette enzyme provoque une baisse drastique du nombre de liaisons croisées au sein de l'élastine et une accumulation importante de tropoélastine au sein du tissu, démontrant le rôle essentiel de la LOX dans l'élastogenèse (Tinker et al., 1990).

7. L'élastine mature

L'élastine mature est un polymère insoluble constitué de molécules de tropoélastine liées les unes aux autres par des liaisons croisées (Vrhovski and Weiss, 1998). Les propriétés élastiques de l'élastine résident dans l'hydratation de cette dernière bien qu'elle soit hydrophobe. En effet, les mécanismes d'élasticité reposent sur l'entropie de la molécule. A l'état relâché, l'entropie et l'hydratation de l'élastine sont élevées alors qu'à l'état étendu ces deux paramètres sont plus faibles. Ces propriétés physicochimiques sont à l'origine de l'élasticité de l'élastine (Debelle and Tamburro, 1999).

E. Les peptides d'élastine

1. Nature et origine

L'élastine a une demi-vie de 70 ans (Petersen et al., 2002) et est peu ou pas renouvelée au cours de la vie d'un individu (Shapiro et al., 1991). Malgré sa grande résistance physico-chimique, mécanique et enzymatique due à sa nature très hydrophobe et à sa richesse en liaisons croisées, l'élastine peut toutefois être dégradée par des élastases sécrétées dans des conditions physiologiques et pathologiques, entraînant ainsi la production de peptides dérivés de l'élastine (EDP) (Antonicelli et al., 2007; Schmelzer et al., 2012). Les métalloprotéinases (MMPs) telles que la gélatinase A (MMP-2), la gélatinase B (MMP-9), la matrilysine (MMP-7), et la métallo-élastase de macrophage (MMP-12) sont de puissantes élastases sécrétées dans diverses pathologies associées à une forte dégradation de l'élastine (Heinz et al., 2010; Hornebeck et al., 2002). De plus, au cours de l'inflammation, la sécrétion d'élastase leucocytaire et de cathepsines S et G (Aikawa et al., 2009; Boudier et al., 1981; Heinz et al., 2012) mènent à une dégradation importante du réseau d'élastine (Pardo and Selman, 1999).

Les produits de dégradation de l'élastine ne sont pas des produits inertes mais présentent des propriétés biologiques qui leur sont propres et les classent comme des matrikines, c'est-à-dire des peptides issus de la dégradation partielle de protéines matricielles et dotés d'activités biologiques distinctes de celles des protéines d'où ils proviennent (Maquart et al., 2004). Les peptides d'élastine répondant à cette définition sont aussi nommés élastokines (Duca et al., 2004).

Les peptides d'élastine peuvent être obtenus de différentes façons : par protéolyse enzymatique ou par protéolyse chimique. L'hydrolyse enzymatique s'effectue sous l'action des enzymes élastolytiques précédemment citées. Cette hydrolyse permet d'obtenir des fragments

d'élastine de séquence connue et contrôlée (Lombard et al., 2005, 2006). La dégradation chimique de l'élastine purifiée peut aussi se faire soit par l'action de l'acide oxalique ce qui produit un mélange de peptides d'élastine de 25 kDa en moyenne, appelé α-élastine (Partridge et al., 1955), soit par une hydrolyse à la potasse éthanolique aboutissant à la production d'un mélange de peptides d'élastine d'une masse moléculaire de 75 kDa en moyenne nommé κ-élastine (kE) (Jacob MP and Hornebeck W., 1985). La kE constitue un bon modèle de peptides issus de la dégradation de l'élastine purifiée et présente des effets biologiques comparables à ceux d'un hydrolysat d'élastine obtenu par les élastases (Brassart et al., 2001; Duca et al., 2007). Son analyse par spectrométrie de masse a révélée la présence de nombreux peptides bioactifs de séquence GxxPG (Blaise et al., 2013).

2. Rôle biologique des peptides d'élastine

Les propriétés biologiques des peptides d'élastine sont dues majoritairement à la présence d'une séquence consensus GxxPG (Brassart et al., 2001) qui adopte une structure en coude β de type VIII (Moroy et al., 2005). Parmi les peptides d'élastine bioactifs, le peptide VGVAPG, retrouvé six fois dans la séquence de la tropoélastine au niveau de l'exon 24, est l'un des plus étudiés (Blanchevoye et al., 2013; Blood et al., 1988; Duca et al., 2004; Pocza et al., 2007; Tajima et al., 1997). Il a également été démontré que les deux nanopeptides AGVPGPGVG et GPGVGAGVP présents dans l'élastine présentent des propriétés chimioattractantes similaires au peptide canonique VGVAPG (Long et al., 1988).

Les peptides d'élastine sont capables de moduler un grand nombre de processus cellulaires incluant le chimiotactisme (Blood et al., 1988; Senior et al., 1984), la prolifération (Chatron-Colliet et al., 2014; Ghuysen-Itard et al., 1992; Mochizuki et al., 2002; Tajima et al., 1997; Wachi et al., 1995), la synthèse de protéases (Fahem et al., 2008; Huet et al., 2002; Robinet et al., 2005; Toupance et al., 2012), l'influx d'ions (Faury et al., 1998; Jacob et al., 1987), la migration (Robinet et al., 2005), l'invasion (Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007) pour un nombre important de cellules normales et tumorales. Par ailleurs, ils modulent la réponse inflammatoire (Baranek et al., 2007; Fulop et al., 2011). Ces réponses cellulaires médiées par les EDP sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que le cancer (Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007), l'athérosclérose (Gayral et al., 2014), le diabète (Blaise et al., 2013), mais également dans des conditions physiologiques telles que le vieillissement normal (Antonicelli et al., 2007; Fulop et al., 2011).

Les peptides d'élastine démontrent également des effets bénéfiques tels que la cardioprotection (Robinet et al., 2007), le remodelage tissulaire et la cicatrisation (Antonicelli et al., 2009; Attia-Vigneau et al., 2014).

Les effets biologiques observés en présence de peptides d'élastine impliquent la fixation des peptides d'élastine à leurs récepteurs.

F. Les récepteurs de d'élastine

Le complexe récepteur de l'élastine (CRE) est le récepteur capable d'interagir avec la tropoélastine et les peptides d'élastine le mieux connu. Cependant, on leur connait d'autres récepteurs comme l'intégrine αvβ3, la galectine-3 ou encore un potentiel récepteur aux nonapeptides encore inconnu. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au récepteur CRE des peptides d'élastine et détaillerons dans une moindre mesure les autres.

1. Le complexe récepteur de l'élastine

Le complexe récepteur de l'élastine (CRE) est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires (Hinek et al., 1988). Le CRE dérive du complexe lysosomal de la β-galactosidase acide et comporte trois sous-unités : une protéine périphérique de 67 kDa liant l'élastine nommée *Elastin Binding protein* (EBP) (Privitera et al., 1998), une protéine charnière de 55kDa la *Protective Protein/Cathepsin A* (PPCA ou PP) qui permet le maintien de l'intégrité structurale du CRE et la sous-unité neuraminidase-1 (Neu-1) de 61 kDa responsable de la transduction du signal induit par les peptides d'élastine (Duca et al., 2007; Hinek et al., 2008; Mecham et al., 1989) (Figure 11).

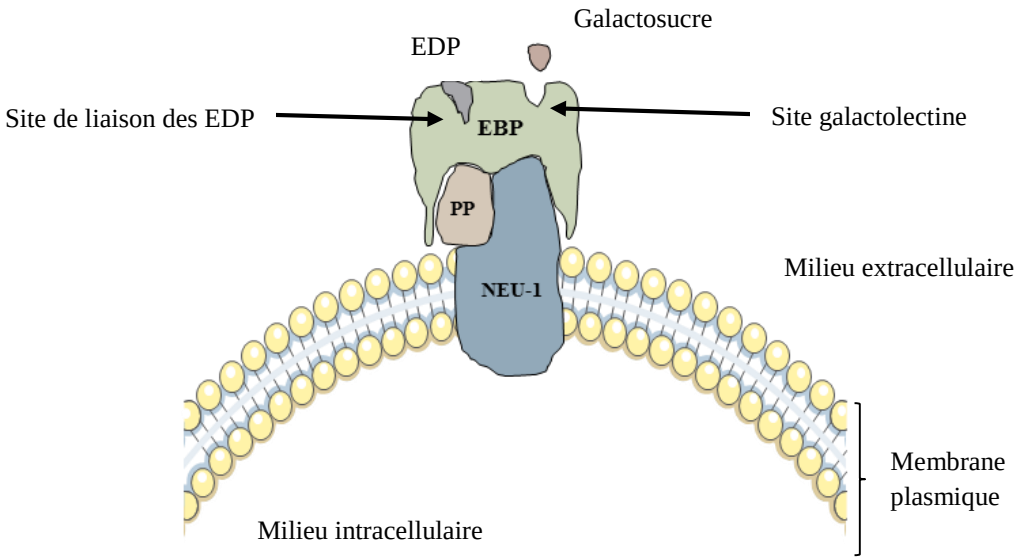


Figure 11. Représentation schématique du complexe récepteur de l'élastine. Modifié d'après L. Robert (Robert, 1997).

a) L'Elastin Binding Protein (EBP)

L'EBP est une protéine périphérique qui fixe la tropoélastine et les peptides d'élastine avec une affinité de l'ordre du nM (Wrenn et al., 1988). C'est un variant d'épissage alternatif de la β-galactosidase lysosomale dépourvu d'activité enzymatique (Hinek et al., 1993). Cet épissage alternatif entraîne une délétion des exons 3, 4 et 6 accompagnée d'un décalage du cadre de lecture de l'exon 5 restauré à partir de l'exon 7. Ces mécanismes entraînent le fait que la séquence codée par l'exon 5 est spécifique à l'EBP. Cette séquence unique de 32 résidus, nommée V32 (Figure 12) (Privitera et al., 1998), correspond au site de liaison de la tropoélastine et des peptides d'élastine sur l'EBP. Au sein de V32, la séquence VVGSPSAQDEASPL (V14) semble directement impliquée dans la liaison à l'EBP (Hinek and Rabinovitch, 1994; Moroy et al., 2009).

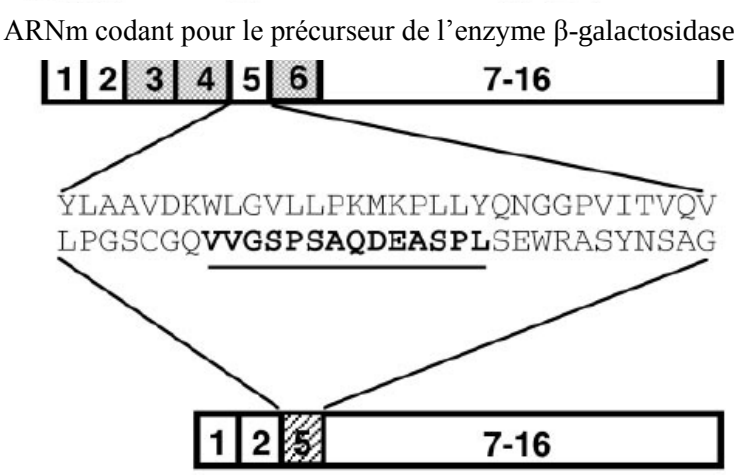


Figure 12. Représentation schématique des transcrits primaires de la β-galactosidase et de l'EBP.

L'EBP possède deux sites de liaisons distincts, l'un spécifique à l'EBP correspondant au site de fixation de la tropoélastine et des peptides d'élastine, le V32. Le second est un site galactolectine conservé de la β-galactosidase lysosomale (Hinek et al., 1988). La fixation d'un galactoside sur ce dernier conduit à une diminution de l'affinité de l'EBP vis-à-vis de la tropoélastine et des peptides d'élastine et entraîne la dissociation du CRE (Hinek et al., 1995). C'est pourquoi le lactose est couramment utilisé comme antagoniste de l'action des peptides d'élastine (Brassart et al., 2001; Hinek, 1994; Toupance et al., 2012). La modulation de l'affinité du site de liaison élastine sur l'EBP par l'occupation du site galactolectine est impliqué dans la libération de la tropoélastine à la surface de la cellule suite à son interaction avec les galactosides du réseau microfibrillaire lors la formation des fibres élastiques (Wagenseil and Mecham, 2007).

Au cours du développement fœtal et jusqu'à la puberté, le CRE est principalement impliqué dans l'élastogenèse en participant au transport de la tropoélastine au site de formation des fibres élastiques (Mithieux and Weiss, 2005). Par la suite, l'élastogenèse étant quasi nulle après cette période (Pasquali-Ronchetti and Baccarani-Contri, 1997), le CRE va jouer le rôle de récepteur matriciel pour les peptides d'élastine déclenchant ainsi un certain nombre de processus cellulaires suite à l'activation de différentes voies de signalisation (Duca et al., 2002, 2005, 2007).

b) La protective protein/ Cathepsin A (PPCA)

La protéine protectrice / Cathepsine A est une protéine synthétisée sous forme d'un zymogène de 54 kDa. Dans le lysosome, elle est clivée en deux sous-unités de 32 et 20 kDa reliées entre elles par des ponts disulfures (Hiraiwa, 1999; Morreau et al., 1992). C'est une carboxypeptidase-A qui possède une activité serine protéase. Elle est retrouvée dans le complexe lysosomal de la β-galactosidase et dans le CRE. Au sein du complexe lysosomal de la β-galactosidase, elle permet l'association et la stabilisation du complexe et joue le rôle de protéine protectrice en empêchant la dégradation protéolytique intra-lysosomale de ce complexe (Hoogeveen et al., 1983). Au sein du CRE, l'activité sérine protéase qu'elle présente n'intervient pas dans la signalisation induite par les EDP. Son rôle exact dans le CRE n'est pas encore connu mais il semble que la PPCA serve de protéine charnière permettant le maintien structural des deux autres sous-unités du CRE les protégeant ainsi d'une dégradation potentielle (Callahan, 1999).

c) La neuraminidase-1

La neuraminidase-1 appartient à la famille des neuraminidases qui comprend trois autres membres que sont la neuraminidase-2, -3 et -4. Chaque neuraminidase présente une spécificité de substrats et une localisation cellulaire qui leur sont propres (Monti et al., 2010). La neuraminidase-1 est une sialidase qui initie l'hydrolyse de sialo-glycoconjugés en clivant les résidus d'acide sialique terminaux. Neu-1 est synthétisée sous forme d'une pré-proenzyme de 45,5 kDa. Suite à plusieurs glycosylations, la protéine mature atteint un poids moléculaire allant de 48,3 à 61 kDa. On la retrouve à la membrane lysosomale où elle forme un complexe multi-enzymatique et participe à la dégradation moléculaire intralysosomale avec deux autres hydrolases, la β-galactosidase et la PPCA (Verheijen et al., 1985). La Neu-1 est également retrouvée à la membrane plasmique où, associée à la PPCA et l'EBP, elle forme le CRE. Au sein de ce complexe, elle participe activement à la transduction du signal intracellulaire induit par les peptides d'élastine (Duca et al., 2007) et est requise pour l'assemblage normal des fibres élastiques (Hinek et al., 2006; Starcher et al., 2008). De manière intéressante, son association à PPCA est primordiale pour son activité sialidase (Bonten et al., 2009a).

d) Autres récepteurs des peptides d'élastine

Le CRE n'est pas le seul récepteur des peptides d'élastine. En effet, il existe trois autres récepteurs potentiels capables d'interagir avec certaines séquences retrouvées dans l'élastine

que sont la galectine-3 (Pocza et al., 2007) et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Rodgers and Weiss, 2004) et un récepteur potentiel liant les nonapeptides encore inconnu à ce jour (Toupance et al., 2012).

La galectine-3 humaine est une protéine de 35 kDa exprimée dans les cellules normales et tumorales. Elle possède diverses fonctions biologiques associées à la réponse inflammatoire telles que la modulation de l'adhérence, la différentiation cellulaire (Argüeso and Panjwani, 2011), la migration cellulaire (Gao et al., 2014), l'angiogenèse (Machado et al., 2014), la progression tumorale (Fortuna-Costa et al., 2014; Pocza et al., 2007), la prolifération (Zheng et al., 2014), le chimiotactisme, la production de cytokines et les interactions cellule-matrice (Fermin Lee et al., 2013; Rabinovich et al., 2002). La galectine-3 est également capable d'interagir avec l'élastine soluble et insoluble de manière lactose dépendante (Ochieng et al., 2004).

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur de surface cellulaire qui régule diverses fonctions cellulaires telles que l'adhérence (Byzova et al., 1998), la prolifération, et la migration cellulaire (Cheresh and Mecham, 1994; Sriramarao et al., 1993; Vacca et al., 2001). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ reconnaît principalement ses ligands par la séquence RGD (Lanza et al., 1997) mais elle est capable de fixer d'autres ligands ne la possédant pas (Patel et al., 2012). Le domaine C-terminal de la tropoélastine peut interagir avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec une grande affinité par sa séquence RKRK (Brown et al., 1992; Brown-Augsburger et al., 1995). Cette interaction est importante dans l'élastogenèse (Patel et al., 2012). Par ailleurs, Lee et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence une nouvelle région d'adhésion cellulaire sur la tropoélastine permettant l'attachement de l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ (Lee et al., 2014b).

2. Complexe récepteur de l'élastine et signalisation intracellulaire

A l'état basal l'EBP est dissocié du CRE bien que les sous-unités PPCA et Neu-1 soient préassemblées et présentes à la membrane plasmique (Bonten et al., 2009b). Une stimulation cellulaire par les peptides d'élastine entraîne l'association des trois sous-unités pour former le CRE fonctionnel, capable de transduire un signal intracellulaire. Les voies de signalisation intracellulaires activées par les peptides d'élastine dépendent du type cellulaire (Duca et al., 2005, 2007; Fahem et al., 2008; Mochizuki et al., 2002; Robinet et al., 2007; Rusciani et al., 2010).

Lors d'une stimulation par les peptides d'élastine, ces derniers se lient au site élastine de l'EBP entraînant une activation de la neuraminidase-1. La neuraminidase-1 activée catalyse

alors la désialylation de gangliosides adjacents, et plus particulièrement du ganglioside GM_3 (N-acétylneuraminique-α (2-3)-galactosyl-β (1-4)-glucosylβ (1-1')-céramide), générant ainsi la production de lactosylcéramide (Duca et al., 2007; Rusciani et al., 2010). Le lactosylcéramide (LacCer) produit joue alors le rôle de second messager intracellulaire et active les voies de signalisation induites par les peptides d'élastine. La fixation d'un sucre à galactose, tel que le lactose, sur le site galactolectine de l'EBP, est capable d'antagoniser les effets des peptides d'élastine (Brassart et al., 2001; Toupance et al., 2012). En effet, la fixation du lactose au site galactolectine de l'EBP entraîne une diminution de l'affinité de l'EBP vis-à-vis des peptides d'élastine et la dissociation du CRE (Hinek et al., 1988).

Les voies de signalisation intracellulaires induites par les peptides d'élastine dépendent du type cellulaire. L'ensemble des voies de signalisation pouvant être activées par les peptides d'élastine sont schématisées dans la figure 13

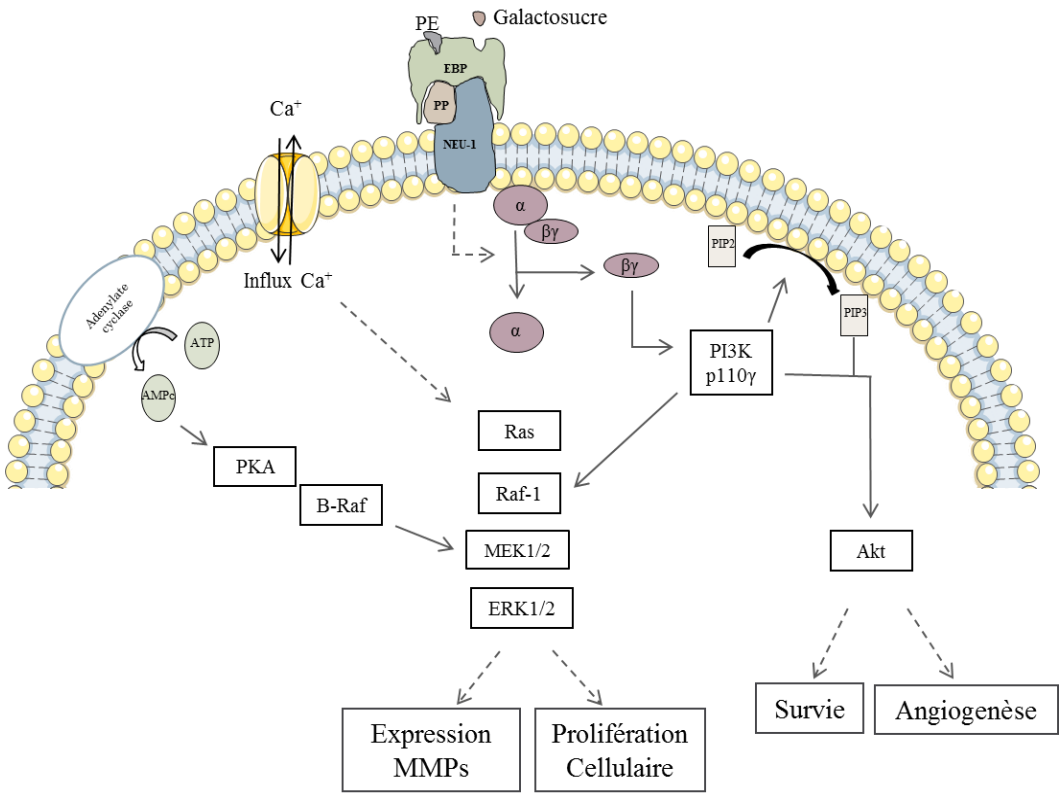


Figure 13. Voies de signalisation intracellulaires mises en jeu suite à l'interaction peptides d'élastine – CRE

Duca et collaborateurs ont démontré que l'induction de la pro-collagénase-1 médiée par les peptides d'élastine dans les fibroblastes implique l'activation de la voie MEK1/2 / ERK1/2 *via* une cascade de signalisation dépendante de PKA et PI_3K (Duca et al., 2002). Des travaux plus récents ont ainsi pu compléter ces cascades de signalisation et démontrent que les peptides

d'élastine peuvent, selon le type cellulaire, moduler les voies de signalisation suivantes: Ras-Raf-1-MAPK-ERK1/2, Gi-p110γ-Raf-1-MAPK-ERK1/2, AMPc-B-Raf-ERK1/2, ou Gi-p110γ-Akt (Antonicelli et al., 2007; Duca et al., 2002, 2005; Fahem et al., 2008; Faury et al., 1998; Jacob et al., 1987).

Certaines données de la littérature laissent supposer que la signalisation des peptides d'élastine serait altérée en cours du vieillissement (Faury et al., 1997a; Fulöp et al., 2001; Varga et al., 1997). De plus, des données recensent une perte des effets biologiques des peptides d'élastine dans divers contextes biologiques. Faury et ses collaborateurs suggèrent, également, que la fonction et la disponibilité du CRE changent avec le vieillissement. Ils démontrent que la vasodilatation dépendante du NO (monoxyde d'azote) induit par les peptides d'élastine est observée avec des anneaux aortiques de rats adultes mais pas avec des anneaux aortiques provenant de rats âgés. Ces observations suggèrent un découplage potentiel du CRE ou de ses voies de signalisation associées chez les individus âgés (Faury et al., 1997a). De la même manière, Fulöp et ses collaborateurs décrivent des altérations associées à l'âge dans la voie de signalisation du CRE (Fulöp et al., 2001). Cependant, la diminution des effets des peptides d'élastine au cours du vieillissement n'est pas expliquée par une modification du nombre d'EBP exprimés à la surface cellulaire ni par une modification de l'affinité de ce dernier pour les peptides d'élastine (Varga et al., 1997). Ceci pourrait être expliqué par une altération de la fonctionnalité du récepteur CRE et/ou par une altération des acteurs moléculaires en amont dans la voie de signalisation induite par le CRE (Roth, 1995). En effet, des études ont démontré un découplage progressif de la transmission normale des signaux en présence d'une concentration saturante en peptides d'élastine. Cependant ceux-ci sont toujours capables d'induire des effets biologiques mais de façon bien plus modérés, notamment sur la sécrétion d'enzymes de type élastase et la production de radicaux libres (Fülöp et al., 1986). Des modifications des effets des peptides d'élastine sur des cellules provenant de donneurs âgés ont également été observées notamment au niveau de la protéine Gi et plus précisément au travers de son inhibition par la *Pertussis toxin* (Fülöp et al., 1989; Varga et al., 1990), mais également au niveau de l'homéostasie calcique (Robert, 1996; Varga et al., 1990). Il a été également démontré une altération de la signalisation induite par les peptides d'élastine dans des neutrophiles provenant de sujets âgés, ainsi qu'une modification de l'activité MAPK p38 (Fulöp et al., 2001) ou encore une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 associé à l'âge (Fülöp et al., 1999). Par ailleurs, des changements similaires dans les voies de signalisation ont été observés pour d'autres récepteurs, tels que le récepteur α1-adrénergique, lequel montre un découplage au

cours du vieillissement (Roth, 1995). A ce jour, les causes exactes du découplage du récepteur CRE, observé au cours du vieillissement, restent non élucidées.

G. Cancer et Peptides d'élastine

1. Le cancer

Le cancer est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent affecter tous les organes du corps humain. L'une des caractéristiques du cancer et plus précisément, des cellules cancéreuses dites anormales est la prolifération rapide et leur capacité à envahir les tissus adjacents jusqu'à la dissémination de la tumeur dans l'organisme par formation de métastases. L'apparition d'un cancer est multifactorielle. En effet, l'accumulation des facteurs de risque tels que le tabagisme, l'alcool, l'exposition aux UV, associés à un patrimoine génétique prédisposé et/ou à un état physiologique plus favorable à l'installation de la pathologie, tel que le vieillissement de l'organisme, peut conduire au développement d'un cancer. Actuellement, de nombreux cancers peuvent être prévenus en évitant les principaux facteurs de risque et par les dispositifs de dépistage qui permettent de détecter l'apparition d'un cancer de plus en plus précocement (données OMS, 2014). Aujourd'hui, bien que l'amélioration de la médecine et des outils médicaux tels que la radiothérapie, la chirurgie, et la chimiothérapie permettent de mieux soigner le cancer, ce fléau nécessite la découverte de nouveaux traitements pharmacologiques afin de faciliter sa prise en charge et les soins des patients

2. Peptides d'élastine et cancer

Au cours de la vie d'un individu, l'élastine est synthétisée puis subit une dégradation lente. Cette dégradation est due aux contraintes mécaniques qu'elle subit mais aussi à l'action d'élastases synthétisées au cours du vieillissement (Fulop et al., 2011) ou de la progression des cancers (Anisimov, 2007). Les peptides d'élastine ainsi produits, dans les tissus et la circulation, sont capables de moduler un grand nombre de processus cellulaires associés au développement de pathologies graves (Blaise et al., 2013; Fulop et al., 2011; Gayral et al., 2014) dont le cancer qui nous intéresse plus particulièrement dans cette étude (Antonicelli et al., 2007; Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004; Toupance et al., 2012). En particulier, les peptides d'élastine sont capables de moduler le chimiotactisme (Blood et al., 1988; Senior et al., 1984), la prolifération (Ghuysen-Itard et al., 1992; Tajima et al., 1997), l'angiogenèse (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005), l'invasion et la sécrétion de protéases (Huet et al., 2002a; Ntayi et

al., 2004; Pocza et al., 2007), tant dans des cellules normales de type stromales que ces cellules tumorales. La question se pose donc du rôle tenu par les peptides d'élastine dans cette pathologie.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés au développement du mélanome, cancer extrêmement grave pour lequel un manque flagrant de traitements prévaut (d'après l'INCA, 2012). La peau est l'un organe où la composante élastique est représentée. Par ailleurs, au cours du vieillissement d'un individu, cette dernière subit un certain nombre d'altérations conduisant à sa dégradation et à la genèse de peptides d'élastine (Antonicelli et al., 2007). L'un des facteurs de risque majeur du mélanome est le vieillissement suggérant une relation possible entre la production des peptides d'élastine et la progression du mélanome (Feinmesser et al., 2002; Hornebeck et al., 2005).

H. Le mélanome

1. Généralités

Le mélanome est une tumeur maligne issue de la transformation d'un mélanocyte, cellule responsable de la pigmentation de la peau d'origine neuro-ectodermique. C'est l'un des cancers de la peau les plus agressifs et les plus graves. De par son agressivité et son haut potentiel invasif, c'est un des cancers pour lequel il n'existe actuellement pas de traitement efficace hormis l'exérèse totale lorsqu'il est détecté très tôt dans son développement. Le mélanome se manifeste par l'apparition d'une tâche pigmentée ou par la transformation d'un nævi préexistant prenant un aspect atypique. Les mélanocytes étant essentiellement présents dans la peau, les mélanomes sont neuf fois sur dix cutanés. Mais ils peuvent également se développer au niveau de l'œil et dans les muqueuses de la bouche, du nez, des sinus, du rectum ou des organes génitaux, où ils sont plus difficilement détectables (Rastrelli et al., 2014).

2. Épidémiologie

L'ensemble des données épidémiologiques proviennent de l'Institut de Veille Sanitaire (INVS, France). L'incidence du mélanome tend à augmenter en France ce qui est dû notamment à l'exposition excessive aux rayons UV naturels et artificiels, faisant de ce type de cancer un réel problème de santé publique.

En France, en 2011, le mélanome représente la 6ème cause de cancer chez la femme, la 8ème chez l'homme et constitue la 14ème et 12ème cause de décès chez la femme et l'homme respectivement. Son incidence n'a cessé d'augmenter ces dernières années, le plaçant parmi les

cinq cancers qui connaissent la plus forte augmentation entre 1980 et 2005. Toutefois, depuis 2000, cette augmentation semble moins soutenue probablement dû à l'effet du dépistage, qui conduit à une détection précoce des formes invasives. L'âge moyen au diagnostic est de 58 ans chez la femme et 60 ans chez l'homme. L'incidence du mélanome augmente avec l'âge (d'après l'INVS, 2014). Il est plus fréquent chez la femme avant 60 ans et prédomine chez l'homme au-delà. Ces observations peuvent notamment être expliquées par la surexposition aux rayons UV, devenue un effet de mode chez les femmes ces dernières années. Le mélanome est également retrouvé chez des femmes plus jeunes âgées de 30 ans, représentant 30% des nouveaux cas diagnostiqués (Belot et al., 2008). Il est par ailleurs devenu l'un des cancers les plus fréquents chez les jeunes adultes en étant au premier rang du cancer de la femme entre 25-29 ans et second rang chez les femmes de 30-34 ans (Remontet et al., 2003). L'incidence du mélanome montre une hétérogénéité selon les pays et diminue selon un gradient Nord-Sud principalement liés aux différences de phototypes cutanés et à la prédisposition génétique des populations.

En France, on recense près de 10 000 nouveaux cas de mélanomes chaque année et c'est un des rares cancers dont l'incidence et la mortalité augmentent encore en France. Cette tumeur maligne extrêmement agressive et invasive tue chaque année près de 1600 personnes. Compte tenu de sa gravité, le meilleur traitement est préventif et consiste à limiter l'exposition aux rayons UV qui représente l'un de ses facteurs de risque principaux pouvant fovariser son apparition.

3. Facteurs de risque

Il existe deux types de facteurs de risque dans l'apparition du mélanome : les facteurs extrinsèques comprenant l'exposition excessive aux rayons UV et les facteurs intrinsèques associés au vieillissement et à la prédisposition génétique comprenant le phototype cutané.

a) Les facteurs de risque extrinsèques

L'exposition prolongée et non protégée aux rayons UV naturels ou artificiels représente l'un des facteurs de risque majeurs du mélanome car 90% des mélanomes sont photo-induits (Gilchrest et al., 1999; Mack, 1999). L'exposition aux rayons UV provoque des dommages

cellulaires et moléculaires importants associé à un vieillissement prématuré de la peau, appelé photo-vieillissement (Naylor et al., 2011; Quan et al., 2009; Scharffetter–Kochanek et al., 2000). L'exposition aux rayons UV A, moins pénétrants, provoque le vieillissement prématuré de la peau et entraîne des altérations du système immunitaire conduisant à la multiplication non contrôlée des cellules anormales (Hegde et al., 2009; Veness et al., 1999). L'exposition aux rayons UV B, plus pénétrants, est responsable d'érythèmes et provoque des brûlures cutanées, induisant des dommages génétiques qui se traduisent par un stress oxydatif et/ou l'apparition de mutations de l'ADN pouvant conduire au développement d'un cancer cutané (Ichihashi et al., 2003).

b) Les facteurs de risques intrinsèques

Les facteurs intrinsèques sont des facteurs de risque inter-individuels tenant compte de l'âge, du phototype cutané et des prédispositions génétiques propres à chacun. En effet, le phototype, correspondant à la couleur de la peau, des cheveux et des yeux d'un individu, constitue l'un des facteurs de risque du mélanome. Les sujets à phototype faible de type I, ayant la peau très claire, sont plus sensibles au soleil et par conséquent au développement d'un mélanome que les individus de phototype III ou IV (Andreassi et al., 1999) (Tableau 1).

Cependant, l'exposition excessive aux rayons UV peut conduire au développement de cancers cutanés même chez les individus de phototypes foncés, IV, V et VI, bien qu'ils soient moins sujets à risque.

La présence excessive de nævi, plus communément appelés « grains de beauté », peut être à l'origine du développement de mélanomes. Toutefois, seulement 20 à 30% des mélanomes sont issus de la transformation d'un nævus. Le nombre, la taille et l'aspect des nævi sont des facteurs de risque importants (Goodson and Grossman, 2009; Newton-Bishop et al., 2010). Les nævi à risque sont souvent ceux qui apparaissent en dehors des poussées liées au développement de l'individu : la naissance à l'adolescence et la première grossesse.

Phototype	Couleur de peau, des cheveux et des yeux	Réaction au soleil
I	Peau très claire avec taches de rousseur, cheveux blonds ou roux et yeux clairs	Ne bronze pas, coups de soleil systématiques
II	Peau très claire avec taches de rousseur au soleil, cheveux châtains ou blonds et yeux clairs	Bronze difficilement, coups de soleil fréquents
III	Peau claire, cheveux châtains ou blonds	Bronze progressivement, coups de soleil occasionnels
IV	Peau mâtes, cheveux bruns ou châtains et yeux foncés	Bronze bien, coups de soleil peu fréquents
V	Peau foncée, cheveux foncés et yeux foncés	Bronze facilement, coups de soleil rares
VI	Peau noire, cheveux foncés et yeux foncés	Jamais de coups de soleil

Tableau 1. Phototypes cutanés. D'après http://biologiedelapeau.fr

La prédisposition génétique fait également partie des facteurs de risque intrinsèques liés au développement de mélanome. Bien que la mutation de la protéine B-Raf soit l'une des plus connues et fasse l'objet d'un grand nombre de thérapies innovantes (Fensterle et al., 2004), il existe d'autres mutations prédisposant les individus au mélanome. Parmi celles-ci, certaines sont considérées comme à haut à risque, souvent liées à l'hérédité, et d'autres à risque modéré ou faible, avec une apparition plutôt sporadique. Au sein des mutations présentant des hauts risques de prédisposition au mélanome, on retrouve celle de la protéine *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A* (CDKN2A ou p16), un puissant suppresseur de tumeur faisant partie par ailleurs d'un test de dépistage génétique cliniquement disponible, et celle de la *Cyclin-Dependent Kinase*-4 (CDK4) impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Veinalde et al., 2013). Parmi les mutations considérées comme à risque modéré ou faible, on retrouve celles de la *Melanocortin-1 Receptor* (MCR1), un récepteur couplé à la protéine Gs impliquéz dans

l'activation de l'adénylate cyclase régulant ainsi la *Microphtalmia-associated Transcription Factor* (MITF) qui participe au processus de pigmentation de la peau (Ozola et al., 2013; Tsao et al., 2012; Udayakumar et al., 2010).

Cependant, bien que des progrès importants aient été réalisés, le mélanome reste l'un des cancers les plus résistants aux traitements. Il est ainsi nécessaire de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques et la connaissance exhaustive des facteurs moléculaires influençant sa progression est impérative.

4. Progression tumorale du mélanome

La progression tumorale du mélanome débute par la prolifération incontrôlée de mélanocytes issus d'un nævus préexistant ou *de novo* dans l'épiderme. Elle aboutie tout d'abord à une hyperplasie, caractérisée par une prolifération anormale *in situ* des mélanocytes provoquant une augmentation de la masse cellulaire, jusqu'à la dysplasie cutanée correspondant à une lésion anormale précancéreuse. A ce stade, les cellules ont accumulé plusieurs mutations génétiques, du type B-Raf (Dong et al., 2003) ou CDKNA2, (Pacifico et al., 2008), conduisant à la transformation des mélanocytes en cellules malignes de mélanome. Le mélanome présente ensuite une progression tumorale biphasique. La première, dite en phase de croissance radiale (RGP) du mélanome, est caractérisée par une prolifération incontrôlée, lente et horizontale de cellules atypiques dans l'épiderme. Cette prolifération peut être accompagnée ou non de la migration de cellules individuelles ou de petits amas cellulaires non prolifératifs dans le derme papillaire sans atteinte de la jonction dermo-épidermique. Cette dernière conduisant à un mélanome *in situ* sans caractère métastatique (Figure 14).

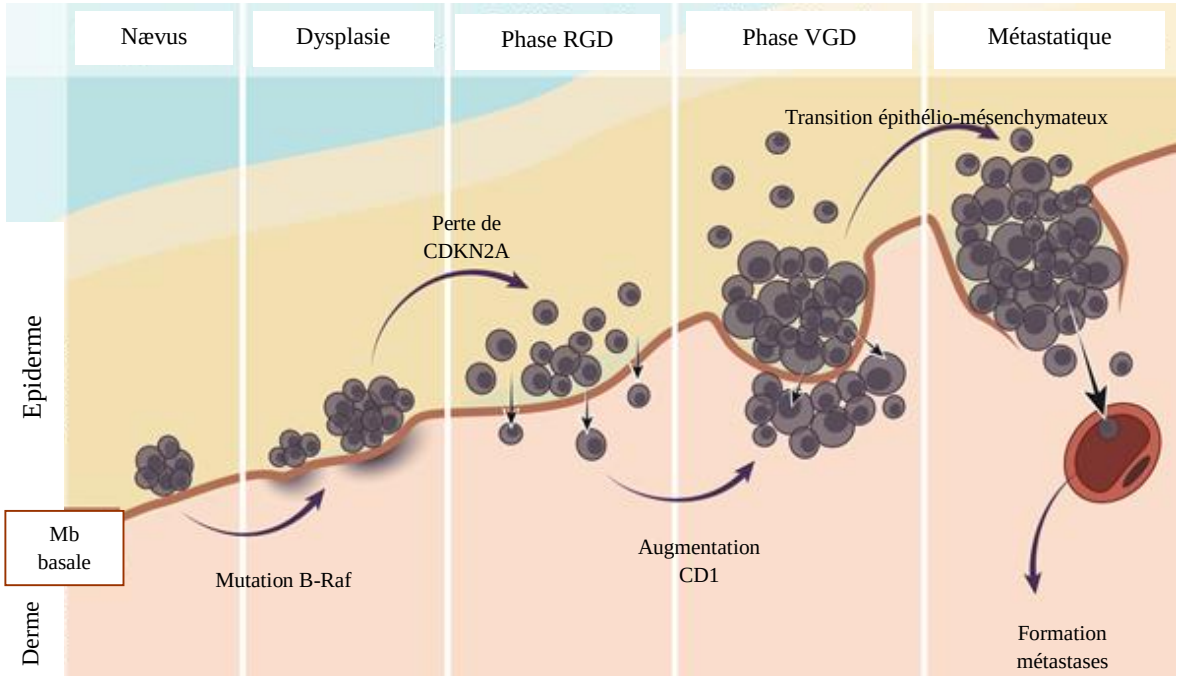


Figure 14. Progression tumorale du mélanome biphasique. Le développement du mélanome débute par une dysplasie *in situ* sans atteinte de la membrane basale. L'accumulation de mutations telles que B-Raf, CDKN2A conduit au potentiel pro-prolifératif des cellules de mélanome menant à la phase de croissance radiale (RGD). Un switch protéolytique favorise la dégradation de la membrane basale et mène à la phase de croissance verticale dite invasive allant jusqu'à la formation de métastases. D'après http://www.pathophys.org

La seconde phase est la phase de croissance verticale (VGP) du mélanome, caractérisée par une croissance verticale des cellules dans le derme réticulaire entraînant la dégradation de la jonction dermo-épidermique. Les cellules acquièrent à ce stade un fort potentiel invasif aboutissant à l'invasion du derme sous-jacent et à la mise en place d'une angiogenèse tumorale permettant la colonisation d'autres organes par les micrométastases impliquant les phénomènes d'extravasation et d'intravasation (Figure 13) (Clark et al., 1975, 1984; Herlyn et al., 1987; Laga and Murphy, 2010).

5. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est issue d'un processus de néo-angiogénèse caractérisé par la formation d'un nouveau vaisseau à partir d'un vaisseau préexistant.

Le microenvironnement tumoral comprend des types cellulaires variés qui sont capables d'influencer la réponse angiogénique de la tumeur. Au cours du développement tumoral plusieurs paramètres peuvent déclencher un « switch » angiogènique incluant le volume tumoral, l'hypoxie intra-tumorale, l'acidose et la privation de nutriments. Ce « switch » angiogénique permet ainsi à la tumeur de continuer à progresser (Folkman and Hanahan, 1991).

Les cellules tumorales exploitent leur microenvironnement en sécrétant des cytokines et des facteurs de croissance qui activent les cellules normales quiescentes autour d'elles et initient une cascade d'évènements qui devient rapidement dérégulée. Parmi eux, le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), sécrété par les cellules tumorales, stimule l'étalement et la prolifération des cellules endothéliales environnantes et représente un élément clé de la mise en place de l'angiogenèse tumorale (Senger et al., 1997). Bien que l'induction de l'angiogenèse puisse fournir plus d'oxygène et de nutriments à la tumeur, la réponse mise en place est peu bénéfique. En effet, la vascularisation tumorale continuellement remodelée est perméable et défectueuse, causant un flux sanguin irrégulier (Weis and Cheresh, 2005). La présence de péricytes subendothéliaux régulée par le *Platelet-derived growth factor* (PDGF) permet la maturation et l'imperméabilisation des vaisseaux. Malgré leur présence dans l'angiogenèse tumorale, ces derniers n'assurent pas leurs propriétés d'imperméabilisation (Hellberg et al., 2010). En effet, le microenvironnement tumoral trop riche en facteurs angiogéniques provoque la mise en place d'une angiogenèse accrue, anarchique et donc perméable (Kubota, 2012). Par ailleurs, le remodelage vasculaire constant dans le contexte tumoral implique une dégradation de la composante matricielle contenue dans le stroma. Ainsi, les fragments matriciels peuvent alors participer à la mise en place d'une angiogenèse anarchique en régulant entre autres la synthèse de protéases de type métalloprotéases (MMPs) (Robinet et al., 2005) conduisant ainsi à une amplification du processus angiogènique.

Bien qu'imparfaite, l'angiogenèse anormale mise en place dans le processus tumoral facilite l'invasion tumorale en permettant aux cellules invasives de rejoindre la circulation sanguine par extravasation et ainsi de pouvoir coloniser d'autres organes par intravasation pour former des tumeurs secondaires (Figure 15).

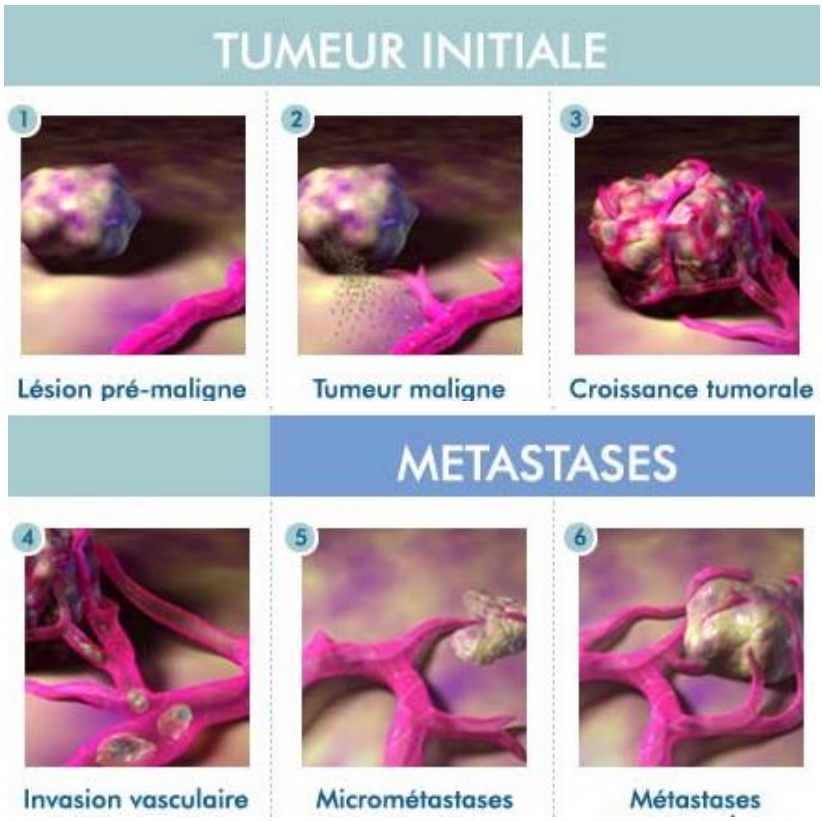


Figure 15. Illustration de la mise en place de l'angiogenèse tumorale. Images créées par les laboratoires Roche (www.laroche.com)

I. Mélanome et stroma tumoral

1. Structure du stroma du mélanome

Il existe deux types de développement tumoral du mélanome : un représenté par la croissance radiale constituant un mélanome *in situ* non métastatique ; l'autre, caractérisé par la croissance verticale, conduisant à une tumeur envahissante jusqu'à la formation de métastases (Clark et al., 1989). Selon le stade de la progression tumorale du mélanome, la réaction stromale est variée et implique des fonctions stromales différentes. Elle dépend notamment de la nature primaire ou secondaire de la tumeur, de l'histopathologie, de l'état de la progression tumorale et du site histologique dans lequel se trouve la tumeur (Ruiter and Herlyn, 2003). La réaction stromale se définit par la présence ou l'absence de fibroplasie, et son association avec d'autres composants du stroma, incluant les vaisseaux sanguins et l'inflammation. Le stroma du mélanome cutané peut montrer différents profils. La mixoïde est caractérisée par la présence de cellules semblables à des fibroblastes dans un dépôt matriciel riche en protéoglycanes. La desmoplastique est, quant à elle, caractérisée par la présence de fibroblastes et fibrocytes dans une MEC majoritairement fibrillaire. Le stroma du mélanome peut également être constitué d'une prolifération fibroblastique ou endothéliale excessive ; néanmoins, ceci reste très rare

(Labrousse et al., 2004; McCawley and Matrisian, 2001). Le stroma joue un rôle crucial dans l'évolution du mélanome. Il a été démontré que l'infiltration du tissu sous-jacent par la tumeur ainsi que l'incorporation du stroma issu du tissu préexistant est plus favorable à un mauvais pronostic dans le cas du mélanome métastatique (Smolle et al., 1995). Le stroma est capable de moduler et d'influencer la progression tumorale par différentes fonctions impliquant la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines, la sécrétion de protéases de type MMPs, la composante matricielle, et plus particulièrement l'élastine, ou encore au travers des fonctions biologiques des fibroblastes (Ruiter et al., 2002).

2. Importance du stroma dans le mélanome

a) Facteurs de croissance et cytokines

L'interaction des cellules de mélanome avec leur environnement n'implique pas uniquement des contacts cellule-cellule, mais peut aussi se faire au travers de la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance. Parmi ces facteurs de croissance, deux types sont impliqués dans l'interaction stroma – cellules tumorales : les facteurs autocrines et paracrines. Le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) et le facteur « scatter » font partie des facteurs de croissance autocrines dans la réaction cellules tumorales – stroma, impliqués dans la prolifération des cellules de mélanome et dans la sécrétion de facteurs paracrines. Ces derniers incluent, par exemple, le PDGF ou le VEGF promouvant la croissance cellulaire et l'invasion (Lázár-Molnár et al., 2000). Ces effets paracrines impliquent également la prolifération des fibroblastes, la fibroplasie, l'angiogenèse et l'inflammation. Parmi les facteurs de croissance dérivés des cellules de mélanomes et participant potentiellement à la réaction stromale, on trouve le bFGF, le PDGF, le VEGF et le *Transforming Growht Factor β* (TFG-β). Parmi eux, le TFG-β, le bFGF et le PDGF sont constitutivement exprimés par les cellules de mélanome primaire au cours de la phase de croissance verticale et dans les cellules métastatiques (Labrousse et al., 2004; Lázár-Molnár et al., 2000). Par ailleurs, le PDGF permet à la tumeur d'organiser le stroma, particulièrement la production de MEC, par une stimulation paracrine et son association avec d'autres facteurs de croissance (Willenberg et al., 2012). Le PDGF est également capable d'induire l'angiogenèse par stimulation du VEGF (Forsberg et al., 1993; Shikada et al., 2005), ce dernier pouvant être induit par d'autres facteurs de la réaction stromale tels que le bFGF (Giavazzi et al., 2003; Tsunoda et al., 2007), l'interleukine-1 (Ben-Av et al., 1995) ou encore le TNF-α (Yoshida et al., 1997). Dans la plupart des mélanomes cutanés, le VEGF a été détecté en phase de croissance verticale et dans les métastases dérivées de ce

dernier, confirmant ainsi qu'il semble jouer un rôle important dans la réaction stromale. Par contre, il n'est pas retrouvé dans les lésions bénignes du mélanome (Simonetti et al., 2002). Par ailleurs, son expression et son accumulation dans le stroma sont corrélées avec la transition de la phase de croissance radiale à verticale du mélanome (Erhard et al., 1997). De plus, le VEGF est directement associé à l'angiogenèse tumorale du mélanome et permet non seulement la croissance des cellules endothéliales, mais aussi leur migration, leur invasion et la formation de pseudotubes (Brychtova et al., 2008). D'une manière générale, les facteurs de croissance paracrines et autocrines, tels que le PDGF, TGF-β ou VEGF sont importants dans la réaction stromale du mélanome parce qu'ils permettent de moduler le microenvironnement tumoral au bénéfice de la croissance de la tumeur et de l'invasion (Berking et al., 2001; Lázár-Molnár et al., 2000).

b) Métalloprotéinases matricielles (MMPs)

Les cellules de mélanome et stromales sont capables de synthétiser et de sécréter non seulement des facteurs de croissance ou des cytokines mais également des protéinases, et plus particulièrement des métalloprotéinases matricielles (MMPs), capables de moduler la réaction stromale. Elles expriment également leurs inhibiteurs tissulaires naturels nommés *Tissues Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), en corrélation avec le phénotype invasif du mélanome. Parmi les MMPs impliquées dans le développement du mélanome et retrouvées dans le stroma tumoral, on trouve la MMP-1 (Hofmann et al., 2003), la MMP-2 (Kurschat et al., 2002), la MMP-9 (Bodey et al., 2001), la MMP-13 (Zigrino et al., 2009) et la MT1-MMP (Hofmann et al., 2000). On retrouve également diverses inhibiteurs tissulaires : le TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-3 (Hofmann et al., 2000). La balance protéolytique entre la production des MMPs activées et leurs TIMPs influence les capacités métastatiques du mélanome, participant activement à l'invasion des cellules tumorales dans les tissus sous-jacents au travers de la régulation de la protéolyse matricielle (Hofmann et al., 2000). Globalement la production de MMPs, sécrétées par les cellules de mélanome ou par les cellules stromales, est associée au pouvoir invasif de la tumeur et à la formation de métastases, à l'exception de la MMP-9, produite exclusivement au cours de la phase de croissance horizontale du mélanome, suggérant un évènement précoce dans la dégradation matricielle et dans l'invasion des cellules de mélanomes (van den Oord et al., 1997). De nombreux facteurs, incluant les cytokines ou les molécules d'adhésion, sont impliqués dans la régulation de l'expression, l'activation et dans la localisation des formes actives des MMPs. La présence de MMPs actives et leur localisation

cellulaire sont importantes dans l'invasion tumorale (Ruiter et al., 2002). Au sein du stroma tumoral, les MMPs sont également capables de réguler l'angiogenèse tumorale, nécessaire à la progression tumorale, en modulant la protéolyse matricielle et la migration des cellules endothéliales. Ces effets impliquent essentiellement la production de la MT1-MMP, qui joue un rôle important dans l'angiogenèse tumorale (Yamakawa et al., 2004).

c) Rôle des fibroblastes

La transition de la phase de croissance horizontale à verticale nécessite la dégradation de la membrane basale, constitutivement composée de collagène de type IV (Kobayashi et al., 1989). Les cellules de mélanome sécrètent les MMP-2 et MMP-9, capables de dégrader ce collagène (Murphy et al., 1991). Cependant la MEC intradermique, quant à elle, est riche en collagène de type I (Epstein and Munderloh, 1978), et les cellules tumorales doivent être capables de la dégrader. La principale enzyme qui dégrade le collagène de type I est la MMP-1 qui peut être sécrétée, non seulement par les cellules de mélanome, mais également par les fibroblastes du stroma. Ces observations mettent en évidence le rôle essentiel des cellules stromales et plus particulièrement des fibroblastes dans la progression tumorale (Wandel et al., 2000, 2002). Par ailleurs, il a été démontré que l'invasion du collagène de type I intradermique par les cellules de mélanome est dépendante du contact cellule tumorale – fibroblaste suggérant une communication entre les cellules tumorales et stromales. De plus, les fibroblastes issus du stroma tumoral sécrètent une protéine nommée *fibroblast activation protein* (FAP), appartenant à une famille de sérine protéases dotées d'une activité gélatinolytique et dipeptidyl peptidase (Park et al., 1999). La FAP issue des fibroblastes du stroma est capable de dégrader le collagène de type I conduisant à la progression du mélanome (Wäster et al., 2011). Cette protéine est par ailleurs exprimée dans toutes les lésions mélanocytaires, comprenant les lésions bénignes, pré-malignes et malignes (Huber et al., 2003). En plus de ces propriétés, les fibroblastes du stroma activés sont également une grande source de facteurs de croissance telle que l'*Insulin Growth Factor* (IGF), le PDGF, le bFGF ou encore le TGF-β, lesquels peuvent participer aux interactions cellule stromale – cellule de mélanome par des effets paracrines et autocrines (Anderberg et al., 2009; Iida and McCarthy, 2007a). L'implication des fibroblastes dans la croissance et la progression du mélanome suggère plusieurs étapes. La première est le recrutement des fibroblastes résidents, puis leur activation et leur prolifération, suivi de leur conversion en myofibroblastes ou en fibrocytes capables de sécréter les composants de la MEC

(Ruiter et al., 2002). Cependant ceci reste très théorique, car peu de choses sont connues sur la dynamique des fibroblastes et leurs capacités à réguler le mélanome.

d) Mélanome et fragmentation de l'élastine

Tel que nous l'avons décrit, l'élastine est l'un des constituants majeurs de la MEC de la peau, et plus précisément du derme. Elle est synthétisée par les fibroblastes sous forme d'un précurseur, appelé tropoélastine. Les sous-unités de tropoélastine sont ensuite assemblées dans un réseau microfibrillaire, stabilisé par des liaisons croisées intra- et inter-chaines formant *in fine* la fibre élastique mature (Mithieux and Weiss, 2005; Wagenseil and Mecham, 2007). De par sa structure, l'élastine présente une grande résistance à la plupart des enzymes protéolytiques, excepté les élastases parmi lesquelles la MMP-2 (gélatinase-A), la MMP-9 (gélatinase-B), la MMP-7 (matrilysine), l'élastase leucocytaire, les cathepsines-G et -S et la MMP-12 (Aikawa et al., 2009; Boudier et al., 1981; Hornebeck et al., 2002; Pardo and Selman, 1999). Ces élastases entraînent la formation de peptides dérivés de la fragmentation de l'élastine, nommés peptides d'élastine, capables de déclencher diverses réponses biologiques dans plusieurs types cellulaires incluant les cellules tumorales, telles que les cellules de mélanome, ou encore les cellules stromales endothéliales et les fibroblastes. Ces effets biologiques sont médiés par la liaison des peptides d'élastine à leur récepteur, le complexe récepteur de l'élastine (CRE) (Blanchevoye et al., 2013; Moroy et al., 2009), stimulant ainsi le chimiotactisme (Blood et al., 1988; Senior et al., 1984), la sécrétion de protéase, la migration et l'invasion (Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007; Toupance et al., 2012) des cellules normales et tumorales et également l'angiogenèse (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005). Dans le cadre du mélanome, les peptides d'élastine sont capables de moduler l'invasion tumorale au travers d'une sur-régulation de la production et la sécrétion de protéases comme la MMP-2 (Ntayi et al., 2004). Les peptides d'élastine peuvent également réguler les fibroblastes présents dans le stroma tumoral en induisant leur chimiotactisme (Blood et al., 1988; Senior et al., 1984), leur prolifération et la sécrétion de protéases comme la MMP-1 (Brassart et al., 2001). De plus, les peptides d'élastine stimulent l'angiogenèse tumorale induite dans le stroma en induisant la migration et la formation de pseudotubes (Figure 16) par une sur-régulation de la MT1-MMP (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005).

De manière intéressante, une intense fragmentation des fibres élastiques a été observée au niveau du front d'invasion sur des coupes de tumeurs provenant de patients atteints de mélanome, particulièrement dans les tumeurs hautement invasives, confirmant ainsi la présence

in situ des peptides d'élastine (Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004). Il semble donc propable que ces produits de dégradation, présents dans le stroma tumoral du mélanome, puissent jouer un rôle important en participant activement à la progression du mélanome. Par ailleurs, une observation clinique a permis de mettre en évidence que la perte du tissu élastique est corrélée avec un taux élevé de décès chez des sujets atteints de mélanome invasif (Feinmesser et al., 2002)

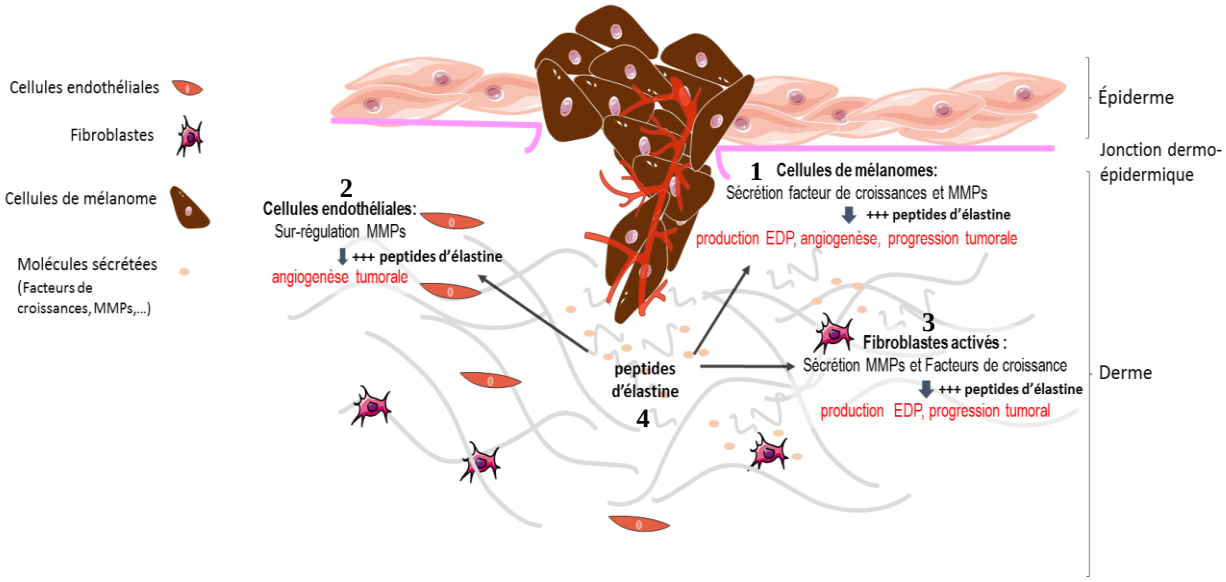


Figure 16. Représentation schématique hypothétique de l'effet des peptides d'élastine sur le stroma tumoral du mélanome. 1) Les cellules de mélanome sécrètent des facteurs de croissance, et des protéases, ces dernières étant impliquées dans la protéolyse matricielle dont la dégradation de l'élastine. Ceci entraîne la production de peptides d'élastine au niveau du front d'invasion, promouvant la progression du mélanome et 2) l'angiogenèse tumorale au travers de la sécrétion du VEGF. 3) Les facteurs de croissance sécrétés par les cellules mélanomes recrutent et activent les fibroblastes du stroma, qui à leur tour sécrètent des facteurs de croissance et des protéases entraînant la production de peptides d'élastine et participant à la progression tumorale. 4) La production de peptides d'élastine exerce un rétrocontrôle positif permettant l'auto-amplification de tous les processus précédemment décrits, exacerbant ainsi fortement la progression du mélanome.

Comme le souligne les éléments présentés dans la Figure 16, les peptides d'élastine pourraient être capables d'influencer la réaction stromale en faveur de la progression du mélanome. De plus, ces derniers pourraient être également capables d'exercer un rétrocontrôle positif qui tend à amplifier le système de la progression tumorale. Il semblerait donc que le ciblage thérapeutique du récepteur des peptides d'élastine, le CRE, puisse être une voie thérapeutique intéressante et innovante pour lutter contre la progression du mélanome. De plus, les thérapeutiques actuelles ne tiennent pas compte de la composante matricielle, ce qui pourrait peut-être expliquer les échecs observés dans le cadre du mélanome, où celle-ci semble jouer un rôle extrêmement important.

Bien que les étapes majeures gouvernant le développement du mélanome soient bien décrites, le rôle du viellissement du stroma et son impact sont très peu étudiés.

e) Mélanome et vieillissement du stroma

Comme nous l'avons précédemment discuté le stroma est capable d'influencer le développement tumoral du mélanome (Labrousse et al., 2004; Smolle et al., 1995). De manière intéressante, celui-ci est très largement associé au vieillissement faisant par ailleurs partie d'un des facteurs de risques majeurs dans son apparition. Par conséquent, l'âge du stroma pourrait alors jouer également un rôle dans l'évolution de cette pathologie. En effet, de nombreuses études décrivent le vieillissement et les différentes modifications moléculaires et cellulaires associées (Naylor et al., 2011) pouvant conduire à un microenvironement favorable aux tumeurs. Dans le but de mieux comprendre l'impact du stroma sur la progression du mélanome, nous nous sommes intéressés aux différentes altérations observées au cours du viellissement cutané.

Au niveau cutané spécifiquement, on distinge deux types de vieillissements, le vieillissement intrinsèque ou chronologique (Sjerobabski-Masnec and Situm, 2010) et le vieillissement extrinsèque ou photoinduit (Rittié and Fisher, 2002). Ces deux types de vieillissements présentent des caractéristiques morphologiques qui leurs sont propres (Fisher et al., 2002). Cependant, des similitudes dans les mécanismes moléculaires altérés au cours de ce processus ont été observées (Naylor et al., 2011). Parmi eux, nous retrouvons la diminution de la taille des télomères conduisant à la sénescence réplicative (Kosmadaki and Gilchrest, 2004), l'augmentation des mutations de l'ADN génomique menant à la formation de produits carcinogènes comme les dimères pyrimidiques (Gonzales-Castañeda et al., 2011; Naylor et al., 2011). Des modifications de l'ADN mitochondrial sont également retrouvées et sont directement associées à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) capables de moduler certains processus moléculaires comme la production de protéases telles que la MMP-1 (Zapico and Ubelaker, 2013; Fisher et al., 2002; Klotz et al., 2001). Cette dernière est, par ailleurs, impliquée dans la protéolyse matricielle du derme et associée directement au vieillissement de la peau (Berneburg and Krutmann, 1998). Ainsi, l'augmentation de la MMP-1 peut être considérée comme un marqueur de vieillissement (Dong et al., 2008; Fisher et al., 2009). La protéolyse matricielle d'une manière générale est augmentée par l'activation de différentes voies de signalisation dépendantes, entre autre, de NF-κB (Huang et al., 2007;

Hwang et al., 2011) et d'AP-1 (Kim et al., 2012; Kohl et al., 2011), lesquelles stimulent l'expression des MMPs et de diverses cytokines, renforçant ainsi la réponse cellulaire. Le taux élevé de MMPs induit au cours du viellissement n'est pas compensé par l'augmentation de la production de leurs inhibiteurs naturels, les TIMPs, menant à un déséquilibre en faveur de la protéolyse matricielle (Quan et al., 2009). Les kératinocytes et les fibroblastes sont les principaux types cellulaires impliqués dans l'expression de la MMP-1, la MMP-3 et de la MMP-9 induit par les UVs au cours du photoviellissement (Park et al., 2013). Le photovieillissement amplifi de manière prématurée et incontrôlée l'ensemble des processus dérégulés dans le vieillissement chronologique. Ainsi, il est donc logique de penser que celui-ci présente un microenvironnement plus favorable au développement tumoral.

Ainsi, il est donc logique de penser que ces deux types de vieillissement présentent un microenvrionement plus favorable au développement tumoral

Dans ce sens, l'apparition de tumeurs bénignes et/ou malignes cutanées est plus souvent associée à ce type de vieillissement (Sjerobabski-Masnec and Situm, 2010). En effet, l'exposition aux rayons UVs entraîne une augmentation des dommages cellulaires et moléculaires pouvant conduire au développement plus rapide de pathologies telles que le mélanome qui nous intéresse plus particulièrement dans cette étude (Keller et al., 1997). Dans les deux cas, la composante matricielle de la peau, représentée principalement par le collagène et l'élastine, est altérée, voire dégradée, générant des fragments matriciels (Fisher et al., 2009; Schmelzer et al., 2012). La prédominance des mélanomes dans le photovieillissement pourrait alors être expliquée par l'augmentation prématurée de la production de peptides d'élastine pro-tumoraux due à l'exposition aux rayons UVs connue pour induire une fragmentation de l'élastine (Sherratt et al., 2010).

L'ensemble de ces données montrent que le stroma évolue au cours de l'âge suggérant ainsi que son influence sur la tumeur pourrait également être modifiée. De plus, le mélanome présente une incidence à environ 60 ans, tout sexe confondu, et l'élastine, quant à elle, a une demi-vie d'environ 70 ans (Petersen et al., 2002). La dégradation du tissu élastique a également été corrélée à un taux élevé de décès chez des patients atteints de mélanome invasif (Feinmesser et al., 2002) proposant une corrélation entre l'apparition du mélanome et la dégradation de l'élastine.

Il semblerait donc que l'état physiologique général et l'âge des patients atteints de mélanome soit propice à la progression de la maladie et que la composante matricielle, et plus précisément les peptides d'élastine présents dans ces conditions, puissent jouer un rôle extrêmement important dans l'évolution de la pathologie.

But de l’étude

II. But de l'étude

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire « Signalisation et Récepteurs Matriciels » (SiRMa) appartenant à l'unité « Matrice Extracellulaire et Dynamique Moléculaire » (MEDyC) UMR CNRS / URCA N° 7369 de l'Université de Reims Champagne Ardenne. Ce travail de recherche a été mené au sein de l'équipe 2 de cette Unité. La thématique de recherche de cette équipe porte sur l'impact des modifications post-traductionnelles des protéines matricielles, leurs rôles physiologiques, leur impact au niveau physiopathologique, le vieillissement matriciel et le remodelage qui l'accompagne. Cette nouvelle équipe est issue de la fusion de deux équipes de recherche, dont une est spécialisée dans l'élastine et les peptides issus de sa dégradation notamment, leurs effets biologiques dans certaines pathologies graves telles que le cancer, l'athérosclérose ou encore le diabète.

Le vieillissement d'un individu est corrélé à un grand nombre d'altérations moléculaires et cellulaires conduisant à la perte de certaines fonctions biologiques. Parmi les protéines particulièrement affectées par le vieillissement se trouvent l'élastine, une protéine de la matrice extracellulaire. L'élastine est synthétisée en abondance, jusqu'à la puberté, dans les tissus soumis aux fortes contraintes mécaniques tels que la peau, les poumons, les artères et les ligaments (Mithieux and Weiss, 2005). Elle présente une demi-vie longue de 70 ans et est peu ou pas renouvelée au cours de la vie d'un individu (Petersen et al., 2002). Par conséquent, l'élastine est sujette aux altérations (Schmelzer et al., 2012), dues notamment aux contraintes mécaniques qu'elle subit mais également à l'action d'élastases synthétisées dans des conditions physiologiques comme le remodelage et la cicatrisation (Attia-Vigneau et al., 2014) et surexprimées dans des conditions pathologiques telles que le cancer (Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007; Toupance et al., 2012) ou encore l'athérosclérose (Gayral et al., 2014). Ces altérations mènent à la dégradation de l'élastine et à la production de peptides biologiquement actifs (Duca et al., 2004). De manière intéressante, il a été démontré que ces peptides dérivés de la dégradation de l'élastine sont capables d'induire un grand nombre d'effets biologiques jouant un rôle crucial dans l'évolution de certaines pathologies comme, par exemple le développement du mélanome (Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007). Le mélanome est l'un des cancers cutanés les plus agressifs pour lequel il n'existe pas de traitement efficace actuellement. Il présente une incidence à environ 60 ans chez l'Homme et tend à apparaître de plus en plus précocement due notamment à la surexposition aux rayons UVs naturels et surtout artificiels devenus un effet de mode ces dernières années.

Les peptides d'élastine pourraient jouer un rôle crucial dans la progression du mélanome. En effet, des données *in vitro* démontrent que les peptides d'élastine sont capables de promouvoir la progression du mélanome en sur-exprimant des protéases de type métalloprotéinases matricielles (Feinmesser et al., 2002; Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007). Par ailleurs, la réaction stromale qui, dans le cadre du mélanome, participe activement à l'évolution de la pathologie (Labrousse et al., 2004; Ruiter and Herlyn, 2003) peut être influencée par les peptides d'élastine. En effet, les peptides d'élastine modulent l'angiogenèse en promouvant la migration et la formation de pseudotubes *in vitro* au travers de la régulation de la MT1-MMP des cellules endothéliales (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005). De façon similaire, les peptides d'élastine sont également capables de moduler les fibroblastes présents dans le stroma en stimulant leur prolifération et leur sécrétion de MMPs (Brassart et al., 2001; Duca et al., 2002; Tajima et al., 1997), lesquelles peuvent être directement impliquées dans la progression du mélanome (Wandel et al., 2000, 2002). Il semble donc qu'*in vitro* les peptides d'élastine puissent être capables de moduler la progression du mélanome et également la réaction stromale. Cependant, peu de données sur l'impact des peptides d'élastine dans la progression du mélanome *in vivo* ont été reportées à ce jour. Néanmoins, il a été osbervé une intense fragmentation des fibres élastiques au niveau du front d'invasion sur des coupes de tumeurs issues de patients atteints de mélanomes invasifs confirmant ainsi leur présence *in situ* (Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004). Ces observations posent ainsi la question de leur réelle pertinence dans la progression du mélanome *in vivo* et tend à supposer que la composante matricielle et plus particulièrement les peptides d'élastine jouent un rôle central dans la pathologie.

Dans ce sens, des travaux initiés au laboratoire visant à démontrer le rôle *in vivo* des peptides dérivés de l'élastine (EDPs) ont été réalisés récemment. Au cours de mon stage de Master 1 et lors de mon arrivée en thèse, j'ai ainsi tout d'abord participé à leur finalisation, ce qui a permis d'apporter les données nécessaires à leur publication dans *British Journal of Cancer* (Devy et al., 2010). Ce travail, qui consitue la base et le point de départ de mon projet de thèse, a permis de démontrer que les peptides d'élastine sont capables de moduler la croissance tumorale *in vivo* en régulant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules de mélanomes (Figure 17).

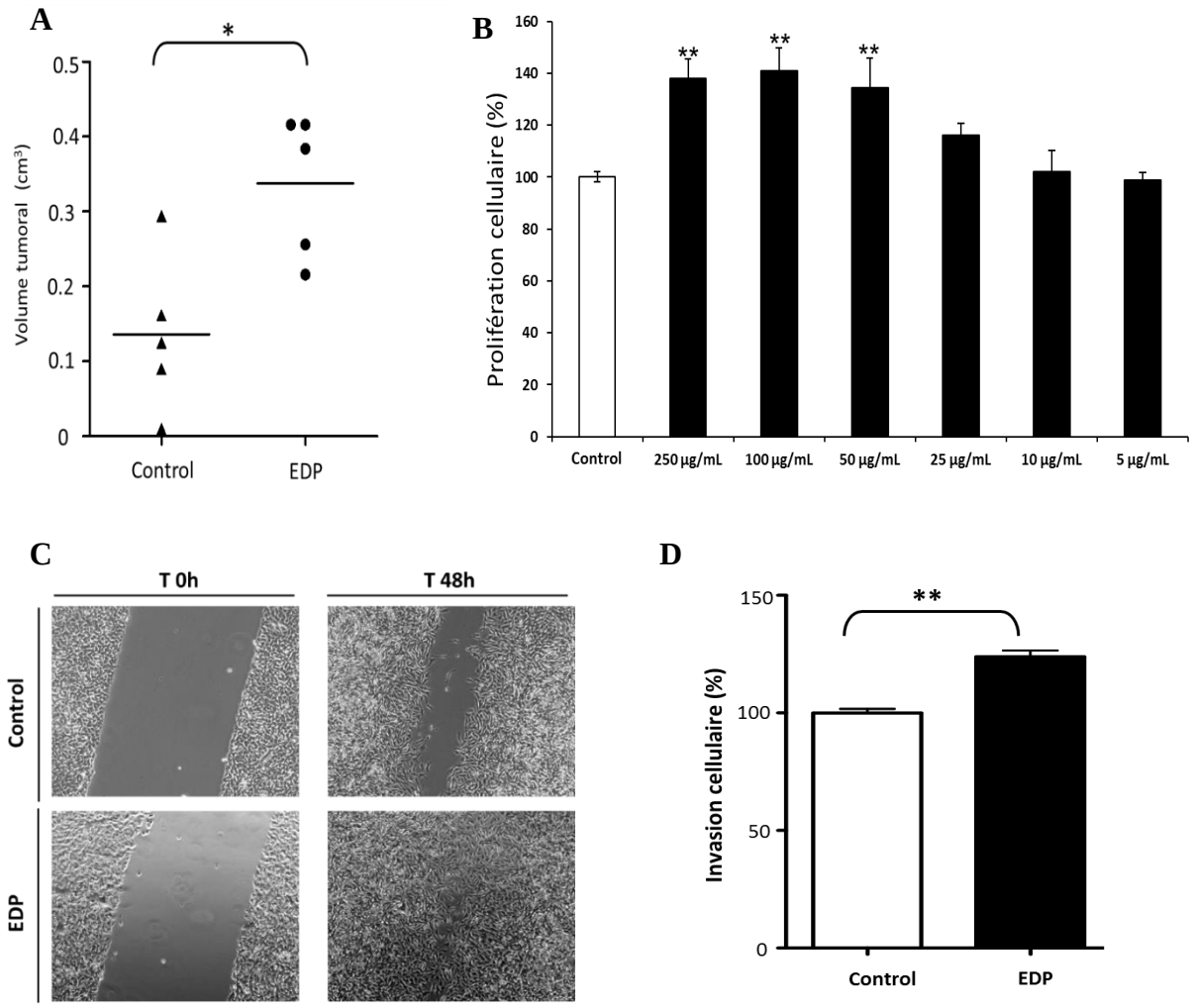


Figure 17. Effets des peptides d'élastine sur la croissance et l'invasion du mélanome *in vivo* et *in vitro*. A. Augmentation de la croissance tumorale *in vivo*, EDP (5 mg/kg). B. Les peptides d'élastine régulent la prolifération des cellules B16F1 de manière dose-dépendante. C-D. Augmentation des propriétés migratoires et invasives des cellules B16F1 médiées par les peptides d'élastine, EDP (50µg/ml). D'après Devy et. al 2010.

Ces travaux nous ont permis également de montrer que les métalloprotéainases matricielles semblaient impliquées dans l'effet pro-invasif des EDPs et que l'expression des activateurs du plasminogène tPa et uPa n'était pas modulée par les EDPs, bien que leur activité basale semblait participer. Aucune variation des profils d'expression et d'activation des MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP, protéases pouvant être impliquées dans le développement du mélanome (Bodey et al., 2001; Hofmann et al., 2000), n'ayant été observée *in* vitro, nous avons donc décidé de porter spécifiquement nos efforts sur la MMP-1.

Il fût en effet montré que la collagénase-1 (MMP-1) joue un rôle important dans le développement du mélanome notamment en dégradant la matrice au cours de l'invasion tumorale (Walker and Woolley, 1999). De plus, la MMP-1 peut être activée par le système

plasminergique (Benbow et al., 1999). Enfin, notre laboratoire a démontré que les peptides d'élastine sont capables d'induire une forte production de la pro-MMP-1 chez les fibroblastes (Brassart et al., 2001). Ainsi, nous avons démontré dans ces premiers travaux que les peptides d'élastine modulaient la croissance tumorale du mélanome *via* la sur-expression et activation de la MMP-1. Ces observations ont été confirmées par des études génomiques, protéiques et corrélées à la dégradation du collagène comme démontré dans la figure suivante (Figure 18).

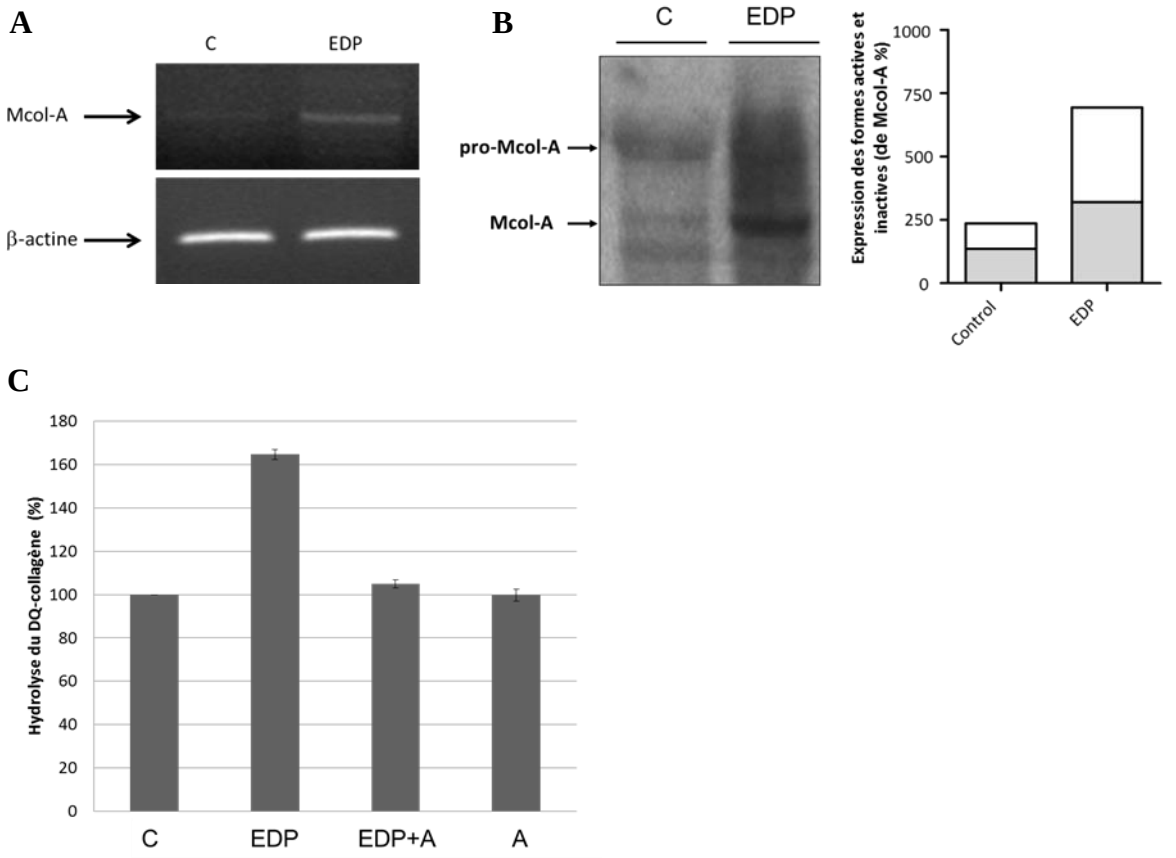


Figure 18. Rôle de la MMP-1 dans l'invasion du mélanome médiée par les peptides d'élastine. A-B. Augmentation de l'expression génique (A) et protéique (B) de la MMP-1 après traitement aux peptides d'élastine. C. Les peptides d'élastine induisent l'augmentation de la dégradation du DQ-collagene in vitro, A : aprotinine. D'après Devy et. al 2010.

De plus, l'utilisation d'un anticorps anti-MMP-1 bloquant (Brennan et al., 2003) a permis de démontrer très clairement le rôle central de cette protéase dans la progression du mélanome B16F1 médiée par les peptides d'élastine.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux suggérent que le complexe récepteur de l'élastine (CRE), récepteur par lequel les peptides d'élastine exercent leurs activités biologiques, pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre le mélanome. Nous avons ainsi décidé de développer des stratégies pharmacologiques le ciblant.

Dans ce travail de thèse, nous avons développé une stratégie thérapeutique visant à moduler l'influence de la composante matricielle dans le développement du mélanome. Pour cela, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au ciblage du récepteur des peptides d'élastine, le CRE, qui semble être une cible potentiellement intéressante dans le cadre du mélanome. Pour ce faire, nous avons développé plusieurs approches : l'une visant à inhiber l'activité enzymatique de la sous-unité responsable de la transduction du signal, Neu-1, l'autre visant à empêcher la fixation des peptides d'élastine sur l'EBP. Nous avons également envisagé l'association de ces deux approches. Ces différentes stratégies ont été développées en utilisant des approches *in silico*, *in vitro* et *in vivo* sur les cellules de mélanomes B16F1 mais aussi sur les cellules stromales qui jouent un rôle essentiel et participent activement à la progression du mélanome.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au vieillissement qui, dans le cadre du mélanome, est un facteur de risque majeur. En effet, le vieillissement du stroma est théoriquement favorable à la progression tumorale du mélanome et cet état de fait pourrait moduler son influence ainsi que celle des EDPs. De plus, plusieurs données de la littérature semblent démontrer un découplage inexpliqué du récepteur CRE avec l'âge, entraînant une modulation de sa signalisation. Notre objectif a été ici d'analyser l'influence du stroma âgé sur le développement du mélanome et d'évaluer l'influence des antagonistes et inhibiteurs de la signalisation induite par la liaison de peptides d'élastine au CRE dans ce contexte. De plus, nous nous sommes attachés à mettre à jour le mécanisme de découplage de ce récepteur.

Matériels & Méthodes

III. Matériels et Méthodes

A. Modèles cellulaires

1. Lignée cellulaire de mélanome B16F1

La lignée murine B16F1 est issue de cellules de peau atteintes de mélanome prélevées chez la souris C57B/6J. Ce sont des cellules adhérentes de forme épithélioïde pigmentées et présentant de faibles capacités métastatiques. Ces cellules tumorogèniques, provenant de l'American Type Culture Collection (CRL-6323), seront utilisées dans notre étude comme modèle de mélanome murin afin d'évaluer les différentes stratégies thérapeutiques visant à bloquer les effets des peptides d'élastine *in vitro* et *in vivo*. En effet, il a été montré que la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* des cellules B16F1 est augmentée en présence de peptides d'élastine. Ces effets impliquent notamment une sur-régulation de l'expression et de l'activation de la MMP-1 murine, Mcol-A, responsable de l'amélioration des capacités migratoires et invasives des cellules B16F1 (Devy et al., 2010).

2. Cellules primaires

a) Les fibroblastes

Les fibroblastes dermiques humains utilisés durant cette étude sont obtenus à partir d'explants de peau provenant d'une femme de 33 ans ayant subi une réduction des paupières. Ce sont des cellules primaires adhérentes d'origine mésenchymateuse, présentant de long prolongement cytoplasmique fusiforme avec un cytoplasme riche en organites. Les fibroblastes prédominent dans les tissus conjonctifs, synthétisent les éléments de la MEC incluant la tropoélastine, les collagènes de type I et III, des protéoglycannes, la thrombospondine, la fibronectine, etc…: cette matrice leur permet de maintenir leur caractère différencié. Ils synthétisent également les protéases intervenant dans le catabolisme et le renouvellement des constituants matriciels dont de nombreuses MMPs. Les fibroblastes se distinguent de beaucoup de types cellulaires par leur capacité à conserver leur morphologie en culture. A confluence, le phénomène d'inhibition de contact contraint les fibroblastes en culture à limiter leur prolifération et à constituer une monocouche cellulaire, caractéristique des fibroblastes normaux (Adolphe M et Barlovatz-Meimon G, 1988).

Les fibroblastes sont des cellules stromales activement impliquées dans le développement de la réaction stromale. En effet, ils synthètisent des protéinases, de type

métalloprotéinase (MMPs), capables de dégrader la matrice extracellulaire, favorisant ainsi la migration des cellules tumorales et la progression de la tumeur. En particulier la collagénase-1 (MMP-1), fortement exprimée par les fibroblastes, est capable de dégrader le collagène présent dans la matrice extracellulaire.

b) Les cellules endothéliales HUVECs

Les cellules endothéliales HUVECs (*human umbical vein endothelial cell*s) proviennent de veine de cordon ombilical humain. Ce sont des cellules primaires adhérentes qui s'utilisent avant le 6ème passage maximum (Bala et al., 2011). Elles sont extraites, conservées et commercialisées par Lonza (CC-2519). Les cellules endothéliales, d'une manière générale, jouent un rôle important dans la réaction stromale lors de la progression tumorale. En effet, durant la progression tumorale, la protéolyse matricielle permet la libération de peptides dérivés de la matrice, des matrikines, dotés d'activités biologiques qui leurs sont propres. Parmi eux, nous trouvons les peptides d'élastine qui sont capables de promouvoir l'angiogenèse en permettant la sur-expression de la métalloprotéinase membranaire de type 1 (MT1-MMP) (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005). La MT1-MMP est impliquée dans le processus de migration cellulaire permettant ainsi d'accroitre la vascularisation autour de la tumeur lui apportant ainsi l'oxygène, et les nutriments nécessaires au développement tumoral. L'angiogenèse participe également à la formation de métastases donnant naissance à des tumeurs secondaires.

B. Culture cellulaire

1. Décongélation de cellules primaires et de la lignée cellulaire

Toutes les cellules utilisées, que ce soit les cellules primaires ou la lignée, sont décongelées selon la même procédure. Les cellules endothéliales sont conservées dans de l'azote liquide dans un milieu de congélation adéquat, CryoSFM (Promocell), alors que les fibroblastes et les B16F1 sont conservées dans du milieu complet contenant 10% de cryoprotecteur, en l'occurrence du DMSO (Sigma). L'étape de décongélation doit être extrêmement rapide pour limiter la mort cellulaire induite par la cytotoxicité des substances cryoprotectrices utilisées pour conservées les cellules. La décongélation rapide est suivie de la mise en suspension des cellules dans 10 ml de milieu complet adéquat selon le type cellulaire. Les boîtes de culture sont mises en culture dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO_2. Après 24 h, le milieu est remplacé par du milieu frais. Quelque soit le type cellulaire utilisé, le milieu est changé tous les deux jours jusqu'à atteindre l'état de confluence.

2. Conditions de culture

Systématiquement, après chaque décongélation, la qualité des cultures cellulaires est vérifiée par l'absence de détection de mycoplasme, un procaryote dépourvu de paroi qui est capable d'altérer le métabolisme d'une cellule. La présence d'ADN mycoplasmique dans les culots cellulaires est recherchée par PCR.

a) Les lignée de mélanome B16F1

Les cellules de mélanome murin B16F1 sont des cellules épithélioïdes tumorigéniques adhérentes riches en mélanine. Elles sont utilisées jusqu'au passage 30 au-delà duquel la dérive génétique induit au cours du repiquage successif des cellules est trop importante. Les cellules B16F1 sont cultivées au 1/10ème dans une boîte de culture de 75 cm² contenant du milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) supplémenté de 10% de SVF et 1% d'antibiotiques. Le milieu de culture est changé tous les deux jours jusqu'à atteindre 90% de confluence. A l'état de confluence, les cellules sont lavées au PBS puis incubées 5 min à 37°C avec de la trypsine 1X. Les effets de cette dernière sont stoppés par l'ajout de milieu complet puis les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont resuspendues dans 5 ml de milieu complet puis comptées et ensemencées à la concentration voulue en boîtes et/ou en plaques de culture pour les différentes expériences dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO_2.

b) Les fibroblastes

1) Obtention des fibroblastes

Les fibroblastes dermiques humains sont isolés à partir de biopsies de peau de sujets sain, après obtention de leurs consentements, en collaboration avec le CHU Robert Debré de Reims. Les fragments de peau sont placés dans du PBS stérile et la couche adipeuse de l'hypoderme est éliminée afin d'éviter toute contamination avec des adipocytes. Les explants sont ensuite découpés en petits fragments et déposés dans une boîte de culture de 75 cm² contenant 10 ml de milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contenant 1 g de glucose et une source de glutamine stabilisée, le Glutamax®, supplémenté de 20% de sérum de veau fœtal (SVF, GE Healtcare), 1% d'antibiotique (pénicilline, streptomycine) et 1% de fungizone (Gibco). Les boîtes de culture sont ensuite mises en culture dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO_2. Le milieu est changé tous les deux jours. Au bout d'environ 4 semaines de culture, les fibroblastes sortent des explants et atteignent rapidement l'état de confluence. Ils sont ensuite

trypsinés et comptés puis sont soit congelés à raison de 800 000 cellules par cryotube dans du milieu complet supplémenté de 10% de DMSO, soit réensemencés dans une boîte de culture à hauteur de 1 million de cellules par boîte.

2) Entretien des fibroblastes

Les fibroblastes dermiques humains utilisés dans les différentes expériences sont issus des passages compris entre 1 et 8. Ils sont cultivés à raison de 1 million de cellule par boîte de culture de 75 cm² dans du DMEM dit complet contenant 1 g de glucose, du glutamax®, additionné de 10% de SVF, 1% d'antibiotiques contenant de la pénicilline et de la streptomycine. Le milieu est changé tous les deux jours. Une fois l'état de confluence atteint, les cellules sont rincées au PBS puis incubées 5 min à 37°C avec de la trypsine 1X. Les effets de la trypsine sont arrêtés avec du milieu complet. Les cellules sont ensuite homogénéisées et centrifugées à 400 g pendant 10 min à température ambiante. Après avoir resuspendues les cellules dans du milieu complet, les cellules sont comptées et ensemencées à la concentration voulue et remises en culture en atmosphère humide à 37°C et 5% CO_2.

c) Les cellules endothéliales HUVECs

Les cellules endothéliales HUVECs sont des cellules primaires adhérentes (Lonza). Elles sont utilisées avant le 6ème passage et cultivées à raison de 10 000 cellules par cm² dans du milieu spécifique à leur croissance (ECGM2) supplémenté de SVF, rhEGF (*recombinant human epidermal growth factor*), héparine, sulfate de gentamicine et amphoptericine-B, R^3-IGF-1 (*recombinant long R insulin-like growth factor-1*), rhFGF-B (*recombinant human fibroblast growth factor-B*), hydrocortisone, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de l'acide ascorbique. Les concentrations des suppléments sont maintenues confidentielles par le fournisseur. Une fois l'état de confluence atteint, les cellules sont rincées au PBS puis trypsinées 5 min à température ambiante. Les effets de la trypsine sont arrêtés avec du milieu de croissance contenant du SVF puis les cellules sont centrifugées à 200 g pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont resuspendues puis remises en culture dans des boîtes de culture de 25 ou 75 cm² dans une atmosphère humide à 37°C et 5% de CO_2.

3. Mise au repos des cellules

La mise au repos des cellules correspond à la privation en facteurs de croissance, contenus dans le SVF. Cette étape permet d'une part d'éteindre les voies de signalisation correspondantes et, d'autre part, de synchroniser les cellules au même stade du cycle cellulaire de façon à ce

qu'elles répondent de façon coordonnée à une stimulation par un agoniste. A environ 80-90% de confluence, les cellules sont mises au repos. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS pour éliminer le SVF résiduel, puis elles sont mises en présence de milieu de repos, qui diffère selon le type cellulaire utilisé, pendant 24 h à 37°C sous une atmosphère humide à 5% CO_2. Les cellules de mélanome B16F1 sont mises au repos dans du milieu RMPI dépourvu de SVF. Pour les fibroblastes, les cellules sont mises au repos avec du DMEM dépourvu de SVF contenant 1% d'antibiotiques. Pour les cellules endothéliales, le milieu de repos est constitué de milieu basal spécifique aux cellules endothéliales (ECBM2) supplémenté de 0,5 % (v/v) de SVF, 0,4% ECGS (*endothelial cell growth serum*), d'un tube d'acide ascorbique et d'un tube d'hydrocortisone. Les concentrations de ces deux derniers composés sont maintenues confidentielles par le fournisseur.

4. Traitements des cellules

a) Préparation de kappa élastine

La κ-élastine (kE) est préparée à partir d'élastine insoluble extraite de ligaments larges de nuque de bœuf. Ces prélévements ont été obtenus auprès de l'abattoir de Rethel (société SOBEVIR).

Les ligaments sont prédécoupés puis conservés à -80°C, température à laquelle le ligament devient rigide. Les morceaux congelés sont broyés dans un broyeur mécanique à billes métalliques réfrigéré à l'azote liquide. Le broyat est alors homogénéisé à raison de 100 ml par gramme de tissu broyé dans une solution de NaCl à 0,15 M contenant des inhibiteurs de protéases (N-éthylmaleimide (NEM) 10 mM, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 2 mM, 2mM d'ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) 2 mM) et 0,02% d'azide de sodium pendant 24 h à 4°C sous agitation lente pour extraire les protéines solubles. La solution est ensuite centrifugée à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot subit ensuite deux autres extractions de 24 h selon la même procédure. Le culot est alors lavé au méthanol à raison de 20 ml par gramme de tissu puis centrifugé à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le broyat est ensuite délipidé deux fois dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) pendant 24 h sous agitation lente à 4°C. Après trois lavages au méthanol par centrifugation à 30 000 g pendant 30 min à 4°C, le culot est asséché par évaporation à température ambiante sous une hôte à flux laminaire jusqu'à ce qu'il soit totalement sec. Ce dernier est ensuite repris dans de l'eau ultra pure pour éliminer les traces de méthanol résiduelles puis centrifugé à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le broyat est

hydrolysé trois fois 15 min dans de la soude à 0,1 N chauffée à 98°C puis refroidi dans de la glace entre chaque hydrolyse. Cette méthode permet la dégradation de toutes les protéines insolubles du ligament à l'exception de l'élastine. L'hydrolysat est alors rincé dans de l'eau ultra pure et le pH est ensuite ajusté à 7. Cette étape est répétée jusqu'à ce que le pH soit stabilisé à pH 7 lors de la resuspension du culot. A l'issue de cette étape, l'élastine est rincée dans du méthanol puis elle subit une seconde délipidation dans un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) pendant 24 h à 4°C sous agitation lente. L'élastine pure est ensuite rincée au méthanol puis à l'acétone par centrifugation de 30 000 g pendant 30 min à 4°C et mise à sécher sous une hôte à flux laminaire.

Le niveau de pureté de l'élastine ainsi obtenue est analysé par HPLC (high performance liquid chromotagraphy). Ainsi, en analysant la composition en acides aminés, nous sommes capables d'estimer le niveau de pureté de l'élastine. Par exemple, la présence d'hydroxyproline permet de détecter une potentielle contamination en collagène. L'élastine que nous avons utilisée pour obtenir de la kE provient de lots purs dépourvus de trace de collagène et d'autres protéines matricielles (Annexe 1).

L'élastine purifiée peut être ensuite solubilisée par la potasse en milieu éthanolique, cette technique permettant de générer des peptides d'élastine solubles en milieu aqueux appelés κ–élastine (kE).

L'élastine purifée (2,5 g) est mise en suspension à raison de 50 ml de potasse éthanolique (mélange 80/20 (v/v) éthanol/eau et 1 M de KOH) pour 100 mg d'élastine. Le mélange est mis sous agitation rotative sur un rotavapeur pendant 2 h à 37°C favorisant ainsi une bonne hydrolyse de l'élastine. L'hydrolysat est centrifugé à 30 000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot d'élastine non solubilisée est alors soumis à une seconde hydrolyse dans les mêmes conditions. L'hydrolysat total est neutralisé à 4°C par de l'acide perchlorique pur jusqu'à stabilisation du pH à 7, puis la solution est décantée toute la nuit à 4°C. Après centrifugation à 30 000 g pendant 30 min à 4°C, les sels de perchlorate formés au cours de la neutralisation sont éliminés. Le surnageant contenant la kE est dialysé pendant deux jours dans de l'eau distillée régulièrement renouvelée puis il est lyophilisé.

Les peptides ainsi générés présentent une grande hétérogénéité. La composition peptidique est alors analysée par spectroscopie de masse en collaboration avec le Dr Schmelzer (Université de Halle-Wittenberg, Allemagne).

b) Stimulation avec de la kappa élastine

Les cellules sont ensemencées dans leurs milieux d'entretien respectifs en plaque 96, 24 ou 6 puits, selon l'expérience, dans un volume final de 200 µl, 1 ml ou de 2 ml respectivement. Les cellules atteignent l'état de confluence après 48 h de culture. Elles sont ensuite mises au repos dans les conditions citées précédemment. Les cellules sont stimulées à la kE à raison de 50 µg/ml préparée dans le milieu de repos adéquat, selon le type cellulaire, pendant 30 min à 24 h selon l'expérience. Au terme du temps de stimulation, les surnageants sont récupérés pour l'analyse des molécules sécrétées. Les cellules sont lavées au PBS et récupérées pour analyse des protéines ou des ARNm.

c) Stimulation avec des peptides synthétiques

La bioactivité de la kE est associée à la présence de peptides possédant la séquence consensus GxxPG qui adopte une structure active en coude β de type VIII (Brassart et al., 2001). Afin de valider les résultats obtenus par la kE mais également pour confirmer l'implication du complexe récepteur de l'élastine dans les effets observés, des peptides synthétiques ont été utilisés comme contrôles. Le peptide VGVAPG, possédant la séquence GxxPG, est utilisé comme contrôle positif alors que le peptide « scramble » VVGPGA est utilisé comme contrôle négatif. Les deux peptides synthétiques ont été synthétisés par la société GeneCust (Luxembourg). L'ensemencement ainsi que les temps de stimulation sont les mêmes que ceux utilisés pour les stimulations à la kE. Néanmoins, en accord avec la littérature (Brassart et al., 2001), la concentration utilisée pour les peptides synthétiques est 4 fois supérieure à celle de la kE, soit 200 µg/ml.

d) Inhibiteurs utilisés

Dans le but de bloquer les effets des peptides d'élastine, tant sur le développement tumoral que sur le stroma, nous avons utilisé plusieurs stratégies ciblant le complexe récepteur de l'élastine.

1) Inhibiteur de la Neuraminidase-1

Le 2-deoxy-2,3-dehybro-N-acetylneuraminic acid (Dana) est un inhibiteur chimique compétitif non spécifique des sialidases (Merck). Il bloque donc l'activité enzymatique de la sous unité Neu-1 du complexe récepteur de l'élastine et donc les effets induits par les peptides d'élastine. Comme décrit précedemment (Duca et al., 2007), nous avons prétraité les cellules avec du Dana

préparé extemporanément à 400 µM dans du milieu de culture adapté aux types cellulaires utilisés pendant 1 h à 37°C avant l'ajout des peptides d'élastine.

2) Antagoniste de l'Elastin Binding Protein (EBP)

Le peptide synthétique V14 (VVGSPSAQDEASPL) a été utilisé comme antagoniste de l'EBP. Cette séquence de 14 résidus est présente dans la séquence V32 spécifique du domaine de liaison des peptides d'élastine. Ce peptide a été décrit comme agissant tel un récepteur « soluble » en piégeant les peptides d'élastine, bloquant ainsi leur liaison à l'EBP et inhibant leurs effets (Robinet et al., 2007; Toupance et al., 2012). Pour cela, le peptide V14 a été préparé extemporanément à 1,3 µM dans du milieu de culture adapté aux types cellulaires utilisés puis co-incubé avec les peptides d'élastine au ratio molaire 2:1 pendant au moins 30 min à température ambiante. Enfin, le mélange V14 : peptide d'élastine est ensuite incubé sur les cellules pendant 30 min à 24 h selon l'expérience. Ce peptide a été synthétisé par la société GeneCust (Luxembourg).

C. Analyse du phénotype cellulaire

1. Mise en place d'un modèle de vieillissement *in vitro* appliqué à des cellules primaires endothéliales et fibroblastes dermiques humains

Au cours du développement tumoral, le stroma, joue un rôle crucial et participe activement à l'évolution de la pathologie. Néanmoins, ce dernier peut être altéré par le vieillissement. Nous avons ainsi eu recours à un modèle de vieillissement cellulaire *in vitro* appliqué à des fibroblastes dermiques humains et les cellules endothéliales (HUVECs), afin de mimer cela.

Ces modèles ont été générés par repiquages successifs de cellules primaires en culture jusqu'à atteindre l'état de sénescence cellulaire. De manière intéressante, il a été montré que le vieillissement *in vitro* est capable de reproduire les mêmes modifications cellulaires et d'expression de gènes que le vieillissement *in vivo* démontrant la pertinence de ce modèle (Chen et al., 2013; Rubin, 1997).

Les cellules endothéliales HUVECs et les fibroblastes dermiques humains sont cultivés en boîtes de culture dans les conditions précédemment décrites. A l'état de confluence, celles-ci sont repiquées par trypsinisation puis ensemencées en boîtes de culture permettant ainsi de les faire vieillir artificiellement de manière physiologique. A chaque passage, l'état général des cellules est caractérisé afin de déterminer l'état de sénescence cellulaire. Pour cela des

marqueurs spécifiques sont recherchés : le changement morphologique, la diminution des capacités prolifératives, l'augmentation de l'expression de la β-galactosidase acide, l'augmentation des ROS. Nous avons ainsi pu distinguer trois passages d'intérêt pour les fibroblastes : le passage p3 représentant les cellules jeunes, p5 pour des cellules au phénotype dit « intermédiaire » et p8 possédant les caractéristiques de cellules âgées. Le vieillissement des cellules endothéliales HUVECs est représenté par les passages p2 pour les cellules jeunes, p4 pour des cellules intermédiaires et p6 pour les cellules âgées.

2. Mesure de la prolifération cellulaire par numération

Les cellules sont ensemencées en plaque de 24 puits à raison de 30 000 à 50 000 cellules par puits selon le type cellulaire. Après 24 h d'adhérence, les cellules sont mises au repos par privation de sérum pendant 24 h. Les cellules sont ensuite traitées ou non puis incubées 48 h à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2. Après 48 h, les cellules sont décollées par la trypsine, puis diluées au demi dans du bleu Trypan afin de vérifier la viabilité cellulaire et comptées en cellules de KOVA. Chaque condition est réalisée en triplicat.

3. Détection de la β-galactosidase acide (pH 6)

L'expression de la β-galactosidase à pH 6 est un biomarqueur connu de la senescence cellulaire (Chuaire-Noack et al., 2010). Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 100 000 cellules par puits dans du milieu adéquat selon le type cellulaire. Après 48 h de culture, le marquage de la β-galactosidase à pH acide est réalisé par un kit nommé « β-galactosidase staining kit » (Cell Signaling). Conformément aux instructions du fournisseur, les cellules sont lavées deux fois délicatement au PBS puis fixées 10 min à température ambiante avec la solution de fixation fournie contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde. Après deux lavages doux au PBS, les cellules sont incubées une nuit à 37°C avec la solution de marquage de la β-galactosidase contenant 40 mM d'acide citrique / phosphate de sodium pH6, 150 mM de NaCl, 2 mM de $MgCl_2$, 1X de la solution de marquage A contenant 5 nM de potassium ferrocyané, 1X de la solution de marquage B contenant 5 nM de potassium ferricyané et 1 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Ainsi, les cellules senescentes exprimant la β-galactosidase à pH acide sont colorées en bleu permettant de les distinguer et de les énumérer. Les cellules sont ensuite observées au microscope optique et trois photos par puits sont prises. Les cellules marquées sont comptées. Chaque condition est réalisée en triplicat.

4. Etude de la migration cellulaire

Les cellules sont ensemencées en plaques 6 puits à raison de 200 000 à 300 000 cellules par puits selon le type cellulaire. Après 48 h de culture, les cellules atteignent 80% de confluence. Elles sont alors mises au repos par privation de sérum pendant 24 h. Une blessure cicatricielle homogène et droite au milieu de chaque puits est réalisée à l'aide de la pointe d'un cône puis les cellules sont ensuite délicatement lavées au PBS afin d'éliminer les cellules décollées pendant la formation de la blessure. Les cellules sont alors stimulées avec les différents traitements pendant 24 h. Des images sont régulièrement prises afin de suivre la migration cellulaire allant de T0h à T24h. Des marques de repères, trois par puits, sont réalisées le long de la blessure pour faciliter l'analyse et placer le microscope toujours au même endroit lors de l'acquisition des images. Chaque condition est réalisée en triplicat.

D. Analyse des expressions protéiques et de leur fonctionnalité

1. Dosage de la sécrétion de la MMP-1 par ELISA

Le dosage de la MMP-1 humaine a été réalisé à l'aide d'un kit ELISA-MMP-1 commercial selon le protocole établi par le fournisseur (Calbiochem, QIA55). Brièvement, 100 µl de MMP-1 standard dilués et de milieux conditionnés expérimentaux sont déposés dans une plaque 96 puits, dont les puits sont recouverts d'un anticorps monoclonal de souris anti-MMP-1 humaine. La plaque est ensuite incubée à température ambiante pendant 2 h. Après 5 lavages avec 400 µl de PBS, 100 µl d'anticorps monoclonal anti-MMP-1 conjugué à une peroxydase de raifort sont ajoutés puis la plaque est incubée pendant 1 h à température ambiante. Après 5 lavages avec 400 µl de PBS, 100 µl de substrat chromogénique (tétra-méthylbenzidine ou TMB) sont déposés dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. La réaction est stoppée par ajout de 100 µl d'acide sulfurique 2,5 N. L'absorbance est alors mesurée à une double longueur d'onde (450/540 nm) par un lecteur de microplaques spectrofluorimètre Infinite® F200 Pro couplé au logiciel Magellan (TECAN).

2. Obtention d'extraits protéiques totaux cellulaires

Après arrêt de la stimulation par ajout de PBS glacé contenant 50 µM de Na_3VO_4, les cellules sont lavées deux fois dans le même tampon et sont décollées de leur support par grattage dans du tampon de lyse (PBS pH 7,4, 0,5 % (v/v) Triton X-100, β-glycérophosphate 80 mM, EGTA 50 mM, $MgCl_2$ 15 mM, Na_3VO_4 2 mM, 10 mM de NaF) et un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma) dilué à 1/1000. Les extraits protéiques totaux sont ensuite soumis à sonication

pendant deux fois 10 secondes dans ce tampon puis placés à 4°C pendant 20 min. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation (20000 g, 4°C, 45 min). Le surnageant est ensuite transféré dans un nouveau tube et conservé à -20°C.

3. Obtention des protéines membranaires « crude membrane »

Les cellules sont ensemencées en boîte de pétri à raison de 1 million par boîte dans du milieu complet adapté au type cellulaire. A l'état de confluence soit 48 à 72 h après ensemencement, les cellules sont mises au repos par privation de sérum pendant 24 h puis stimulées avec les différents traitements pendant 15 à 30 min, selon le type cellulaire. Les cellules sont rincées délicatement au PBS puis les « crude » membranes sont préparées dans du tampon TEM pH 7,5 contenant 75 mM de Tris à pH 7,5, 2 mM d'EDTA, 12 mM $MgCl_2$, 1 mM Na_3VO_4, 10 mM de NaF et un cocktail d'inhibiteurs de protéases dilué au 1/1000ème. Les extraits cellulaires sont ensuite soniqués deux fois 20 secondes et une fois 10 secondes puis centrifugés (600 g, 4°C, 10 min) afin d'éliminer les fractions nucléaires et les cellules non lysées. Les surnageants sont récupérés et centrifugés de nouveau (20 000 g, 4°C, 45 min). Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est conservé et les culots de membranes sont resuspendus dans le tampon au volume voulu puis conservés à -20°C.

4. Analyse de l'expresion protéique par Western Blot

Une quantité égale de protéines est diluée dans du tampon échantillon 5X (0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,5% bleu de bromophénol (p/v), 10% de SDS (p/v), 20% saccharose (p/v), 25% β-mercaptoéthanol (v/v)). Les échantillons protéiques sont ensuite chauffés à 100°C pendant 5 min et analysés par SDS-PAGE. La migration s'effectue sous une tension constante de 80 V dans un tampon de migration (25 mM de Tris pH 8,3, 192 mM de glycine, 0,1% de SDS (p/v)). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert Bio-Rad (Marne-la-Vallée, France). Le transfert est effectué dans un tampon de transfert (20 mM de Tris, 150 mM de glycine, 20% de méthanol (v/v)) pendant 1,5 h à 4°C sous une tension constante de 70 V. L'efficacité du transfert est vérifiée en visualisant les protéines par coloration de la membrane pendant 10 min avec une solution de rouge ponceau S à 0,2 % (p/v) dans de l'acide trichloroacétique 3 % (p/v) diluée dans de l'eau distillée. La membrane est ensuite saturée pendant 1 h à température ambiante dans une solution de blocage composée soit de 5 % (p/v) de lait non gras dilué dans du *Tris buffered saline-tween* (TBS-T) (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,1 % Tween 20 (v/v)) ou soit de 5% (p/v) de BSA

(Bovin Serum Albumin) dilué dans du TBS-T. Les anticorps primaires anti-ERK 1/2 et anti-phospho-ERK 1/2 (dilution 1/1000), anti-Neu-1 (dilution 1/200), anti-β-actine (1/4000), anti-PPCA (dilution 1/1000), anti-EBP (dilution 1/500), anti-MMP1 (dilution 1/500) sont incubés toute la nuit à 4°C sous agitation dans la solution de blocage. Le lendemain, après cinq lavages de 5 min au TBS-T, la membrane est incubée 1 h à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire, couplé à la peroxydase ou à un fluorochrome émettant dans l'infrarouge à 800 nm, dilué dans du lait à 5 % (p/v) avec du TBS-T ou de la BSA à 5% (p/v) TBS-T. Après 5 lavages de 5 min au TBS-T suivis de deux lavages de 10 min au *Tris buffered saline* (TBS) (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl), les protéines sont révélées par chimiluminescence (kit ECL, Millipore, GE Healthcare, Orsay, France) pour les anticorps couplés à la peroxydase ou directement révélées pour les secondaires couplés à un fluorochrome. Afin de vérifier l'égalité des dépôts protéiques, les anticorps sont découplés de la membrane par deux bains de 30 min dans de la glycine 100 mM à pH 2,5 puis le pH est doucement remonté par trois bains de 10 min dans du TBS. La membrane est ensuite saturée avec la solution de blocage et incubée avec un anticorps anti-β-actine selon le protocole décrit précédemment. Les anticorps utilisés sont recensés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Anticorps utilisés en Western Blot

Anticorps	Type / Origine	Utilisation/solution de dilution	Dilution
Anti-ERK1/2	Polyclonal de lapin (Cell signaling)	Primaire (Lait 5% TBS-T)	1/1000
Anti-pERK1/2	Polyclonal de souris (Santa Cruz)	Primaire (Lait 5% TBT-T)	1/1000
Anti-β-Actine	Polyclonal de chèvre (Santa Cruz)	Primaire (Lait 5% TBS-T)	1/5000
Anti-Neu-1	Polyclonal de souris (Santa Cruz)	Primaire (BSA 5% TBS-T)	1/200
Anti-PPCA	Polyclonal de lapin (A. D'Azzo)	Primaire (BSA 5% TBS-T)	1/1000
Anti-MMP-1	Polyclonal de souris (Santa Cruz)	Primaire (BSA 5% TBS T)	1/500

Anti-Rabbit-HRP	Anticorps de lapin chèvre peroxydase (Cell signaling)	Secondaire (adapté à l'anticorps primaire)	1/5000
Anti-mouse-800	Anticorps de chèvre couplé fluorochrome 800 (Perce)	Secondaire (adapté à l'anticorps primaire)	1/10 000
Anti-Rabbit-800	Anticorps de chèvre couplé fluorochrome 800 (Perce)	Secondaire (adapté à l'anticorps primaire)	1/10 000
Anti-goat-HRP	Anticorps de lapincouplé peroxydase (Sigma)	Secondaire (adapté à l'anticorps primaire)	1/5000

5. Analyse de l'activité sialidase

a) Mesure de l'activité sialidase : para-nitrophenyl-NANA

Le *para-nitrophenyl-N-acetyl neuranimic acid* (NANA) est un substrat chromogènique des sialidases qui permet de mesurer l'activité enzymatique de ces dernières. Le clivage du *para*-nitrophenyl-NANA entraine la libération d'un acide sialique et d'un chromogène de couleur jaune qui peut être dosé par absorbance à 405 nm. La coloration émise par le chromogène après clivage est proportionnelle à l'activité sialidase présente dans l'échantillon. Celle-ci est mesurée sur des préparations membranaires grossières, nommées « *crude membranes* ». Cette méthode permet de mesurer l'activité sialidase membranaire, dont celle de la neuraminidase-1 présente dans le complexe récepteur de l'élastine, et de s'affranchir des sialidases cytosoliques.

A l'issue de la préparation des membranes, les culots membranaires sont repris dans du tampon MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) à 20 mM pH 7. Après dosage des protéines, 50 µg de membranes sont déposés dans un puits de plaque à 48 puits contenant au préalable 5 mM de *para*-nitrophenyl-NANA. Le volume final est complété à 200 µl avec du tampon MES pH 7 en présence ou non de peptides d'élastine à 50 µg/ml. La plaque est incubée 4 h à 37°C à l'abri de la lumière puis la réaction est stoppée par ajout de 300 µl de Na_2CO_3 à 1 M. La coloration jaunâtre apparue lors de l'arrêt de la réaction est ensuite dosée par absorbance à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN).

b) Analyse de la production de lactosylcéramide

L'activation de la neuraminidase-1 (Neu-1) induite par les peptides d'élastine entraine une diminution du contenu cellulaire en GM_3 en faveur d'une augmentation en lactosylcéramide suggérant ainsi une conversion du GM_3 en lactosylcéramide (Allende et al., 2000). Le lactosylceramide produit, après stimulation aux peptides d'élastine, est détecté de la manière suivante.

Les cellules sont ensemencées à raison de 100 000 cellules par puits sur des lamelles en verre préalablement disposées dans une plaque de 24 puits dans du milieu adapté au type cellulaire. Après 48 h de culture, les cellules atteignent environ 80% de confluence. Elles sont alors mises au repos pendant 24 h. Les cellules sont stimulées ou non selon les conditions citées ci-dessus puis immédiatement fixées au paraformaldéhyde 2% (PFA) dans du PBS pendant 20 min à température ambiante pour stopper la réaction. Les cellules sont lavées trois fois au PBS puis les sites non spécifiques sont saturés avec de la BSA 3% dans du PBS pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite marquées avec un anticorps anti-CD17 (lactosylcéramide)-FITC ou un isotype contrôle-FITC pendant 1 h à température ambiante à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées trois fois au PBS puis la fluorescence est mesurée par spectrophotomètriepour une longueur d'onde d'excitation à 495 nm et d'émission à 520 nm

Dans certaines expériences, la présence de LacCer a été évaluée par cytomètrie en flux. Les cellules sont ensemencées à raison de 500 000 cellules par boîte de culture de 10 cm de diamètre pendant trois jours dans du milieu de culture adapté au type cellulaire. Les cellules sont ensuite stimulées ou non aux peptides d'élastine en présence ou non de Dana (400 µM) selon les conditions précédemment décrites. Après un lavage au PBS froid, les cellules sont décollées avec de l'EDTA 2mM pendant 10 min à température ambiante puis lavées dans du tampon FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) contenant 2% de SVF et 1 mM d'EDTA et centrifugées (400 g, 5 min, 4°C). L'anticorps primaire anti-CD17-FITC (lactosylcéramide) ou l'IgM isotype contrôle couplée au FITC dilués au $1/25^{ème}$ sont incubés avec les cellules pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont alors lavées dans du tampon FACS par centrifugation puis fixées dans du tampon de fixation contenant 1% de paraformaldéhyde et 1 mM d'EDTA puis analysées au cytomètre FACS Calibur (Becton Dickinson) appartenant au Service Commun de Cytométrie en flux de la SFR CAP Santé.

c) Analyse du GM_3 par imagerie d'immunofluorescence

Afin d'étudier la co-localisation des sous-unités du complexe récepteur de l'élastine ainsi que la présence de GM3, deux des trois sous-unités ont été marquées et observées par immunofluorescence. Pour cela, les cellules sont ensemencées entre 30 000 et 50 000 cellules sur des lamelles en verre dans des plaques 24 puits dans du milieu adapté. Après 24 h d'adhérence, les cellules sont stimulées dans les conditions précédemment décrites puis la réaction est stoppée par ajout de PBS contenant 2 mM de Na_3VO_4. Les cellules sont ensuite fixées pendant 10 min à température ambiante dans du PFA 4% puis lavées trois fois au PBS. Les sites non spécifiques sont saturés pendant 1 h à température ambiante avec de la BSA 3% dans du PBS puis incubées une nuit à 4°C dans de la BSA 0,3% dans du PBS avec les anticorps primaires : anti-PPCA (1/500), anti-GM_3 (1/500), anti-Neu-1 (1/250). Les cellules sont rincées trois fois pour éliminer l'anticorps en excédant puis les anticorps secondaires anti-mouse-AlexaFluor-488 ou anti-rabbit-AlexaFluor-568 sont incubés pendant 1 h à température ambiante à l'abri de la lumière. L'excédent est éliminé par trois lavages au PBS. Les lamelles sont montées sur lame grâce à ProLong® Gold Antifade Mountant (Invitrogen) contenant du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) permettant de marquer les noyaux des cellules. Les lames sont observées en microscopie confocale (microscope Zeiss, plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire de la SFR CAP Santé).

E. Analyse de l'expression des ARN messagers (ARNm)

1. Extraction des ARNm

Les cellules sont ensemencées en plaques 6 puits à raison de 200 000 à 300 000 cellules par puits dans du milieu complet adapté au type cellulaire. Après 48 h de culture, les cellules sont mises au repos par privation de sérum puis stimulées ou non avec des peptides d'élastine dans les conditions précédemment citées. Après 24 h de traitement, les surnageants sont récupérés pour l'analyse des protéines sécrétées et le tapis cellulaire est utilisé pour l'extraction des ARNm. Pour cela, 500 µl de Trizol est ajouté dans chaque puits sachant que deux puits par condition sont ensuite poolés, soit un volume final de 1 ml de Trizol par condition. Le tapis cellulaire est lysé par aspiration/refoulement du Trizol puis transvasé dans des tubes de 2 ml. Les tubes sont vortexés fortement jusqu'à ce que l'aspect visqueux laisse place à une solution plus liquide puis les tubes sont incubés 5 min à température ambiante. On ajoute alors 200µl du mélange chloroforme/*isoamylic alcohol* (IAA) (24:1, v/v). Après une agitation vigoureuse, une incubation de 3 min est réalisée à température ambiante suivie d'une centrifugation (12 000 g,

4°C, 15 min). Cette étape permet de séparer les protéines, les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARNs) en trois phases distinctes. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récupérée très délicatement et transférée dans un tube de 1,5 ml avec 500 µl d'isopropanol et mélangée par inversion. Après avoir incubé les tubes 10 min à température ambiante, ils sont centrifugés (12 000 g, 4°C, 10 min). Cette étape permet de faire précipiter les ARNs sous forme de pelote. Les surnageants sont éliminés et les culots d'ARNs sont lavés dans 1 ml d'éthanol 75% puis centrifugés (7 500 g, 4°C, 5 min). Le surnageant est éliminé et les culots d'ARNs sont séchés à température ambiante puis repris dans 10-20 µl d'eau ultra pure, selon la taille du culot, et conservés à -20°C.

2. Dosage et vérification de la qualité des ARNs

Une fois extraits, les ARNs sont dosés par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm. Pour ce faire, ils sont dilués au 1/20ème dans de l'eau ultra pure dépourvue d'ARNase puis passés au spectrophotomètre. Par la suite, tous les ARNs sont remis à une concentration de 100 ng/µl et leur qualité est vérifiée par analyse sur gel d'agarose 1% (p/v) contenant 0,0025% de bromure d'éthidium (BET, v/v), un agent intercalant des acides nucléiques. Après avoir vérifié l'absence de bande contaminante du type ADN génomique et la non-dégradation des ARNs, ils sont conservés à -20°C.

3. Rétrotranscription des ARNs et PCR de vérification

L'étape de transcription inverse, également appelée rétrotranscription, consiste à transcrire de manière inverse la séquence d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) *via* une enzyme spécifique, une rétrotranscriptase. Pour ce faire, les ARNs sont rétrotranscrits en ADNc par le « Verso cDNA Kit » (ThermoScientific). Pour chaque échantillons, 250 ng d'ARN (2,5µl) sont rétrotranscrits dans un mélange contenant 1X du tampon *cDNA synthesis* 10X, 0,5 mM de dNTP, d'oligodT, d'héxamères, d'enzyme VERSO mix, de *RT-enhancer* et complété à 20 µl avec de l'eau ultrapure dépourvue d'ARNase. La rétrotranscription s'effectue dans un thermocycleur (BioRad) selon le programme suivant : 42°C pendant 30 min puis 2 min à 95°C.

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est une technique de biologie moléculaire mise au point par Kary Mullis (Mullis et al., 1992), basée sur l'amplification génique de fragments d'ADN précis dans un échantillon en le multipliant spécifiquement. Cette technique permet de copier l'ADN *via* une enzyme, l'ADN polymérase, capable de synthétiser un brin complémentaire à partir d'amorces sens et anti-sens composées d'une vingtaine de bases

spécifiques du début et de la fin d'un gène cible à amplifier. La réaction comporte plusieurs étapes répétées n fois :

- Dénaturation de l'ADN cible s'effectuant généralement à 94°C.
- Hybridation des amorces, la température de cette étape est dépendante de la température de fusion appeler T_m (*melting Temperature*) des amorces utilisées.
- Elongation des amorces par la *Taq* polymérase, généralement à 94°C.

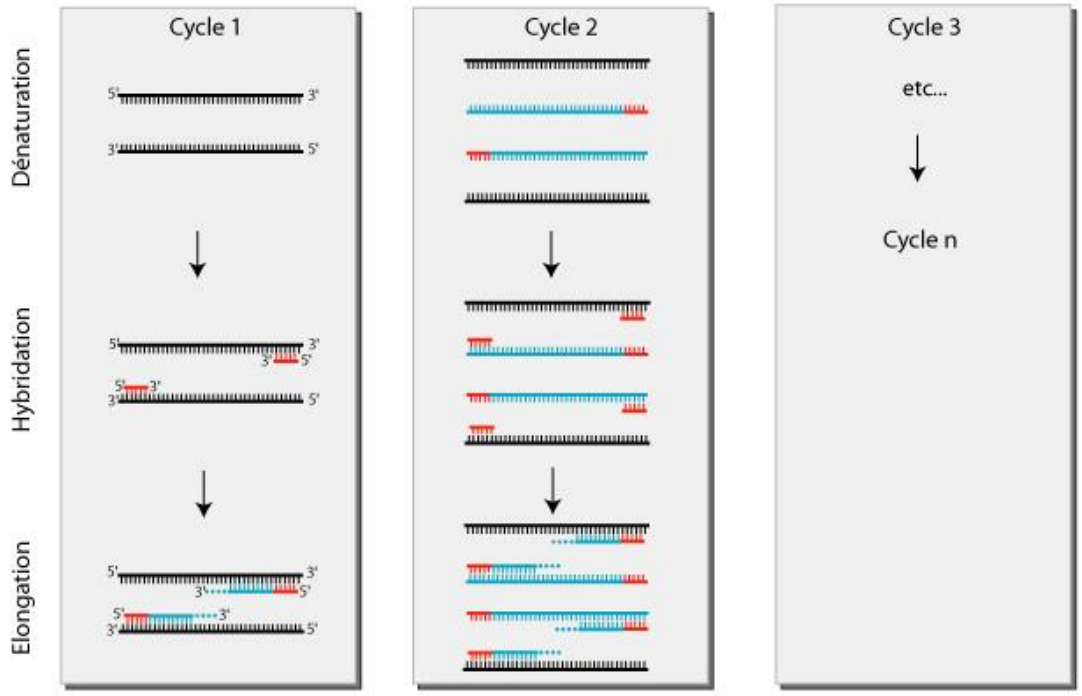


Figure 19. Schéma d'un cycle de PCR. Un cycle de PCR est constitué de trois étapes phares : la dénaturation, l'hydratation des amorces puis l'élongation des amorces formant ainsi au premier cycle deux ADNs double brin identitiques. Le second cycle est constitué des mêmes étapes donnant cette fois quatre ADNs double brin identiques. Le concept de la PCR est ainsi l'amplification d'un ADN permettant après n cycles d'être détectable.

La quantité de produit de PCR est proportionnelle à la quantité d'ADNc de départ directement associé à la quantité d'ARNm présent initialement dans l'échantillon avant la rétrotranscription.

Afin de vérifier la rétrotranscription, une PCR ciblant le gène de l'actine est réalisée selon la procédure suivante. Un mix est préparé pour la réaction de PCR contenant pour 1 réaction : 0,5 µl d'ADNc additionnés à 1X de tampon 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 0,4 µM d'amorces sens et anti-sens (Tableau 3), 0,1 µl de l'enzyme *Taq* polymérase, complétés à 25 µl avec de l'eau ultra-pure. La PCR est réalisée dans un thermocycleur (BioRad) selon le programme suivant : i) 94°C pendant 3 min permettant l'activation de l'enzyme *Taq* ;

ii) étape de dénaturation des brins d'ADNc à 94°C pendant 30 s ; iii) étape d'hybridation à 60°C pendant 30 s, température correspondant aux T_m des amorces ; iv) étape d'élongation à 72°C pendant 30 s. Ces trois dernières étapes sont répétées 30 fois puis la PCR se finit par une étape d'élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite vérifiés et analysés par migration sur gel d'agarose 1% contenant du BET.

Tableau 3. Listes des amorces utilisées en PCR

Amorces		Séquence	Amplicon
B-actine	Sens	5'-GTGTGACGTGGACATCCGC-3'	91 bp
	Anti-sens	5'-CTGCATCCTGTCGGCAATG-3'	

4. RT-qPCR

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique avec pour différence que l'amplification est mesurée tout au long de la réaction. Dans une qPCR, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent, ici le SYBR Green, dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Le SYBR Green est un agent intercalant qui émet un signal lorsqu'il se fixe dans le petit sillon de l'ADN double brin créé suite à l'hybridation et à l'élongation d'une amorce et ceci sans affecter la réaction de PCR. Cette méthode permet d'obtenir une cinétique de la réaction de PCR et ainsi de quantifier l'ADNc de départ. Au cours d'une réaction de qPCR, il existe une proportionnalité pendant la phase exponentielle correspondant au début du moment où le signal est supérieur au bruit de fond. Durant cette phase, plus la cible initiale est présente en quantité importante moins il y aura besoin de cycles d'amplification (appelé *Ct*, *threshold cycle*) pour que la fluorescence soit détectée à une valeur seuil définie. Ce seuil est déterminé arbitrairement par l'utilisateur et correspond à un niveau de fluorescence suffisamment bas, mais supérieur au bruit de fond, pour

que les courbes d'amplification soient dans la phase exponentielle d'amplification permettant ainsi la quantification au sein de l'échantillon en fonction de la valeur prise par *Ct*.

Les amorces des gènes d'intérêt et des gènes de référence utilisés dans cette étude sont synthétisées par Eurogentec. Elles sont référencées dans le tableau 4. Les amorces sont conçues de façon à ce que la température d'hybridation soit la même pour toutes (60°C). Pour chaque gène un « blanc » (ADNc remplacé par de l'eau ultra-pure) est réalisé pour vérifier l'absence d'amplification aspécifique. Pour chaque échantillon, l'expression des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à deux gènes de références, RS18 et RPL32, gènes dont l'expression génique évolue pas ou peu. Le volume réactionnel final est de 15 µl, contenant 5 µl d'ADNc dilué au 1/10ème dans de l'eau ultra-pure, 7,5 µl de SYBR Green, 9,3 µM d'amorces sens et anti-sens et 1,1 µl d'eau ultra-pure. Chaque cycle de PCR est constitué d'une étape d'activation de la *Taq* polymérase à 95°C pendant 15 min suivie de 40 cycles de 10 s à 95°C (dénaturation) puis 1 min à 60°C (hybridation, élongation). La RT-qPCR est réalisée sur un système de détection CFX-96 (Biorad).

Les données sont analysées par le logiciel CFX manager (Biorad) et sont présentés en 1/Δ*Ct*, c'est-à-dire en expression relative par rapport à un des gènes de ménage selon la formule suivante : 1 / (moyenne des *Ct* du gène d'intérêt – moyenne des *Ct* du gène de ménage RS18).

Le gène de ménage RS18 est choisi pour toutes les analyses de l'étude car il présente l'avantage d'avoir une expression plus stable que celle de RPL32.

Tableau 4. Liste des amorces utilisées en qPCR.

Amorces		Séquence	Amplicon (pb)
RS18	Sens	5'-GCAGAATCCACGCCAGTACAA-3'	208
	Anti-sens	5'-GCCAGTGGTCTTGGTGTGCT-3'	
RPL32	Sens	5'-CATTGGTTATGGAAGCAACAAA-3'	150
	Anti-sens	5'-TTCTTGGAGGAAACATTGTGAG-3'	
EBP	Sens	5'-TCCAGACATTACCTGGCAGCT-3'	111
	Anti-sens	5'-ATGTTGCTGCCTGCACTGTT-3'	
β-gal	Sens	5'-GCTGGTTATCCTGAGGCCC-3'	104
	Anti-sens	5'-CGGAGGAGCGGAGAAGAATA-3'	
NEU-1	Sens	5'-AATGCCCGAAACCAGAACAAC-3'	239
	Anti-sens	5'-CGCCATGAGGTACCATTGCT-3'	
PPCA	Sens	5'-AATCTCTATGCCCCGTGTGCT-3'	102
	Anti-sens	5'-TGGCAGGCGAGTGAAGATG-3'	

F. Etude de l'angiogenèse

1. Formation de pseudotubes sur Matrigel® et marquage à la calcéine

Les cellules endothéliales, cultivées sur un gel de Matrigel®, équivalent à une membrane basale, forment spontanément des structures en pseudotubes (Taraboletti and Giavazzi, 2004). Ces structures sont comparables à des vaisseaux sanguins mais non fonctionnels. Cette propriété est utilisée pour étudier les phénomènes de formation de néo-vaisseaux, ou angiogenèse. Une solution de Matrigel® (ECM gel : 10 mg/ml) est déposée stérilement dans des plaques 24 puits, à raison de 250 µl par puits, sur de la glace pilée. La polymérisation du gel est obtenue par incubation de la plaque à 37°C pendant 30 min. Des cellules HUVEC (80 000 cellules) sont ensuite déposées à la surface du gel et incubées dans le milieu ECGM additionné de 1 % de SVF, 1 µg/ml d'hydrocortisone (milieu EGGM minimum qui permet la survie mais pas la prolifération cellulaire) et stimulées par 30 ng/ml de VEGF, en présence ou en absence de peptides dérivés de l'élastine. La formation de pseudotubes est observée après 8 à 24 h d'incubation puis ils sont marqués à la calcéine-AM (*Calcein acetomethoxy*) permettant ainsi une meilleure visualisation. Pour cela, le milieu est délicatement éliminé et les pseudotubes sont incubés avec 1 µM de calcéine-AM pendant 1 h à l'abri de la lumière. Les pseudotubes sont ensuite lavés délicatement au PBS thermostaté puis le marquage est fixé au paraformaldéhyde 1%, observé et photographié au microscope à fluorescence (objectif ×10).

2. Analyse *ex vivo* de l'angiogenèse par la méthode des anneaux aortiques

Des aortes thoraciques sont isolées de souris C57B/J6 âgées de 8 semaines, qui sont ensuite transférées dans des boîtes de Pétri contenant du PBS. Les aortes sont rincées avec du PBS pour éliminer le sang résiduel, et l'adventice entourant l'aorte est soigneusement éliminée. Les aortes nettoyées sont transférées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu ECGM Low Serum. Les anneaux aortiques sont obtenus par découpe de section d'environ 1 mm à l'aide d'une lame de scalpel. Les extrémités des aortes utilisées pour maintenir l'aorte en place ne sont pas utilisées. Parallèlement, 100 µl de Matrigel® sont déposés dans une plaque 96 puits et placés à 37°C pendant 45 min pour permettre au Matrigel® de polymériser. Les anneaux sont rincés dans du milieu ECGM Low Serum frais et placés individuellement sur le revêtement de Matrigel®. Les anneaux sont recouverts de 30 µl supplémentaires de Matrigel® et placés à 37 °C pendant 45 min. Les anneaux sont ensuite stimulés dans les conditions précédemment décrites dans le milieu ECGM Low Serum additionné de 0,5 % (v/v) de SVF, 0,1 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF), 1 ng/ml de bFGF, 1 µg/ml d'hydrocortisone

complémenté de 100 unités/ml de pénicilline, 100 pg/ml de streptomycine, à raison de 200 µl par puits. Les milieux sont remplacés tous les 3 jours jusqu'à formation de néo-vaisseaux.

3. Analyse *in vivo* par méthode de « Matrigel plugs »

Du Matrigel® est incubé une nuit à 4°C en présence ou non des différents traitements précédemment cités. 250 ng/ml de bFGF recombinant et 25 unités/ml d'héparine sont ajoutés. Le mélange a été ensuite injecté (400 µl) en sous cutané sur le flanc d'une souris C57B/J6 âgées de 8 semaines. Le Matrigel ainsi injecté se solidifie pour former un « bouchon » ou « *plug* » sous la peau de la souris. Au bout de 15 jours, le bouchon est retiré et photographié, la formation de vaisseaux sanguins est estimée par dosage de l'hémoglobine présente dans le bouchon. Pour cela, les bouchons de Matrigel® sont homogénéisés dans 500 µl de tampon de lyse constitué de 1% de Triton-X100 dilué dans de l'eau. Après centrifugation à 5 000 g pendant 15 min, le surnageant est récupéré et l'hémoglobine est dosée par une méthode colorimétrique (kit de Drabkin reagent) basée sur l'oxydation par le ferrocyanide du Fe^{2+} de l'hémoglobine en Fe^{3+} pour former de la méthémoglobine. La méthémoglobine ainsi formé réagit à son tour avec le cyanure de potassium (KCN) pour former la cyanméthémoglobine, un composé très stable. La concentration de la cyanméthémoglobine est directement proportionnelle à la concentration d'hémoglobine et mesurée par absorbance à 560 nm.

G. Etude du développement tumoral en modèle murin

1. Analyse du développement tumoral *in vivo*

Les cellules de mélanome murin B16F1 sont trypsinées puis comptées à raison de 5 millions/ml dans un volume final de 350 µl par tube. Les cellules sont ensuite traitées avec des peptides d'élastine et/ou des antagonistes ou des inhibiteurs du complexe récepteur de l'élastine. Dans les 30 min qui suivent la préparation des cellules à injecter, les cellules sont transplantées en sous-cutanée dans le flanc des souris préalablement anesthésiées à l'isoflurane, identifiées par des boucles d'oreille et rasées. Le développement tumoral s'effectue sur 14 jours avec un rappel des traitements en péri-tumoral tous les 3 jours sous anesthésie à l'isoflurane. Une analyse précise du développement tumoral par palpation avant la détection visible de la tumeur puis par mesure de la taille de la tumeur au pied à coulisse est effectuée. Les souris sont pesées tous les 3 jours au moment des rappels afin d'identifier l'état général de celles-ci et adapter la suite du protocole en fonction de la perte de poids. En effet, une perte de poids importante est significative d'une évolution trop avancée de la tumeur et critique pour la suite

de l'étude impliquant la sortie du protocole pour la souris concernée. A partir du jour 9, puis tous les 3 jours jusqu'au 14ème jour de l'expérimentation, les souris sont passées au scanner microCT (50 keV, 200 ms, 50 mA) adapté au petit animal permettant un suivi de l'évolution de la tumeur en temps réel. Cet appareil apartient à la plateforme d'imagerie PICT de la SFR CAP Santé. Le logiciel d'imagerie Amira a été ensuite utilisé pour segmenter et reconstituer les tumeurs en 3D. Après 14 jours de développement tumoral, les souris sont anesthésiées à l'isoflurane puis mises à mort par dislocation des cervicales. Les tumeurs sont délicatement isolées du tissu conjonctif et récupérées avant d'être fixées dans du formol à 10%. Un morceau de peau saine est également récupéré comme témoin non tumoral pour chaque souris.

2. Analyse par immunohistochimie des tumeurs

Les tumeurs sont fixées dans du formol 10% pendant 24 à 48 h maximum selon leur taille. Les tumeurs sont ensuite incluses en paraffine, correctement orientées et identifiées. Des coupes de tumeurs de 6 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome, correctement disposées puis collées à l'aide d'albumine 1% sur des lames qui sont ensuite séchées pendant une nuit à 37°C. Les coupes sont déparaffinées par une série de bains successifs : deux bains de 5 min dans du toluène, deux bains de 2 min dans l'alcool à 100%, un bain de 2 min dans l'alcool à 95%, un bain de 2 min dans l'alcool à 70% puis un bain de 5 min dans de l'eau distillée, suivi d'un dernier bain de 5 min dans du PBS. Les coupes sont ensuite marquées et, pour limiter la consommation en anticorps, entourées avec un stylo hydrophobe nommé « Dako Pen ». Les marquages nucléaires, comme le marqueur de prolifération Ki67, nécessite un démasquage des sites. Pour cela, les lames sont plongées dans du tampon citrate à 10 mM bouillant pH 6 pendant 10 min puis dans deux bains de PBS de 10 min. La détection du marquage en immuno-histochimie s'effectue par l'utilisation d'anticorps couplés *Horseradish Peroxidase* (HRP), c'est pourquoi les peroxydases endogènes sont éliminées par un traitement à l'eau oxygénée à 3% pendant 5 min puis trois bains de 10 min dans du PBS. Les sites non spécifiques sont saturés par une incubation à la BSA 3% (p/v) pendant 1 h à température ambiante suivie de trois lavages de 10 min dans du PBS. Les coupes de tumeurs sont incubées avec les anticorps primaires pendant 1 nuit à 4°C dans une chambre humide : anti-MMP-1 (Santa Cruz) dilué au 1/50ème, anti-VEGF dilué au 1/50ème (Santa Cruz), anti-Ki67 dilué au 1/100ème (Bioscience) préparés dans de la BSA 0,3% dans du PBS. Les coupes de tumeurs sont lavées trois fois 10 min dans du PBS puis incubées selon les recommandations du fournisseur avec les anticorps secondaires couplés HRP dilués du 1/100ème à 1/250ème dans de la BSA 0,3% dans du PBS pendant 2 h à température ambiante à l'abri de la lumière puis lavées trois fois dans du PBS

pendant 10 min. Les marquages sont ensuite révélés par la diaminobenzidine (DAB 0,05% et 0,03% d'eau oxygénée préparée dans du PBS) jusqu'à apparition d'une coloration marron. Les lames sont ensuite rincées deux fois dans du PBS pendant 10 min puis sur-colorées au vert de méthyle acétique pendant 30 s à 1 min. Les lames sont rincées deux fois au PBS pendant 5 min puis lavées deux fois 5 min dans du butanol et deux fois 5 min dans du toluène. Les lames sont ensuite montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Eukitt puis conservées à l'abri de la lumière. Les lames sont ensuite observées et analysées au microscope optique.

H. Etude *in silico*

1. Docking moléculaire

L'interaction entre un substrat ou un peptide et une protéine est une étape cruciale dans la plus part des effets biologiques. La compréhension de ces mécanismes d'interactions ainsi que la mise en évidence des résidus essentiels à cette interaction sont très importantes tant dans la recherche fondamentale visant à comprendre ces interactions, qu'appliquée visant à développer de nouveaux agents bloquant ou favorisant ces interactions. En modélisation moléculaire, le peptide, le substrat ou l'inhibiteur sont appelés « ligands », alors que leur récepteur est appelé « cible ». La modélisation moléculaire s'effectue à partir de structures expérimentales (issues de méthodes de détermination de structure telles que la cristallographie ou la résonance magnétique nucléaire) ou de structures prédites obtenues par homologie ou dynamique moléculaire par exemple.

La bio-informatique telle que la modélisation moléculaire permet de prédire l'interaction entre le ligand et sa cible. Pour cela, des outils spécifiques ont été développés tel que le docking moléculaire ayant pour but d'obtenir un ensemble de conformations du ligand de plus basses énergies issu de son interaction avec la cible. Il est important de savoir que plus une énergie est faible dans un système, plus il y a de probabilité que cela se produise réellement. L'obtention de ces différentes conformations repose sur l'utilisation de programmes spécifiques utilisant des méthodes de minimisation d'énergie permettant d'obtenir le minimum global d'énergie de l'interaction. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé le logiciel AutoDock (Automated Docking of flexible ligands to receptors) (Goodsell and Olson, 1990) dans lequel les différentes conformations du ligand sont explorées au travers la rotation aléatoire de certains angles dièdres, tout en maintenant la cible rigide.

a) Principe

Le logiciel AutoDock regroupe trois programmes principaux comprenant le programme AutoTors, AutoGrid et AutoDock. Chacun de ces programmes possède un rôle différent dans le docking moléculaire. En effet, AutoTors définit les angles dièdres qui seront modifiés aléatoirement et permettront d'échantillonner les différentes conformations du ligand ; AutoGrid effectue le calcul des différentes grilles d'affinité pour la cible qui seront ensuite explorées par le ligand ; et enfin AutoDock réalise les calculs de docking à proprement dits sur l'ensemble des grilles d'affinité précédemment calculées. L'ensemble de ces programmes peut être utilisé par l'interface AutoDock Tools (ADT) développée par l'équipe qui a créé la suite AutoDock. Cette interface permet de visualiser les grilles à l'intérieure desquelles vont être réalisés les calculs de docking, de préparer les différents scripts utilisés par les différents programmes, et enfin d'analyser les structures des différents complexes obtenus.

Le docking moléculaire entre un ligand et sa cible fait intervenir trois grandes étapes allant de la préparation des molécules à analyser au démarrage du docking moléculaire. Chaque étape fait l'objet d'un paramétrage spécifique en fonction des dimensions de la protéine et du ligand.

La première étape du docking moléculaire consiste à préparer le ligand et le récepteur en définissant les charges partielles de leurs atomes. Pour cela, le programme AutoTors est utilisé et permet de définir un centre de masse pour les mouvements rigides externes comprenant les rotations et les translations du ligand, ainsi que l'ensemble des torsions des liaisons du ligand pouvant subir des rotations permettant l'exploration des différentes conformations possibles.

Une grille tridimensionnelle est construite autour de la cible permettant ainsi d'augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système. Pour cela, le programme AutoGrid est utilisé et permet de définir la taille de la grille en fonction du nombre de points n_x, n_y, et n_z constituant cette grille et de leur espacement. Pour chaque type d'atomes (généralement C, H, O et N), un atome "sonde" est placé en chacun des nœuds de la grille et l'affinité entre le type d'atome et la molécule cible est calculée par AutoGrid. Une grille d'affinité vis-à-vis de la molécule cible est ainsi obtenue pour chaque type d'atome.

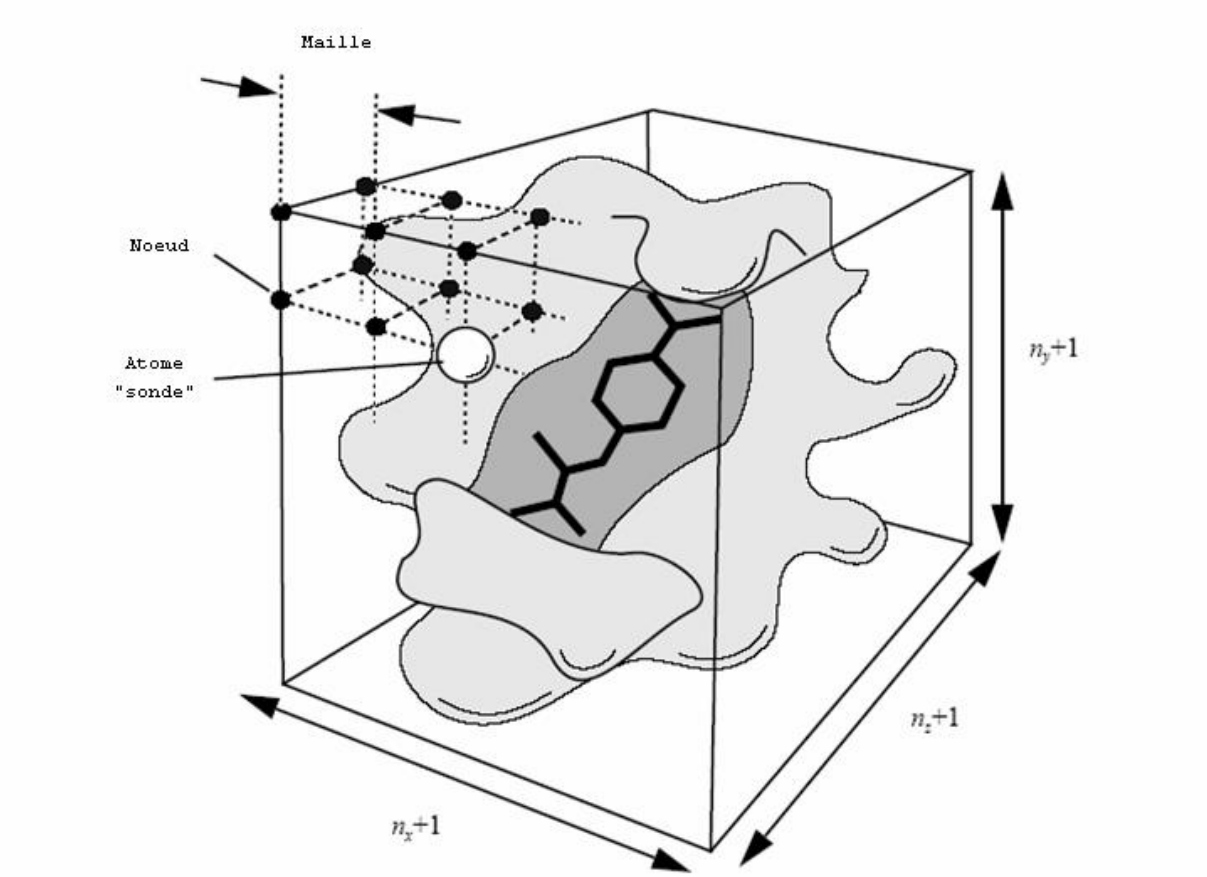


Figure 20. Représentation schématique d'une grille calculée par AutoGird.

Une autre grille de potentiel électrostatique est également calculée en résolvant l'équation de Poisson-Boltzmann. Cette dernière permet de diminuer les temps de calculs d'un facteur 100 sans avoir à lister l'ensemble des interactions non liantes entre le ligand et sa cible pour chacune des modifications de la position et/ou de la structure du ligand. La taille du maillage de la grille est fixée par défaut à 0,375 Å, ce qui correspond au quart de la longueur d'une simple liaison entre deux atomes de carbones (C-C). Cette distance peut néanmoins être ajustée à la valeur désirée, sachant que la longueur de la maille est associée à la précision de la grille.

La dernière étape est réalisée sous le programme AutoDock. L'algorithme génétique de Lamarck (Morris et al., 1998) est une méthode hybride basée sur un algorithme génétique couplé à une méthode de recherche locale reposant sur un algorithme optimalisé par Soli et Wets (SOLI and Wets, 1981). Les algorithmes génétiques reprennent des mécanismes et la terminologie de la génétique naturelle et de l'évolution biologique. L'organisation d'un ligand en complexe avec un récepteur peut être définie par un jeu de paramètres décrivant la position, l'orientation et la conformation du ligand par rapport au récepteur. Ces paramètres sont les

« variables d'état » et dans un algorithme génétique, chaque variable d'état correspond à un gène. La valeur de ces variables correspond au génotype et les coordonnées atomiques associées correspondent au phénotype. Chaque état défini du ligand correspond à un individu. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'ajouter à l'algorithme génétique, la possibilité de modifier le phénotype suivant la fonction de score qui, à son tour, modifie le génotype. Cet algorithme de Lamarck est donc utilisé afin de réaliser automatiquement l'échantillonnage des structures, des positions et des orientations du ligand par rapport à sa cible.

Suivant la conformation du ligand et son emplacement vis-à-vis de la cible, AutoDock évalue son affinité en utilisant une fonction de score basée sur une forme empirique de l'énergie libre d'interaction entre le ligand et la cible :

$$\Delta G_{interaction} = \Delta G_{van\ der\ waals} + \Delta G_{électrostatique} + \Delta G_{liaison\ H} + \Delta G_{desolvatation} + \Delta G_{torsion}$$

Les trois premiers termes correspondent aux contributions classiques de l'énergie mécanique moléculaire, à savoir l'attraction et la répulsion entre atomes ($\Delta G_{van\ der\ waals}$), l'interaction électrostatique ($\Delta G_{électrostatique}$) et l'interaction à travers les liaisons hydrogène ($\Delta G_{liaison\ H}$). Le quatrième ($\Delta G_{desolvatation}$) terme correspond aux effets hydrophobes et de désolvatation induits par la fixation du ligand à son récepteur. Enfin, le dernier terme ($\Delta G_{torsion}$) rend compte des mouvements internes du ligand *via* la description des angles dièdres

Au cours d'une expérience de docking moléculaire, l'utilisateur doit définir certains paramètres tels que le nombre de cycles, correspondant au nombre d'expériences réalisées indépendamment, et comportant chacun un nombre de pas, correspondant au nombre d'évaluation de l'énergie d'interaction. A chaque pas, la conformation du ligand est changée. La conformation présentant l'énergie d'interaction la plus faible est conservée à l'issue de chaque cycle et l'ensemble des conformations ainsi obtenues sont regroupées en famille de conformations (*clusters*) d'après leur RMSD (*Root Mean Square Deviation*). Le RMSD rend compte de la déformation spatiale qui existe entre deux conformations. Par défaut, AutoDock crée un cluster de conformation regroupant l'ensemble des conformations dont les RMSD ne varient que de 2Å (Figure 21).

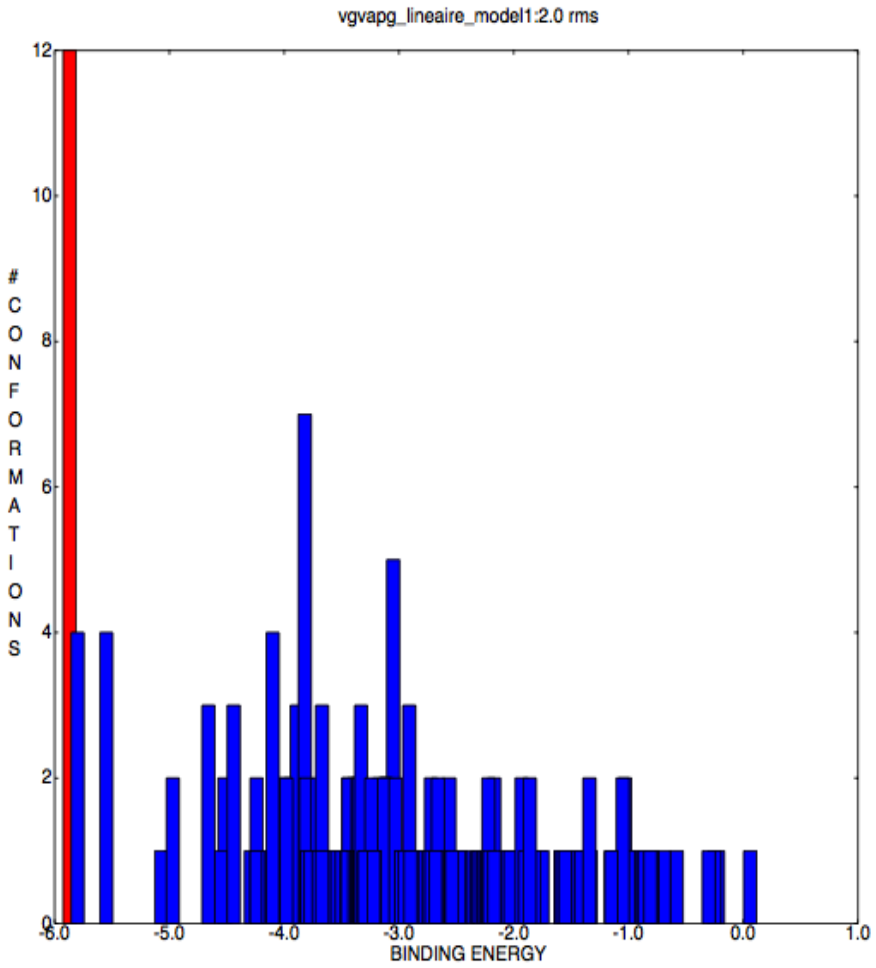


Figure 21. Histogramme des différents clusters obtenus après un docking moléculaire

b) Conditions expérimentales

Nous avons utilisé Autodock afin d'étudier et caractériser l'interaction entre le peptide d'élastine VGVAPG et une séquence potentiellement inhibitrice nommée V14 (VVGSPSAQDEASPL). Dans le but de développer une nouvelle stratégie thérapeutique visant à inhiber les effets des peptides d'élastine dans le développement du mélanome, nous avons utilisé cette séquence V14 comme récepteur soluble pouvant entrer en compétition avec le peptide VGVAPG vis-à-vis de son interaction avec l'EBP. La structure de l'EBP utilisée dans cette étude de docking moléculaire est issue d'une prédiction par homologie de séquence (Blanchevoye et al., 2013). La structure du V14 quant à elle a été isolée à partir de sa conformation retrouvée au sein de l'EBP. La structure de départ du peptide VGVAPG est issue d'une simulation de dynamique moléculaire réalisée au préalable au sein du laboratoire.

1) Docking EBP – VGVAPG

Le docking moléculaire du peptide VGVAPG sur l'EBP a été réalisé avec le logiciel AutoDock précédemment décrit. Le peptide VGVAPG est donc le ligand et l'EBP sa cible. Le ligand a été préparé avec le programme AutoTors et 13 torsions ont été identifiées. De la même manière, nous avons préparé l'EBP et défini une grille de docking. Cette grille a été placée sur la zone S-Gal de l'EBP correspondant au site de liaison des peptides d'élastine (Blanchevoye et al., 2013; Moroy et al., 2005, 2009; Privitera et al., 1998). La grille compte 126 points selon chacune des trois directions de l'espace, et l'espacement considéré entre deux de ces points consécutifs est égal à 0,281 Å. Le centre de cette grille est positionné selon les coordonnées suivantes : x = 39,237 Å, y = 39,544 Å et z = 131,023 Å (Figure 22).

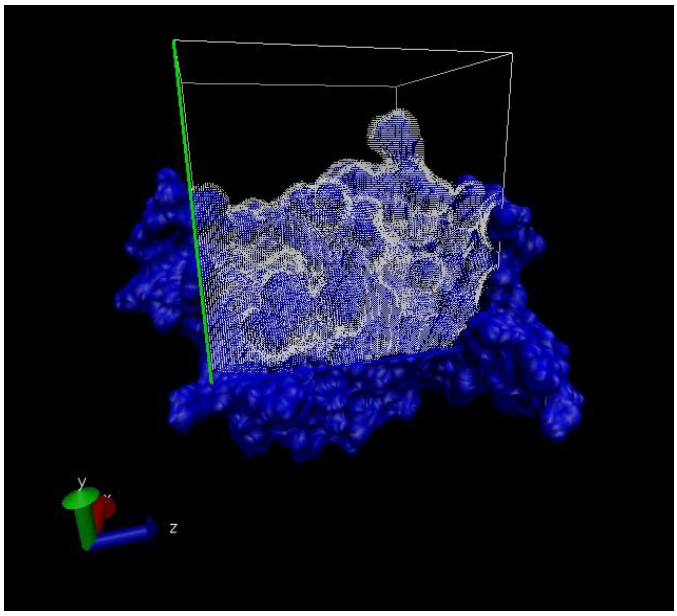


Figure 22. Représentation de la boite de calcul utilisée pour le docking du VGVAPG sur l'EBP

Nous avons réalisé deux cycles indépendants de 250 runs avec une population initiale de 150 individus, produisant un nombre maximum d'évaluation d'énergie de 25×10^6 et un nombre maximum de générations de 27 000. Les conformations dockées du ligand sont réparties dans différentes familles de conformation selon un regroupement basé sur les calculs de matrice de RMSD. La valeur seuil de déviation entre structures est égale à 2 Å.

2) Docking V14 – VGVAPG

Le docking moléculaire du peptide VGVAPG sur le V14 a également été réalisé avec le logiciel AutoDock précédemment décrit. Le peptide VGVAPG est donc le ligand et le V14

devient sa cible. Le ligand a été préparé avec le programme AutoTors et 13 torsions ont été identifiées. De la même manière, nous avons préparé le V14 et défini une grille de docking. Au cours de cette expérience de docking moléculaire, nous avons utilisé une grille possédant les mêmes caractéristiques que celle établie pour le docking sur l'EBP : 126 points dans chacune des trois directions de l'espace avec un espacement entre les points consécutifs égal à 0,281 Å. Le centre de la grille est situé au point de coordonnées x = 44,21 Å, y = 35,147 Å et z = 130,885 Å (Figure 23).

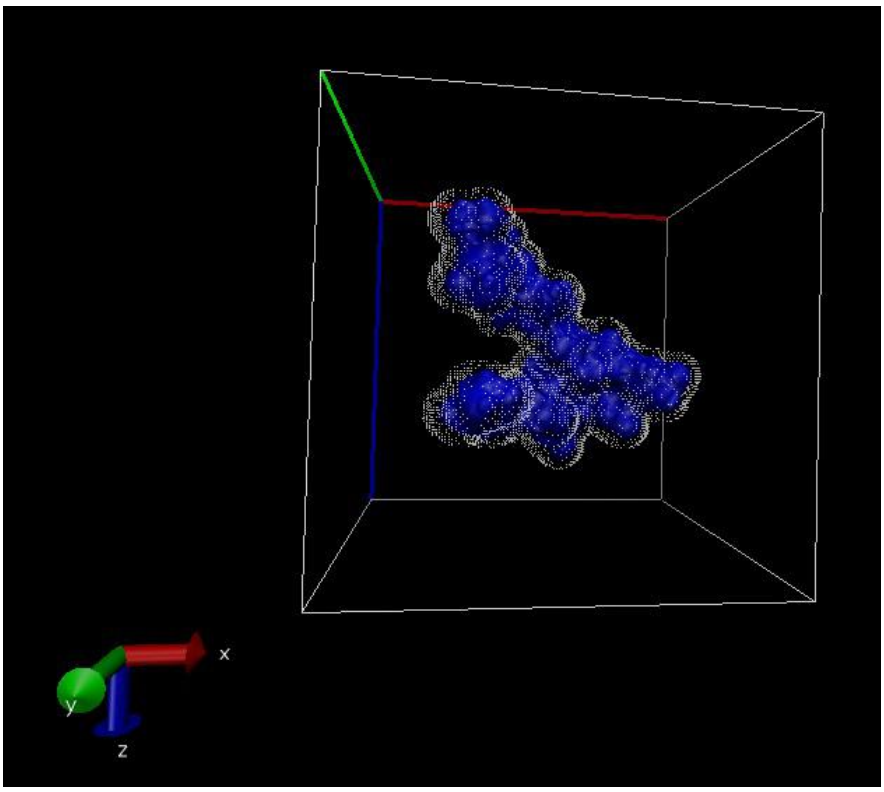


Figure 23. Représentation de la boite de calcul utilisée pour le docking du VGVAPG sur le peptide V14

Nous avons réalisé deux cycles indépendants de 250 runs avec une population initiale de 150 individus, produisant un nombre maximum d'évaluation d'énergie de 25×10^6 et un nombre maximum de générations de 27 000. Les conformations dockées du ligand sont réparties dans différentes familles de conformations selon un regroupement basé sur les calculs de matrice de RMSD. La valeur seuil de déviation entre structures est égale à 2 Å.

3) Docking EBP – V14

Afin de compléter notre étude, nous également voulu caractériser l'interaction du peptide V14 et de l'EBP. En effet, dans les études *in vitro*, le peptide V14 et l'EBP se trouvent

dans le même environnement. On peut donc penser que l'inhibition des effets des peptides d'élastine en présence du V14 n'est pas due à une interaction V14-peptides d'élastine mais V14 –EBP. Le docking moléculaire du peptide V14 avec l'EBP a donc été réalisé avec le logiciel AutoDock précédemment décrit. Le peptide V14 est donc le ligand et l'EBP sa cible. Le ligand a été préparé avec le programme AutoTors et 44 torsions ont été identifiées. Le nombre de torsions est limité à 32 avec ce logiciel. L'analyse structurale d'une simulation de dynamique moléculaire du V14 a permis d'identifier une structure en coude, stable au cours du temps et faisant intervenir la séquence QDEA. Nous avons choisi de fixer volontairement cette zone, qui présente très peu de fluctuations conformationelles, et ainsi diminuer le nombre de torsions du peptide V14, ce qui permet de procéder à l'expérience de docking avec Autodock. De cette manière, nous avons pu restreindre le nombre de torsions, et donc de degrés de liberté. De la même manière, nous avons préparé l'EBP et défini une grille de docking. Cette grille a été placée sur la zone d'intérêt V32 de l'EBP comme décrit précédemment lors du docking du VGVPAG sur l'EBP. Ainsi la grille présente les caractéristiques suivantes : 126 × 126 × 126 points avec un espacement de 0,281 Å entre deux points successifs. Le centre de la grille est positionné en x = 39,23 Å, y = 39,544 Å et z = 131,023 Å. Nous avons réalisé deux cycles indépendants de 250 runs avec une population initiale de 150 individus, produisant un nombre maximum d'évaluation d'énergie de 25×10^6 et un nombre maximum de générations de 27 000. Les conformations dockées du ligand sont réparties dans différentes familles de conformation selon un regroupement basé sur les calculs de matrice de RMSD. La valeur seuil de déviation entre structures est égale à 2 Å.

c) Analyses des résultats

Les résultats de docking moléculaire peuvent être exploités en utilisant l'interface AutoDock Tools. Ce logiciel permet notamment de visualiser et d'analyser les conformations de plus basses énergies issues de chaque cycle et classées par énergie croissante. Les premières conformations proposées correspondent aux structures de plus basse énergie qui représentent *a priori* les conformations les plus stables et donc les plus favorables et plus probables. Parmi les conformations obtenues, certaines présentent des structures très proches et sont alors regroupés dans un même cluster même si leurs énergies d'interaction ne sont pas tout à fait les mêmes. Pour l'ensemble de nos calculs, une valeur seuil du RMSD pour le calcul de ces clusters a été fixée à 2 Å, jugée pertinente compte tenu de la taille des ligands. Les populations des clusters sont ensuite présentées sous forme d'histogramme correspondant aux nombres de

configurations présentes dans le cluster par rapport à l'énergie de liaison. Un cluster très peuplé avec une faible énergie de liaison est en général synonyme d'un bon docking.

Une fois le choix de la conformation la plus favorable déterminée, en tenant compte des différents paramètres décrits précédemment, l'étude de la formation de liaisons hydrogène entre le ligand et sa cible peut nous renseigner sur la stabilité de l'interaction. Les données conformationelles issues du docking peuvent être également visualisées à l'aide du logiciel VMD (*Visual Molecular Dynamics*). Ce logiciel permet ainsi d'approfondir l'analyse relative à (i) la formation de liaisons hydrogène et (ii) la présence d'interactions hydrophobes. De plus, VMD permet l'utilisation de modes de représentation graphique et de rendus plus performants qu'Autodock Tools.

2. Dynamique moléculaire

a) Principe

La dynamique moléculaire classique est basée sur l'utilisation d'une fonction d'énergie potentielle empirique liée aux coordonnées atomiques d'un système constitué de N atomes. L'énergie potentielle d'un système peut être décrite comme la somme de deux types de contributions : des contributions liantes ($E_{liées}$) et des contributions non liantes ($E_{non\ liées}$) de sorte que $E_{total} = E_{liées} + E_{non\ liées}$ (Figure 24).

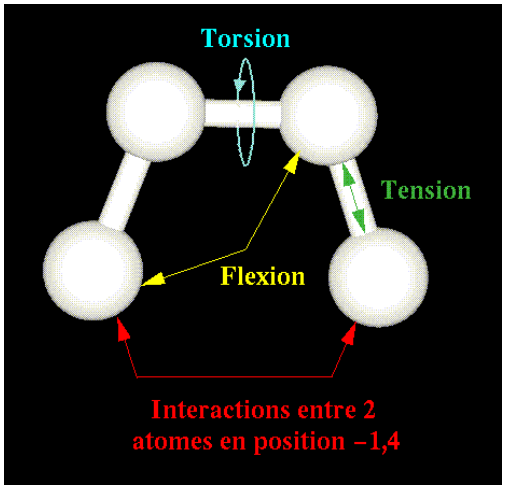


Figure 24. Représentation des interactions internes (liées) et externes (non liées) d'une molécule.

Les interactions liantes font référence aux interactions entres atomes séparés par moins de trois liaisons covalentes. L'énergie potentielle dépendante de ces interactions tient compte de la déformation des liaisons covalentes, des angles formés entre deux liaisons covalentes, des

angles dihèdres, et des variations des angles impropres (Figure 25). Le modèle qui est utilisé pour décrire ces contributions est celui du ressort : les énergies sont alors représentées selon un modèle harmonique qui sera valable dans le cas de faibles variations ou déplacements.

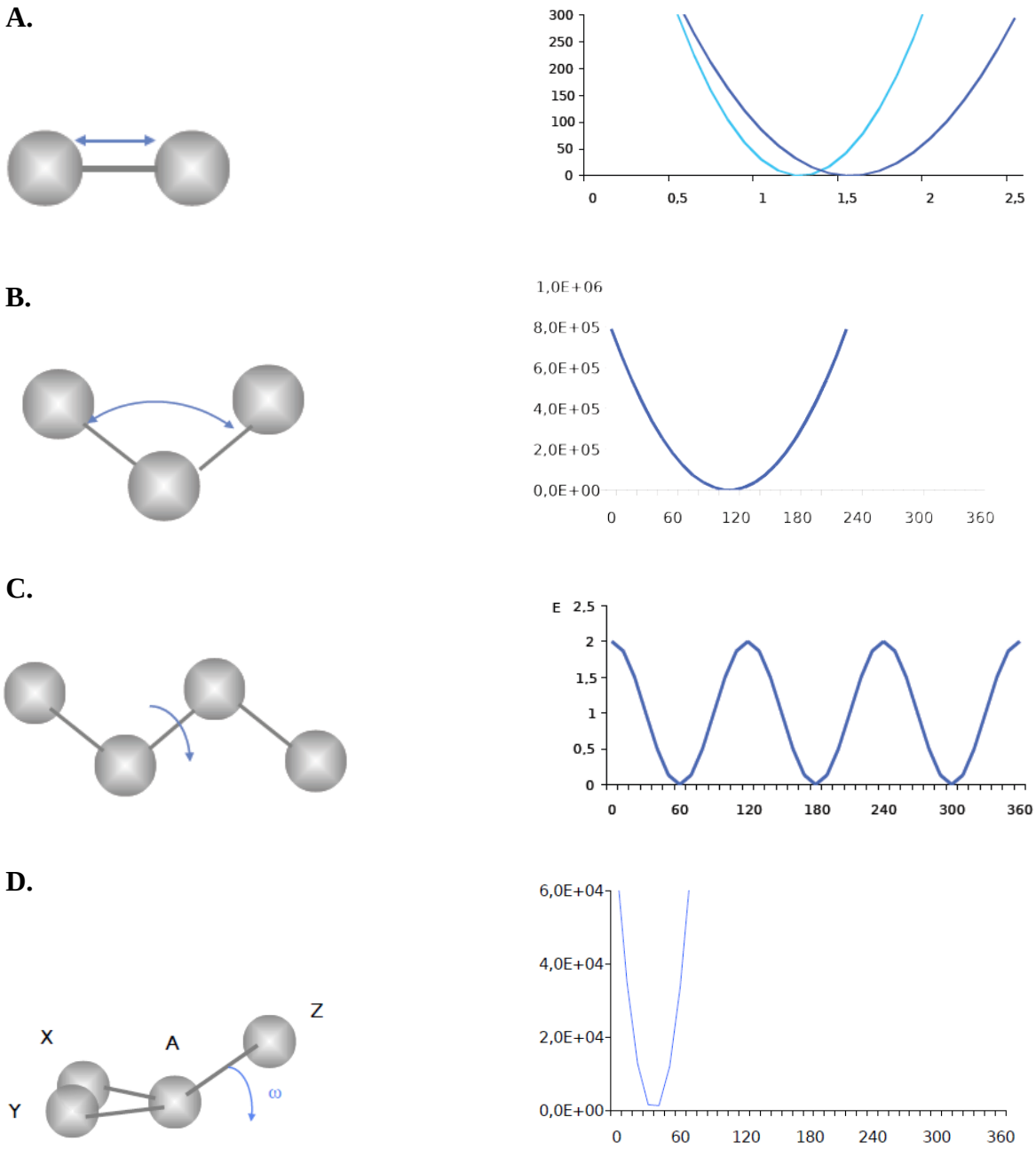


Figure 25. Représentation des différentes contributions liantes et de leurs profils énergétiques
A. liaisons, B. angles, C. torsions dihèdre et D. angles impropres.

Les contributions non liantes de l'énergie potentielle sont en général réprésentées à travers deux termes qui permettent de représenter les interactions entres atomes non liés de manière covalente, c'est à dire séparés par plus de trois liaisons. Ces interactions comprennent les interactions de type van der Waals modélosées le plus souvent à l'aide du potentiel de

Lennard-Jones et les interactions électrostatiques prises en compte à travers le potentiel Coulonbien. Le potentiel de Lennard-Jones comporte un terme répulsif en r^{-12} traduisant la répulsion internucléaire à courte distance, et un terme attractif en r^{-6} représentant les interactions dipolaires dues aux fluctuations des nuages électroniques de chacun des atomes (Figure 26A). Enfin le potentiel Coulombien traduit les interactions electrostatiques entre les différentes paires d'atomes distantes de r_{ij} où ε représente la constante diélectrique du milieu (Figure 26B). Pour le vide, ε = 1, pour l'eau ε = 80. Le fait d'introduire une constante diélectrique donnée permet de mimer le solvant de manière implicite. Lorsque le solvant est traité de manière explicite, la constante diélectrique doit être égale à 1. Ce dernier terme permet également de pouvoir observer et traiter les liaisons hydrogènes qui sont elles aussi des interactions non liantes.

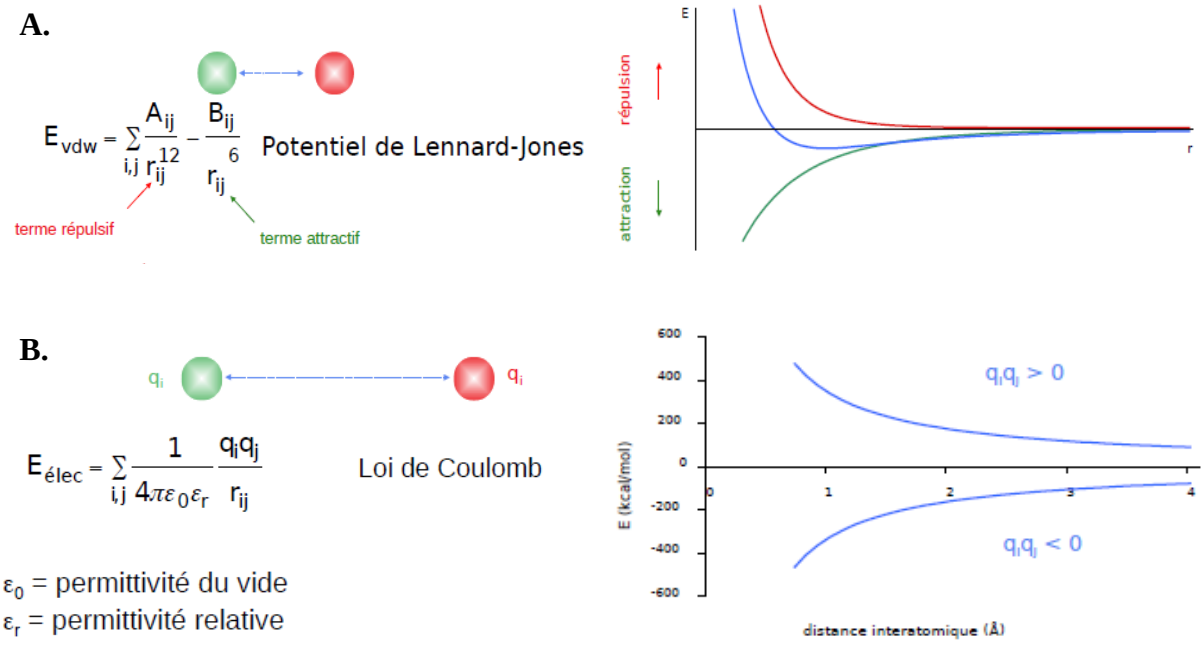


Figure 26. Représentation des différents termes impliqués dans l'énergie potentielle d'une molécule pour les interactions non liantes. A. potentiel de Lennard-Jones B. potentiel Coulombien.

Le champ de forces regroupe la forme mathématique utilisée pour représenter l'énergie potentielle, ainsi que l'ensemble des paramètres servant à décrire les charges portées par les atomes, les longueurs des liaisons, les valeurs des angles et les torsions. A partir de la définition d'un champ de force, une simulation de dynamique moléculaire permet d'étudier l'évolution d'un système de particules au cours du temps. Dans ces simulations, le temps évolue de manière discrète et l'on souhaite connaître la position et la vitesse des particules à chaque pas de temps. Le calcul des forces d'interaction entre les particules permet de déterminer l'évolution des

vitesses, et donc des positions, en utilisant les lois de la mécanique classique de Newton discrétisée.

Relation fondamentale de la dynamique (deuxième loi de Newton) utilisée au cours des simulations des dynamiques moléculaires :

$$\sum \vec{F} = m \ \vec{a}$$

Où $\vec{a}$ = accélération (variation des vitesses dans le temps).

$$\vec{a} = \frac{d\vec{v}}{dt} = \frac{\overrightarrow{vt} - \overrightarrow{v(t-1)}}{t-(t-1)}$$

Où $\vec{v} =$ variation des positions dans le temps.

$$\vec{v} = \frac{d\vec{r}}{dt} = \frac{rt - r(t-1)}{t-(t-1)}.$$

Où r = position à un instant t (coordonnées atomiques).

$\vec{v}$ est défini pour chaque atome suivant les axes x, y et z.

Une simulation de dynamique moléculaire consiste, à partir d'une position $\vec{r}$ connue, d'obtenir une nouvelle positon $\overrightarrow{r1}$ calculée en appliquant la relation fondamentale de dynamique impliquant des variations instantanées de vitesse ($\vec{a}$) et de position ($\vec{v}$) à une température donnée. Ainsi, nous obtenons $\overrightarrow{rn}$ nouvelles positons, sachant que *n* dépend du temps total de la simulation de dynamique moléculaire.

b) Conditions expérimentales

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé le logiciel et les programmes d'analyse de la suite GROMACS spécialisée dans la dynamique moléculaire et constituant un outil de référence dans le domaine (Van Der Spoel et al., 2005; Housaindokht et al., 2008).

1) Préparation du système

Comme cela a été décrit précédemment, il est nécessaire d'obtenir les coordonnées de l'ensemble des atomes des systèmes étudiés, avant de réaliser la simulation à proprement dite. Pour cela, il existe des banques de données spécialisées, par exemple la PDB (*Protein Data Bank*), dans lesquelles sont référencées les coordonnées de toutes les molécules dont les

structures cristallographiques ou déterminées par RMN sont connues à ce jour. Si la structure tridimensionnelle d'une macromoléculaire n'a pas pu être déterminée expérimentalement, il est possible d'avoir recourt à des méthodes théoriques telles que la modélisation par homologie de séquence. Dans cette étude, les coordonnées structurales de l'EBP ont été obtenues grâce à cette dernière méthode. Le V14, correspondant à une partie de la séquence V32 de l'EBP, a été isolé à partir du fichier de l'EBP. La structure du peptide VGVAPG utilisée est issue d'études de modélisation moléculaire réalisées précédemment au sein du laboratoire. Dans un premier temps, nous avons réalisé des fichiers de topologie de chacune des molécules de l'étude, en prenant en compte les paramètres non liés et liés précédemment décrits. Chaque système moléculaire (l'EBP, le V14, et le VGVAPG) a été soumis à une minimisation de l'énergie dans le vide afin d'optimiser les positions atomiques et d'éviter les clashs stériques.

Bien que nous utilisions des outils bio-informatiques afin de prédire des interactions biologiques, il est indispensable de tenir compte de l'environnement biologique de la protéine étudiée. Pour cela, la manière la plus simple de traiter cet environnement est de placer les systèmes moléculaires étudiés dans l'eau. Il est par ailleurs possible d'utiliser d'autres types de solvants. L'étape de solvatation nécessite de définir une boîte de simulation : cette dernière est cubique dans notre étude. La densité de la boîte de simulation devra correspondre à la réalité expérimentale. Dans le cas d'une macromolécule placée en solvant aqueux, il convient de vérifier que celle-ci vaut 1. Enfin, il faut spécifier les paramètres physico-chimiques des molécules d'eau, choisie ici comme solvant. Dans notre cas, nous avons utilisé le modèle TIP3P (Jorgensen et al., 1983).

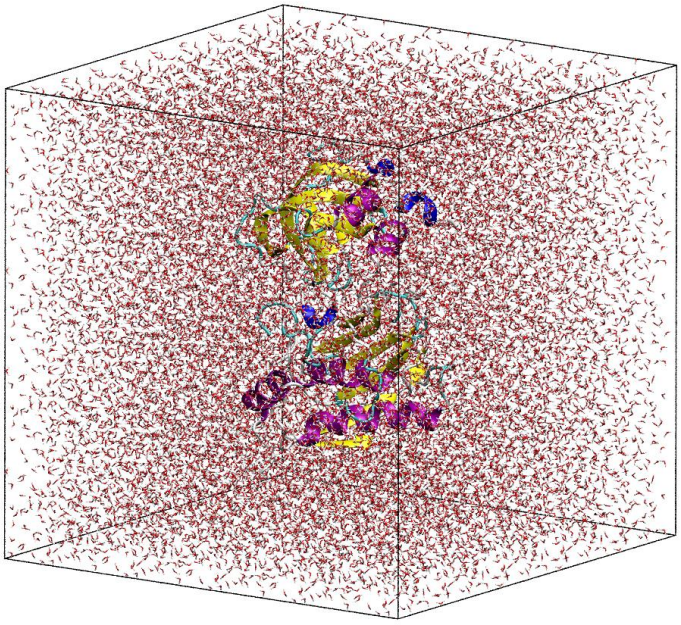


Figure 27. Exemple d'une boîte de simulation remplie d'eau contenant une molécule d'intérêt.

Lors du processus de solvatation (ajout de molécule d'eau), les molécules d'eau situées à moins de 2,8 Å d'un atome lourd de la protéine ou du peptide seront supprimées pour limiter leur influence sur la structure du système moléculaire. La simulation s'effectue dans un système contenant une charge globale nulle, cependant les molécules étudiées peuvent être chargées et conduisent à une charge globale non nulle à l'intérieur de la boîte de simulation. Pour remédier à cela, nous avons ajouté des contre-ions afin de rétablir une charge globale nulle. Les contre-ions généralement utilisés sont Na^+ ou Cl^-.

2) Minimisation de l'énergie

L'énergie du système doit être ensuite minimisée de manière à éliminer certains mauvais contacts inter- ou intramoléculaires susceptibles de perturber la simulation, comme l'affrontement stérique ou une géométrie inappropriée. La structure est donc relaxée à travers un processus appelé minimisation de l'énergie. Dans notre cas, le système moléculaire a été minimisé dans le vide puis inséré dans une boîte de simulation remplie d'eau. Dans ces conditions, l'étape de minimisation s'effectue en plusieurs étapes : la molécule seule est minimisée (le solvant étant fixé), puis le solvant seul à son tour puis, l'ensemble du système molécule-solvant. La structure ainsi obtenue correspond à minimum local de l'énergie potentielle pour une température de 0 K.

3) Chauffage

Les simulations sont réalisées à 310 K (37° C), il est nécessaire d'apporter progressivement et uniformément de l'énergie cinétique au système de manière à atteindre la température finale désirée. Pour cela, on attribue aléatoirement une vitesse à chaque atome à des intervalles de temps réguliers.

4) Equilibrage

Suite à la minimisation en énergie, nous avons une structure de départ raisonnable, en termes de géométrie et d'orientation du solvant. Pour commencer la dynamique moléculaire à proprement dit, nous devons équilibrer le solvant et les ions autour de la protéine. Pour cela, le solvant est porté à la température de 310 K et doit se positionner correctement vis-à-vis de la molécule. Dans ce travail, nous avons effectué cette étape d'équilibrage en deux parties :

- La première consiste à réajuster les vitesses, afin de s'assurer de rester à la température de simulation désirée (310 K).

- La deuxième partie consiste à laisser évoluer le système librement, en réajustant les vitesses si et seulement si la température s'écarte de ± 10 K de la température souhaitée.

A la fin de cette étape, l'énergie totale du système, comprenant l'énergie cinétique et l'énergie potentielle, doit être constante ou ne subir que des variations extrêmement faibles.

5) Dynamique moléculaire : phase de production

Ces différentes étapes préliminaires terminées, la simulation proprement dite peut débuter : on parle alors de phase de production. Le système évolue librement à température et pression constantes. Lors de simulations en solvant explicite, la densité doit rester également constante. Pour éviter une variation de densité dès qu'une molécule de solvant quitte la boîte, on est obligé de simuler un système infini grâce à l'utilisation de conditions périodiques. Le principe des conditions périodiques est illustré sur la figure 28 : on duplique le système dans toutes les directions de l'espace, pour aboutir à 26 copies. Les mouvements qui apparaissent dans la boîte centrale sont recopiés dans les autres boîtes environnantes; une molécule de solvant qui sort de la boîte centrale par un côté, revient dans cette même boîte par le côté opposé, et ceci dans toutes les directions de l'espace.

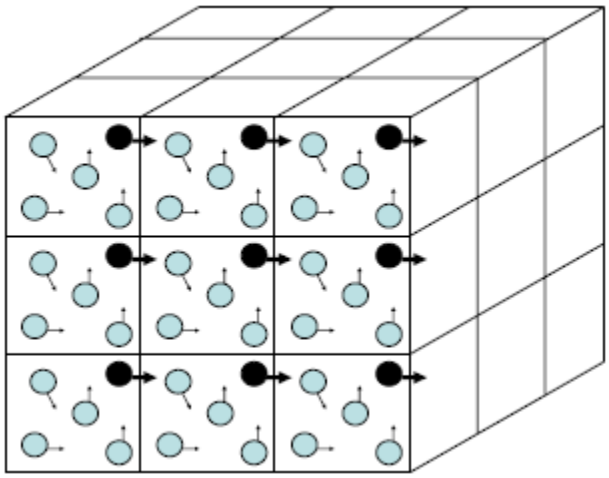


Figure 28. Création des 26 images autour du système initial pour appliquer les conditions périodique aux limites

Les calculs d'énergie sont effectués une seule fois, dans la boite centrale, mais les calculs des interactions non liantes font également intervenir les molécules des boîtes virtuelles environnantes, à condition de se trouver dans un rayon inférieur au rayon de coupure. Nous avons réalisé des simulations de 200 ns pour chacun des systèmes composés d'EBP-VGVAPG, V14-EBP ou V14 fixe-VGVAPG. V14 fixe possède ces deux extrémités fixées artificiellement. Cette structure a été utilisée afin de mimer le V14 contenant dans l'EBP.

c) Analyses des résultats

A la suite d'une simulation de dynamique moléculaire, on analyse la ou les trajectoire(s) obtenue(s) dont on extrait des informations structurales, dynamiques ou thermodynamiques d'intérêt.

Dans notre cas, une fois la simulation terminée, nous avons analysé un certain nombre de paramètres, donnant des informations sur l'interaction entre les deux molécules étudiées, les structures qu'elles adoptent et la stabilité de l'interaction. Tous ces paramètres ont notamment pu être mis en évidence au travers de l'utilisation du logiciel de visualisation moléculaire VMD.

1) Analyses de l'interaction VGVAPG-protéine

Ici la protéine représente l'EBP ou le V14. L'interaction entre la protéine et le peptide VGVAPG est caractérisé à travers l'étude de deux paramètres : (i) d'une part l'évolution de la distance entre les centres de gravités du peptide et du site de fixation de la protéine au cours des 200 ns de simulation et (ii) d'autre part la représentation de matrice de contacts permettant

d'accéder à la moyenne temporelle de la plus petite distance entre atomes d'une paire de résidus. Pour cela, nous avons utilisé les utilitaires d'analyse nommés :

g_mdmat (élaboration de matrice croisée à partir de la plus petite distance moyenne en Å par paire de résidu). La représentation graphique de cette matrice montre les éléments en dégradé de couleurs : plus la distance moyenne est faible, plus la couleur tend vers le noir et plus les résidus sont proches et l'interaction importante. Inversement, plus la distance est grande, plus la couleur tend vers le blanc, moins les résidus sont proches et plus l'interaction est faible. Cette matrice permet ainsi de mettre en évidence une interaction préférentielle entre les deux molécules et d'identifier des zones d'interaction spécifique qui peuvent être ensuite observées et analysées plus précisément en utilisant un logiciel de visualisation moléculaire tel que VMD.

g_dist. Ce dernier permet d'étudier la stabilité de l'interaction au cours de la simulation de dynamique moléculaire en calculant les distances en Å entre les centres de masse des deux molécules (peptide-protéine). Ceci permet d'obtenir un graphe montrant l'évolution des distances en Å le long de la simulation. Ainsi, ce type de graphe permet d'analyser l'interaction entre le peptide et la protéine dans le temps et donc de prédire sa stabilité.

2) Analyses des structures secondaire

Afin d'analyser les changements de structure secondaire au cours de la simulation de dynamique moléculaire, nous avons utilisé l'algorithme DSSP à l'aide de l'outil do8dssp de GROMACS. A partir de l'analyse du réseau de liaisons hydrogène, une structure secondaire locale est désignée à chaque résidu. A partir de cet algorithme, il est possible d'obtenir un graphe avec des couleurs artificielles correspondant chacune à une structure secondaire (Figure 29). Par exemple, les structures les plus répandues sont classées de la manière suivante : les structures en hélice α apparaissent en rose (H), les structures en feuillet β apparaissent en jaune pâle (E) et les structures en coude apparaissent en vert (T). L'algorithme DSSP, tout comme l'algorithme STRIDE utilisé par VMD, permet de différencier les types d'hélice, de coudes, … (Heinig and Frishman, 2004).

Ainsi, cet outil d'analyse nous a permis de mettre en évidence des conformations qui pourraient jouer un rôle crucial dans l'interaction peptide–protéine et permettent de mieux les comprendre.

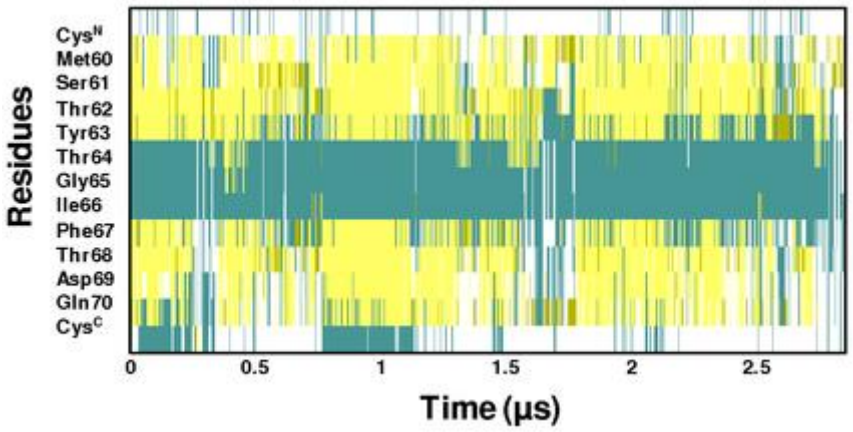


Figure 29. Exemple d'analyse structurale après simulation en utilisant l'algorithme STRIDE dans VMD. La couleur jaune représente une structure en feuillet β et le vert une structure en coude (Todorova et al., 2013).

I. Analyse statistique des résultats obtenus

Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne des données obtenues à partir de trois expériences indépendantes au minimum. Les valeurs moyennes sont exprimées avec l'erreur standard à la moyenne (SEM). Le test de Student a été utilisé pour l'étude statistique des résultats obtenus de toutes les expériences *in vitro*. Concernant les expériences réalisées *in vivo* le test Mann Whitney a été utilisé (NS, non-significatif ; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Résultats

Première partie :
Ciblage thérapeutique du complexe récepteur de l'élastine dans le cadre du développement tumoral du mélanome

IV. Résultats

Le mélanome est l'un des cancers cutanés les plus agressifs pour lequel il n'existe actuellement pas de traitement efficace. Au cours du développement tumoral du mélanome, la réaction stromale et, plus précisément, la composante matricielle jouent un rôle crucial dans la progression de cette pathologie (Labrousse et al., 2004; Ruiter et al., 2002). Parmi les composants de la matrice extracellulaire, l'élastine et, plus particulièrement, les peptides d'élastine semblent jouer un rôle essentiel tant dans la progression du mélanome que dans la modulation du stroma (Hornebeck et al., 2005). Ces observations sont issues d'études réalisées *in vitro* démontrant que les peptides d'élastine sont capables de stimuler la progression du mélanome par une sur-régulation de la sécrétion de protéases de type MMPs (Antonicelli et al., 2007; Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007) mais également en modulant la réaction stromale (induction de l'angiogenèse (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005), impliquant des fibroblastes présents dans le stroma (Brassart et al., 2001; Duca et al., 2002; Jacob et al., 1987)). De plus, des études par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs provenant de patients atteints de mélanome démontrent une intense fragmentation des fibres élastiques au niveau du front d'invasion des tumeurs (Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004). Ces observations cliniques démontrent clairement la présence *in situ* des peptides d'élastine. Cependant, peu de données *in vivo* concernant les effets de ces peptides dans la progression du mélanome étaient reportés, posant ainsi la question de leur réelle pertinence biologique.

Nous avons ainsi été les premiers à démontrer leur rôle *in vivo* dans la progression du mélanome, positionnant le CRE comme cible thérapeutique innovante (Devy et al., 2010).

A. Ciblage thérapeutique de la neuraminidase-1 lors du développement tumoral du mélanome

Dans le but d'inhiber les effets pro-tumoraux des peptides d'élastine au cours de l'invasion du mélanome (Devy et al., 2010; Hornebeck et al., 2005; Labrousse et al., 2004; Ntayi et al., 2004), nous avons en premier lieu étudié l'impact de l'inhibition de la sous-unité neuraminidase-1 du CRE, cette sous-unité étant responsable de la transduction du signal des EDPs (Duca et al., 2007) au travers de la désialylation du ganglioside GM_3 (Rusciani et al., 2010). Nous avons utilisé un inhibiteur chimique, l'acide 2-déoxy-2,3-déhydro-N-acétylneuraminique plus communément appelé Dana, capable de bloquer la signalisation induite par les peptides d'élastine (Figure 30) (Blaise et al., 2013; Duca et al., 2007). Il est important de noter que les EDPs utilisés dans toutes les expérimentations biologiques présentées dans ce manuscrit sont de la kE, sauf information contraire.

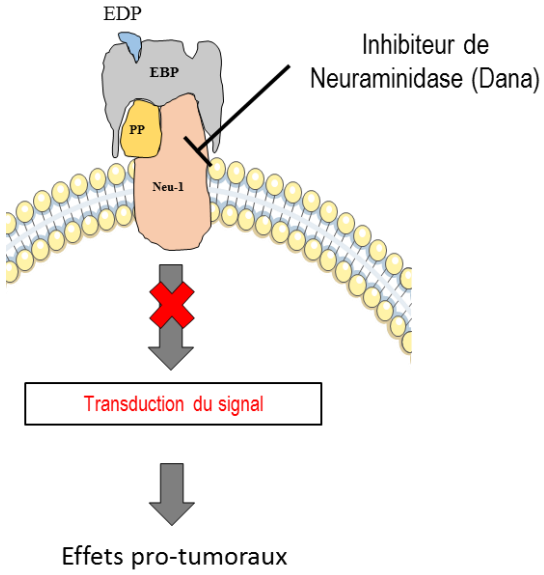


Figure 30. Représentation schématique de l'influence du Dana sur les effets pro-tumoraux des EDPs. Cette hypothèse propose que l'inhibition de Neu-1 à l'aide de Dana puisse bloquer les effets pro-tumoraux des EDPs en inhibant la transduction du signal.

Avant d'évaluer l'efficacité du Dana sur les effets pro-tumoraux des peptides d'élastine, nous avons tout d'abord vérifié l'expression du CRE et son implication dans notre modèle cellulaire, les cellules de mélanome B16F1 (Figure 31). A l'heure actuelle, la nature de l'EBP murin n'est pas connue, rendant sa recherche impossible. Cependant, au vu des résultats décrit par Devy et ses collaborateurs sur les effets des peptides d'élastine sur le développement du mélanome (Devy et al., 2010) mais également dans l'insulino-résistance (Blaise et al., 2013), il est probable qu'une protéine assurant les mêmes fonctions biologiques soit présente car l'utilisation d'antagonistes de type galactoside permet de bloquer les effets des EDPs chez la souris. Les deux autres sous-unités PPCA et Neu-1 du CRE ont donc été recherchées dans les cellules B16F1 traitées ou non aux peptides d'élastine. Comme le montre les résultats (Figure 31A), les sous-unités PPCA et Neu-1 du CRE sont exprimées dans notre modèle cellulaire. De plus, aucune modification du niveau d'expression n'est observée après un traitement aux peptides d'élastine. Ces résultats permettent donc de mettre en évidence la présence d'au moins deux des trois sous-unités du CRE dans notre modèle cellulaire.

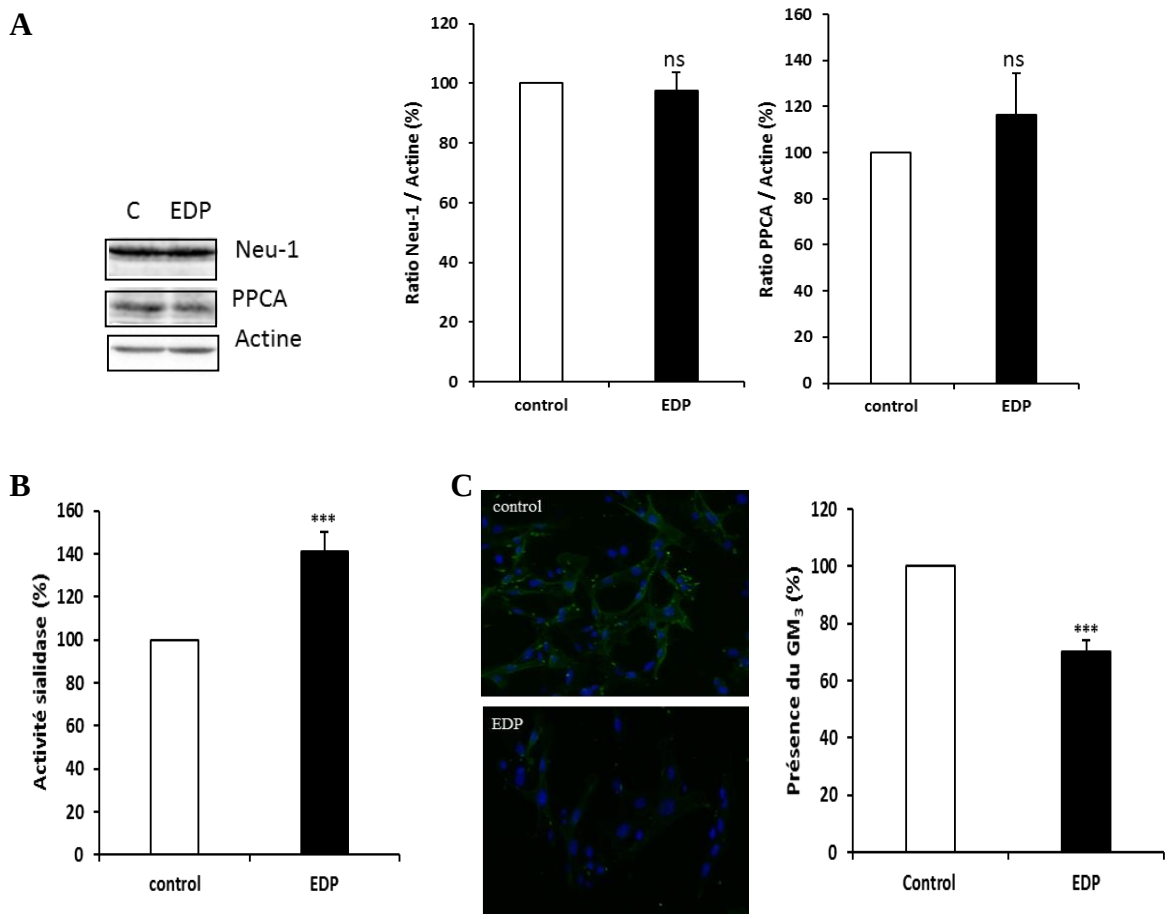


Figure 31. Les effets des peptides d'élastine dans les cellules B16F1 impliquent le CRE. **A.** L'expression des sous-unités Neu-1 et PPCA dans les cellules B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (50 µg/ml) ont été analysées par Western blot. La densitométrie est représentative de l'ensemble des expériences (n=3) et est réalisée à l'aide du logiciel Quantity One. **B.** L'activité sialidase des cellules B16F1 traitées ou non aux EDP (kE, 50 µg/ml) a été évaluée en utilisant un substrat chromogénique, le *para*-nitrophenyl-NANA, selon le protocole décrit dans la section de Matériel et Méthodes. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences (n=3) **C.** Présence du GM_3 membranaire a été analysée dans les cellules traitées ou non avec des EDP (50 µg/ml) par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-GM_3 (M2590) puis un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor-488. La fluorescence a été observée au microscope à épifluorescence à l'objectif ×20. La quantification de la fluorescence a été réalisée par le logiciel Image J, et l'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences (n=3). *** $p < 0{,}001$.

Afin de montrer la fonctionnalité du CRE dans les cellules B16F1et plus précisément l'activation de Neu-1, nous avons mesuré l'activité sialidase membranaire en présence de peptides d'élastine. Nos résultats montrent une augmentation significative de l'activité sialidase en présence de peptides d'élastine dans les cellules B16F1 (Figure 31B). L'activité sialidase de Neu-1 induit la conversion du GM_3 membranaire en lactosylcéramide (LacCer), un second messager intracellulaire impliqué dans la transduction du signal induit par les peptides d'élastine (Rusciani et al., 2010). Afin de corréler l'augmentation de l'activité sialidase de Neu-1 induite par les peptides d'élastine à l'hydrolyse du GM_3 membranaire, nous avons analysé la présence de GM_3 à la membrane des cellules B16F1 en présence ou non de peptides

d'élastine. L'immunomarquage du GM_3 (vert), ainsi que la quantification de ce dernier, montrent une diminution significative du GM_3 dans les cellules B16F1 traitées aux peptides d'élastine (Figure 31C). Ainsi l'augmentation de l'activité sialidase est corrélée à la diminution du GM_3 dans les cellules B16F1 démontrant la fonctionalité du CRE tel que nous l'avons décrit auparavant (Rusciani et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats confirme la présence et la fonctionalité du CRE dans les cellules B16F1. Nous avons par la suite évalué l'influence de l'inhibition de Neu-1 par le Dana sur des processus pro-tumoraux induits par les EDPs.

1. Impact *in vitro* de l'inhibition de Neu-1 dans le mélanome

Le développement tumoral est un processus très complexe faisant intervenir un grand nombre d'évènements cellulaires comme la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion, la sécrétion de protéases et la dérégulation de voies de signalisation. Dans notre étude, nous proposons d'évaluer dans un premier temps l'efficacité de l'inhibition de l'activité sialidase de Neu-1 sur la prolifération cellulaire, la migration, l'expression de protéases et l'activation des voies de signalisation induites par les EDPs

a) Impact de l'inhibition de Neu-1 sur la prolifération induite par les peptides d'élastine

Les peptides d'élastine présentent des propriétés pro-prolifératives dans les cellules normales (Ghuysen-Itard et al., 1992; Mochizuki et al., 2002; Tajima et al., 1997) et tumorales telles que les cellules de mélanome comme nous l'avons montré ultérieurement au sein du laboratoire (Devy et al., 2010). Nous avons ainsi évalué l'effet du Dana sur ce processus (Figure 32). Pour cela, la prolifération des cellules B16F1 a été évaluée en présence de peptides d'élastine avec ou sans prétraitement au Dana. La prolifération a ensuite été déterminée par comptage cellulaire en présence de bleu Trypan.

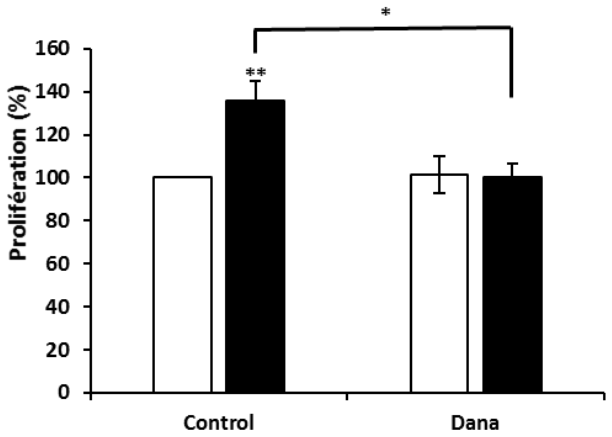


Figure 32. Inhibition de la prolifération induite par les peptides d'élastine par le Dana. La prolifération des cellules de B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non d'un prétraitement au Dana (400 µM) a été analysée par comptage au Bleu Trypan après 48 h de stimulation à 37°C. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Nos résultats montrent une augmentation significative de la prolifération des cellules B16F1 en présence de peptides d'élastine. De plus, cette augmentation est significativement réduite par un prétraitement des cellules avec l'inhibiteur Dana à 400 µM. Ainsi ces résultats montrent que l'inhibition de l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 du CRE est capable de moduler la prolifération des cellules B16F1 induite par les peptides d'élastine *in vitro*.

b) Impact de l'inhibition de Neu-1 sur l'invasion induite par les peptides d'élastine

Les peptides d'élastine sont capables non seulement de promouvoir la croissance tumorale mais également l'invasion en sur-régulant la protéolyse matricielle (Maquart et al., 2004). Ces observations ont notamment été réalisées dans des cellules de fibrosarcomes, de cancer du poumon (Huet et al., 2002a; Toupance et al., 2012), et dans le mélanome (Devy et al., 2010; Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007). L'invasion tumorale fait intervenir deux processus cellulaires bien définis que sont la protéolyse matricielle et les capacités migratoires des cellules tumorales leur permettant d'envahir le tissu sous-jacent. Nous avons démontré que les peptides d'élastine étaient capables de promouvoir la migration, et la surexpression de la MMP-1, responsable de l'invasion des cellules de mélanomes. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact de l'inhibition de la sous-unité Neu-1 sur ces deux processus (Figure 33).

Comme nous l'avons déjà décrit, les peptides d'élastine sont capables de moduler significativement la migration cellulaire et l'expression de la MMP-1 (Figure 33). L'inhibition de l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 par le Dana est capable de réduire significativement ces effets tant sur l'augmentation des capacités migratoires des cellules (Figure 33A) que sur la surexpression de la MMP-1 (Figure 33B). Ces données suggèrent que le Dana est capable d'influencer l'invasion du mélanome induit par les peptides d'élastine *in vitro*, en plus de la croissance tumorale précédemment décrite.

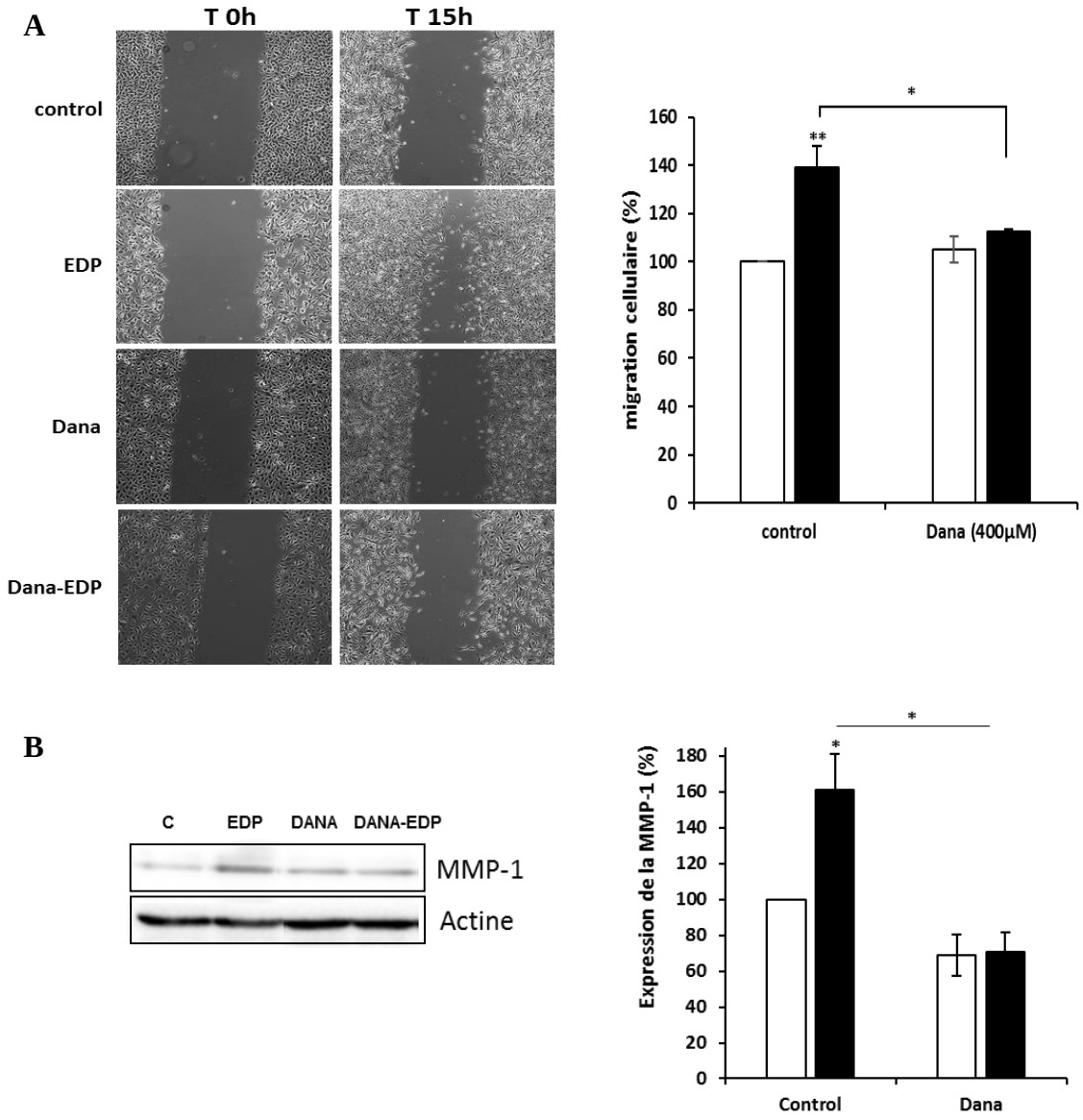


Figure 33. Le Dana inhibe la migration et l'expression de la MMP-1 induites par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1. **A.** Les capacités migratoires des cellules B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de Dana (400 µM) ont été évaluées par la méthode de blessure cicatricielle. Des photographies ont été réalisées à T0h, T15h et la distance parcourue a été mesurée. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3). **B.** La présence de MMP-1 dans les extraits totaux de cellules B16F1 traitées ou non avec des EDP (50 µg/ml) en présence ou non de Dana (400 µM) a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps anti-MMP-1 et révélée par chimiluminescence. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3). * $p < 0,01$.

c) Impact de l'inhibition de Neu-1 sur la signalisation des peptides d'élastine.

Les peptides d'élastine régulent un grand nombre de fonctions biologiques au travers l'activation de différentes voies de signalisation, qui sont dépendantes du type cellulaire utilisé (Duca et al., 2002, 2005; Fahem et al., 2008; Mochizuki et al., 2002). Parmi elles, la voie de signalisation « *Extracellular signal-regulated Kinase 1/2* (ERK1/2) régule la prolifération cellulaire, la migration et la sécrétion de protéases. Ces trois processus cellulaires sont impliqués dans l'invasion tumorale. Duca et ses collaborateurs ont montré que les peptides d'élastine régulent cette voie de signalisation impliquant les cascades p110γ /Raf-1 et PKA/B-Raf (Duca et al., 2002, 2005). Ces voies de signalisation modulées par les peptides d'élastine menant à l'activation d'ERK1/2 sont impliquées dans l'invasion du mélanome et plus particulièrement dans le potentiel métastatique de ce dernier (Wang and Qi, 2013). Nous avons donc analysé le niveau de phosphorylation de ERK1/2, traduisant son activation, afin d'étudier l'impact du Dana sur les cellules B16F1 stimulées avec les peptides d'élastine (Figure 34).

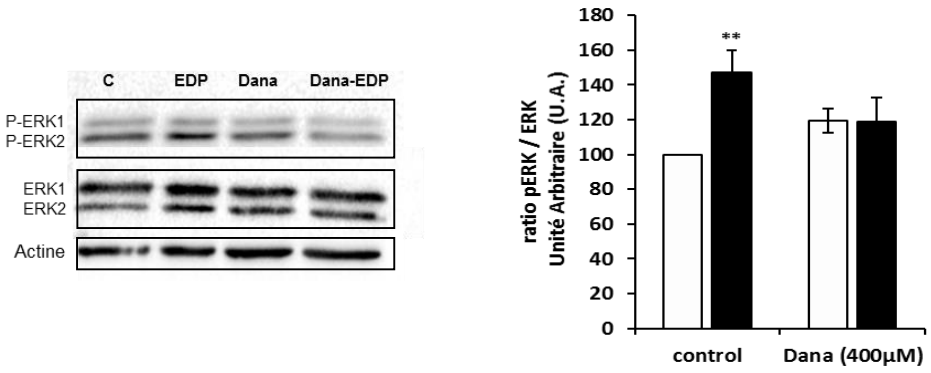


Figure 34. Le Dana inhibe l'activation d'ERK1/2 induite par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1. Le niveau d'activation d'ERK1/2 a été analysé par Western blot dans des cellules B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non d'un prétraitement au Dana (400 µM). Le ratio phosphoERK1/2 /ERK1/2 traduit le niveau d'activation de la voie ERK1/2. Le ratio phosphoERK1/2 /ERK1/2 total présenté est représentatif des différentes expériences réalisées (n=3). ** p <0,01.

Comme le montre la Figure 34, les peptides d'élastine augmentent significativement le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 par une voie dépendante nécessitant une activité sialidase car ce processus est bloqué par l'utilisation de Dana.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'inhibition de la sous-unité Neu-1 du CRE par le Dana permet de bloquer les effets pro-tumoraux *in vitro* des EDPs (prolifération et migration cellulaire, production de protéases, activation d'ERK1/2) suggérant un effet potentiel sur le développement des mélanomes *in vivo*. Nous avons donc cherché à valider cette hypothèse.

2. Impact *in vivo* de l'inhibition de Neu-1

Dans cette partie, nous avons étudié les effets du Dana dans un modèle complexe de développement tumoral en utilisant le modèle d'allogreffes de cellules B16F1, précédemment utilisées pour démontrer les effets des peptides d'élastine sur le mélanome *in vivo* (Devy et al., 2010). Pour cela, des cellules B16F1 stimulées ou non avec des peptides d'élastine et prétraitées ou non avec du Dana (400 µM) sont injectées en sous-cutané à des souris C57B/J6 de 8 semaines, âge auquel les souris sont considérées comme adultes. Le développement tumoral est ensuite suivi pendant 14 jours et un rappel des différents traitements est effectué en péri tumoral tous les trois jours.

Suite à la transplantation des cellules B16F1, les tumeurs sont détectables à partir de J6 et deviennent mesurables à partir de J9 (Figure 35A). Comme le montre la Figure 35, comparativement aux souris contrôles, nous observons un volume tumoral plus important dans les souris traitées aux peptides d'élastine après 9 jours de développement tumoral et ce jusqu'à 14 jours (Figure 35A-C). Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment décrits et confirment le rôle pro-tumoral des peptides d'élastine dans le développement du mélanome *in vivo*. Pour la première fois, nous démontrons que le Dana réduit significativement les effets des peptides dans le développement du mélanome *in vivo* à J9 et jusqu'à J14. De plus, l'utilisation d'un Scanner Micro-CT (Lee et al., 2014c) a permis de reconstruire les tumeurs en 3D confirmant les résultats obtenus par mesure manuelle au pied à coulisse (Figure 35D). Par conséquent, ces résultats confirment que l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 joue un rôle essentiel dans les effets pro-tumoraux des peptides d'élastine. De plus, ils soulignent que son inhibition, par le Dana, semble suffire à inhiber totalement les effets des peptides d'élastine dans le développement tumoral du mélanome *in vivo*.

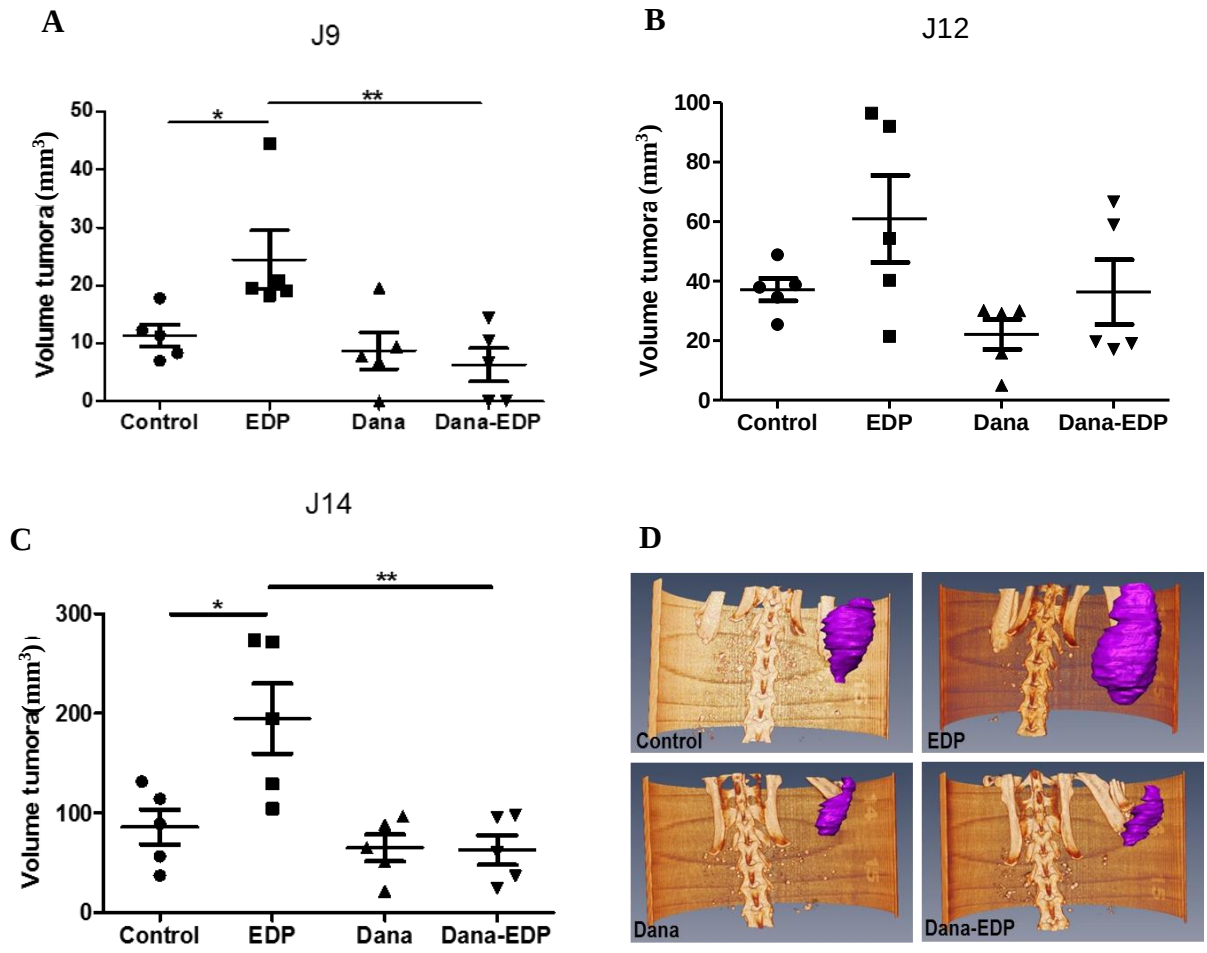


Figure 35. Le Dana réduit la croissance tumorale médiée par les peptides d'élastine *in vivo*. **A-C.** Les cellules de mélanome B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de Dana (400 µM) ont été injectées en sous-cutané à des souris syngéniques C57B/J6, à raison de 2.5 x 10^5 cellules par souris. Les souris ont été ensuite retraitées tous les 3 jours à raison de 5 mg/kg de EDP et/ou Dana (0,625mg/kg) en péri-tumoral. Les souris ont été mises à mort après 14 jours de développement tumoral. La taille des tumeurs a été mesurée au pied à coulisse et l'analyse statistique a été réalisée par le test de Mann Whitney. Les données représentent la moyenne sur 5 souris par condition. **D.** Après analyse au microCT, les tumeurs ont été reconstruites en utilisant le logiciel AMIRA. Les tumeurs reconstruites sont représentatives de chaque groupe de traitement. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Après 14 jours de développement tumoral, les tumeurs ont été analysées par immuno-histochimie. Pour cela, différents marqueurs sont analysés donnant des informations sur les capacités prolifératives des tumeurs *via* le marqueur Ki 67 (Matsumoto et al., 1999), ou encore sur l'angiogenèse tumorale développée pendant la progression du mélanome au travers l'expression du marqueur pro-angiogénique VEGF (Senger et al., 1997). Ces deux marqueurs permettent de donner une information sur l'agressivité d'une tumeur et sont par ailleurs utilisés en clinique pour prédire le potentiel métastatique de certains types de cancers (Boonkitticharoen et al., 2008). Nous avons également analysé l'expression de la MMP-1 dans les différentes

tumeurs traitées ou non aux peptides d'élastine en présence ou en absence d'un traitement au Dana (400 µM).

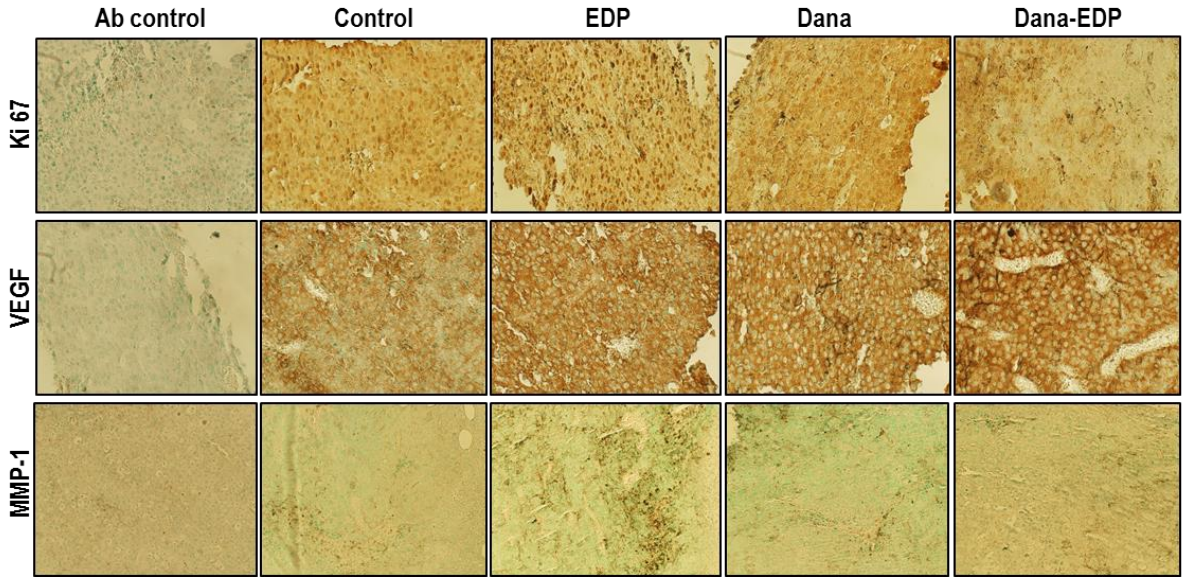


Figure 36. Analyse par immunohistochimie du Ki67, VEGF et de la MMP-1 dans les tumeurs issues des allogreffes de cellules B16F1. L'expression du Ki67, VEGF et MMP-1 dans les tumeurs traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 5 mg/kg) en présence ou non de Dana (0,625mg/kg) est analysée par immunohistochimie. Les coupes de tumeurs sont marquées avec les anticorps anti-Ki67, anti-VEGF et anti-MMP-1 qui apparaissent en une coloration brun/noir. Les coupes sont ensuite sur-colorées au vert de méthyle et observées au microscope optique à l'objectif ×20.

Nos résultats montrent une augmentation de l'expression du marqueur nucléaire Ki67 et du facteur pro-angiogénique VEGF dans les tumeurs traitées aux peptides d'élastine comparativement aux tumeurs contrôles (Figure 36). Ces augmentations d'expression démontrent les capacités pro-prolifératives et pro-angiogéniques des tumeurs traitées avec des peptides d'élastine et sont en corrélation avec l'augmentation du volume tumoral précédemment observé (Figure 35). Par ailleurs, nous démontrons également que les tumeurs traitées au Dana seul ou combinées avec les peptides d'élastine montrent une faible expression nucléaire du marqueur de prolifération Ki67 mais une forte et inattendue expression du facteur angiogénique VEGF (Figure 36). Le marquage de la MMP1 montre également que le Dana est capable de diminuer l'expression de la MMP-1 induite par les peptides d'élastine (Figure 36). Ainsi, le Dana semble inhiber la sécrétion de la MMP-1 ainsi que la prolifération dépendante des peptides d'élastine dans le mélanome *in vivo* mais potentialise l'angiogenèse au travers d'une sur-régulation de l'expression du VEGF. Cependant, il est important de noter que, malgré l'augmentation de l'angiogenèse dans les tumeurs traitées au Dana seul ou combiné aux peptides d'élastine, celle-ci ne semble pas favoriser le développement tumoral au vu des résultats obtenus précédemment sur les volumes tumoraux (Figure 35).

L'ensemble de ces résultats permet de démontrer que le Dana est capable de réguler la progression du mélanome médiée par les peptides d'élastine *in vivo* malgré une angiogenèse exarcerbée.

3. Influence de l'inhibition de Neu-1 sur l'angiogenèse

Au vu des résultats obtenus dans l'étude du VEGF par immunohistochimie dans les tumeurs traitées au Dana seul ou combiné aux peptides d'élastine, il semble que Neu-1, et plus particulièrement l'activité sialidase de Neu-1, soit directement capable d'influencer l'angiogenèse tumorale *in vivo.* Dans le but de confirmer ces observations, nous avons étudié l'influence de l'inhibition de l'activité sialidase de Neu-1 sur l'angiogenèse en utilisant des modèles *in vitro, ex vivo* et *in vivo*.

a) Impact in vitro de l'inhibition de Neu-1

Dans un premier temps, nous avons analysé l'influence de l'inhibition de l'activité sialidase de Neu-1 dans un modèle d'angiogenèse *in vitro,* la formation de pseudotubes sur Matrigel. En effet, le Matrigel reconstitue le microenvironnement biologique et permet ainsi aux cellules endothéliales de créer une vascularisation par formation spontanée de pseudotubes. Cette méthode est reconnue comme un modèle de référence pour étudier l'angiogenèse *in vitro* (Zimrin et al., 1995).

Nos résultats montrent une augmentation des capacités à former spontanément des pseudotubes sur Matrigel dans les cellules endothéliales traitées aux peptides d'élastine comparativement au contrôle (Figure 37A). Par ailleurs, cette dernière s'accompagne d'une augmentation significative du nombre de nœuds et de la longueur du réseau vasculaire sans affecter le nombre de mailles (Figure 37B). De manière intéressante dans la Figure 37 A, le Dana seul ou combiné aux peptides d'élastine induit une importante formation de pseudotubes sur Matrigel, confirmant ainsi les résultats obtenus sur l'angiogenèse tumorale *in vivo*. Cette dernière implique à la fois une augmentation significative du nombre de nœuds, du nombre de mailles et également de la longueur du réseau vasculaire (Figure 37B). Il est important de noter que le Dana augmente la longueur du réseau vasculaire de manière similaire à celui créé après un traitement avec des peptides d'élastine. Cependant, les pseudotubes présentent une meilleure organisation vasculaire en présence de Dana, comme le montre l'augmentation du nombre de nœuds et de mailles comparativement aux peptides d'élastine.

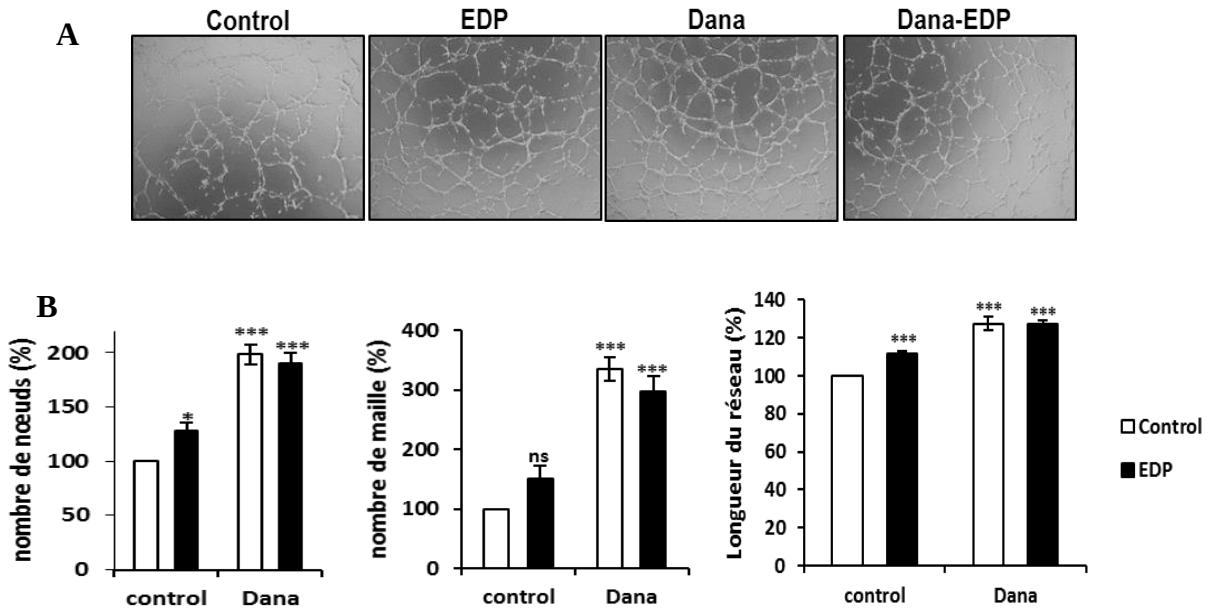


Figure 37. Effet du Dana sur l'angiogenèse *in vitro*. **A.** La formation de pseudotubes sur Matrigel a été réalisée en présence de cellules traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) et/ou en présence de Dana (400 µM) dans du milieu complet. La tubulogenèse s'est effectuée à 37°C entre 8h et 24h d'incubation. **B.** Les pseudotubes formés ont ensuite été analysés par Image J avec la macro « angiogenesis analyzer » permettant de quantifier le nombre de nœuds, de mailles et la longueur du réseau. Les histogrammes sont représentatifs de l'ensemble des résultats obtenus (n=3). * p <0,05, *** p < 0,001.

b) Impact de l'inhibition de Neu-1 ex vivo

Au vu des résultats précédemment obtenus, il semble que l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 puisse moduler l'angiogenèse. Afin de confirmer ces résultats, nous nous sommes intéressés aux effets de l'inhibition de la sous-unité Neu-1 par le Dana dans un modèle d'angiogenèse *ex vivo* plus complexe, la méthode des anneaux aortiques. Cette méthode consiste à récupérer des aortes thoraciques de souris, puis à réaliser des anneaux d'environ 1 mm de long pour ensuite les replacer en culture dans une matrice de Matrigel, gel qui reconstitue le microenvironnement biologique. Les anneaux sont ensuite mis en contact avec les différents traitements que sont les peptides d'élastine (50 µg/ml) en présence ou non de Dana (400 µM).

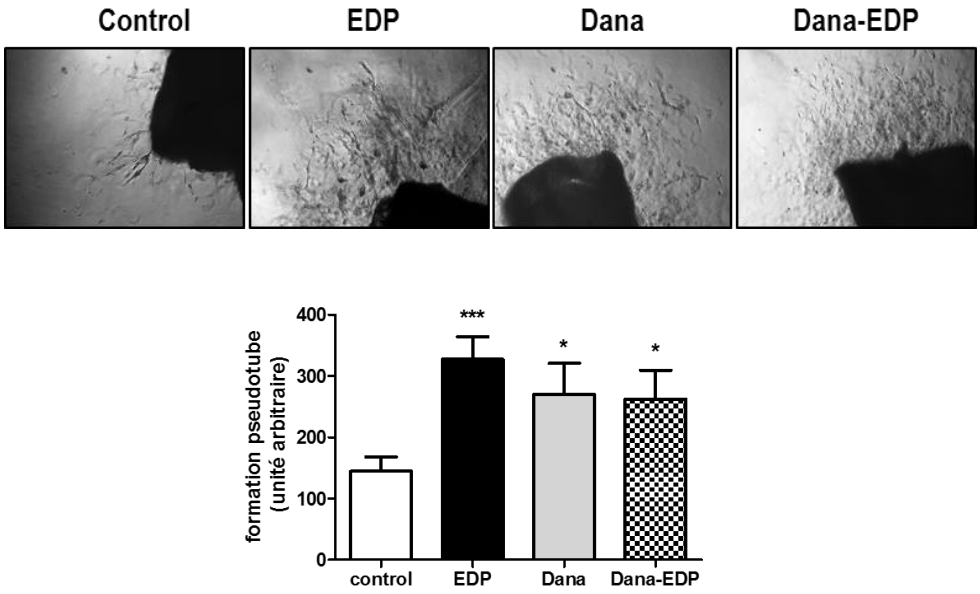


Figure 38. Impact du Dana sur l'angiogenèse *ex vivo*. Les aortes thoraciques ont été obtenues à partir de souris C57Bl6 de 8 semaines. Après avoir été dégraissées, des anneaux homogènes d'environ 1 mm de long ont été réalisés puis placés entre deux couches de matrigel. Les anneaux aortiques sont ensuite traités ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) et/ou avec du Dana 400 µM pendant 14 jours à raison d'un changement de milieu tous les 3 jours. Des photographies sont réalisées au microscope inversé à l'objectif ×10. L'étalement des pseudotubes est mesuré par le logiciel Image J et l'histogramme représente l'ensemble des résultats obtenus (n=12). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Les résultats montrent une augmentation de la néo-angiogenèse à partir de l'anneau aortique dans ceux traités avec des peptides d'élastine comparé aux contrôles (Figure 38). Par ailleurs, les résultats obtenus en présence de Dana seul ou combiné aux peptides d'élastine démontrent une très nette augmentation de la néo-angiogenèse. Ces résultats sont en parfaite cohérence avec ceux obtenus *in vitro*.

c) Impact de l'inhibition de Neu-1 in vivo

Les modèles d'angiogenèse *in vitro* et *ex vivo* sont de très bons modèles, cependant l'angiogenèse est un processus complexe multi-étapes impliquant de nombreux acteurs moléculaires (Potente et al., 2011). De nombreux modèles d'angiogenèse *in vivo* ont été par développés pour palier à ce problème. Parmi eux, le modèle de Matrigel plug consiste à injecter un bouchon de Matrigel en sous-cutané à une souris et à laisser l'angiogenèse se mettre en place *in vivo* (Akhtar et al., 2002a; Norrby, 2006). Afin d'être homogène par rapport au développement tumoral étudié précédemment, nous avons effectué des rappels tous les 3 jours en péri-Matrigel puis nous avons analysé les bouchons de Matrigel après 14 jours de développement angiogénique.

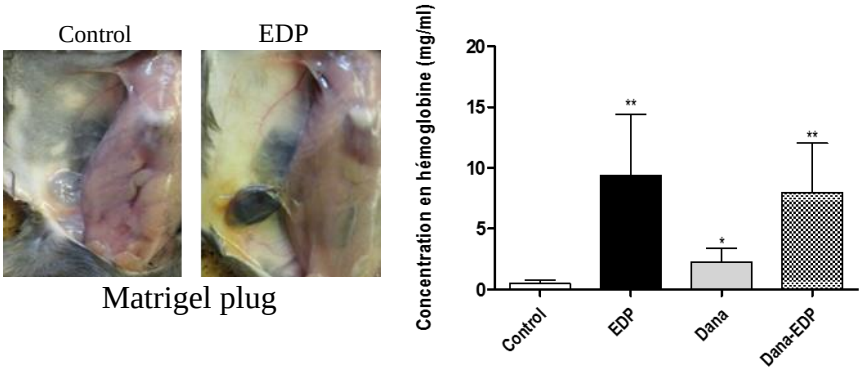


Figure 39. Impact du Dana sur l'angiogenèse *in vivo*. Les Matrigels contenant de l'héparine (25 U/ml), du bFGF (250 ng/ml) supplémenté de peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) avec ou sans Dana (400 µM) sont mis sous agitation toute une nuit à 4°C avant d'être injectés en sous-cutané à des souris C57Bl6 de 8 semaines. La mise en place de l'angiogenèse s'effectue pendant 14 jours avec des rappels des traitements tous les 3 jours. Les bouchons sont ensuite récupérés et l'hémoglobine est dosée. L'histogramme représente l'ensemble des résultats obtenus pour 5 souris par groupe. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Après 14 jours, les bouchons de Matrigel sont récupérés et l'hémoglobine présente est dosée. La quantité d'hémoglobine est proportionnelle à l'angiogenèse présente dans le bouchon. Les résultats montrent une augmentation significative de l'hémoglobine présente dans les bouchons traités aux peptides d'élastine (Figure 39). Ces résultats montrent que les peptides d'élastine induisent une angiogenèse *in vivo* et renforcent l'ensemble des résultats démontrant leurs capacités pro-angiogéniques. Tout comme dans les travaux réalisés *in vitro* et *ex vivo*, le Dana seul ou combiné aux peptides d'élastine induit une augmentation significative du taux d'hémoglobine dans les bouchons, ce qui démontre que le Dana est capable de réguler l'angiogenèse (Figure 39).

Nos résultats montrent que l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 participe à la régulation de l'angiogenèse. Cependant, il est important de noter que, dans notre cas, l'angiogenèse mise en place au cours du développement tumoral du mélanome ne semble pas favoriser la tumeur, au vu des résultats observés sur les volumes tumoraux (Figure 35). Cette stratégie semble donc prometteuse et innovante pour lutter contre les effets néfastes des peptides d'élastine produits par fragmentation de la matrice stromale au cours de la progression du mélanome.

B. Ciblage thérapeutique de la sous-unité EBP lors du développement tumoral du mélanome.

Dans la première partie de cette étude, nous avons démontré que l'inhibition de l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 pourrait être efficace. Néanmoins, l'EBP peut également être une cible tout aussi intéressante (Figure 40). En effet, la liaison des peptides d'élastine à l'EBP représente le premier évènement moléculaire de la cascade de signalisation activée par ces derniers. Dans cette seconde partie, nous proposons donc de développer un antagoniste de l'EBP visant à bloquer le développement tumoral du mélanome médié par les peptides d'élastine. Enfin nous avons également évalué l'efficacité d'une co-inhibition des sous-unités EBP et Neu-1 (Figure 40).

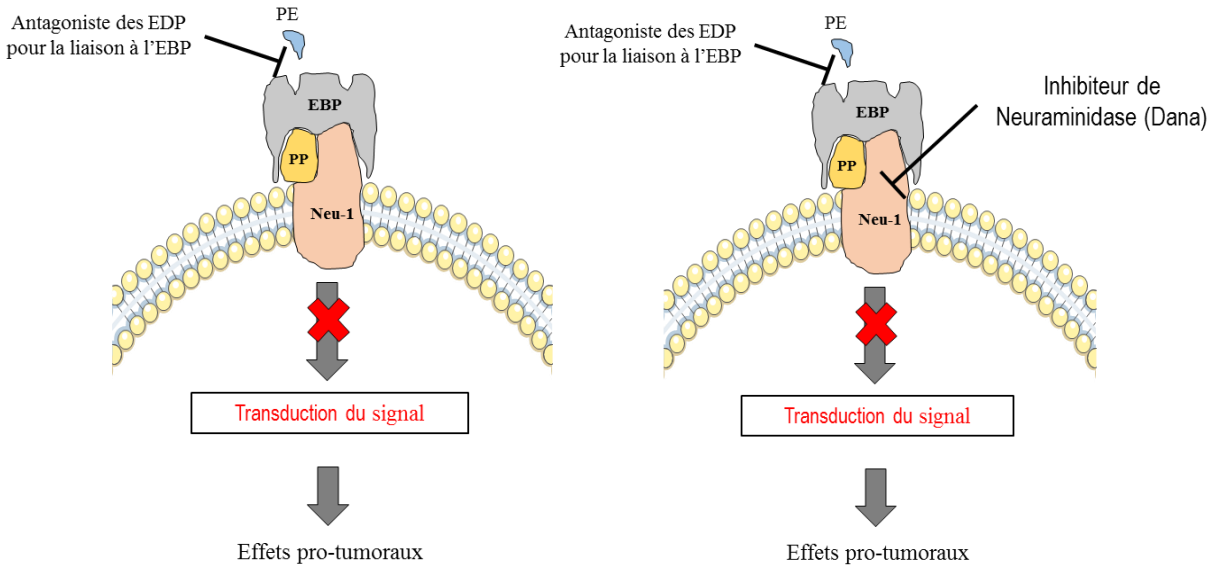


Figure 40. Représentation schématique de la stratégie adoptée pour lutter contre les effets pro-tumoraux des peptides d'élastine : inhibition de la sous-unité EBP, inhibition conjointe des sous-unités EBP et Neu-1.

1. Développement d'une nouvelle approche par étude *in silico*

Nous avons en premier lieu décidé de développer un antagoniste de la liaison peptide d'élastine-EBP en utilisant des outils de prédiction par modélisation moléculaire. Cet outil a permis de caractériser l'interaction des peptides avec l'EBP à l'aide d'un modèle moléculaire de l'EBP qui a été construit par homologie de séquence (Blanchevoye et al., 2013). Dans celui-ci, la séquence V32 de l'EBP, spécifique à cette protéine, permet la liaison des peptides d'élastine et de la tropoélastine (Blanchevoye et al., 2013; Mecham et al., 1991). Au sein de

celle-ci, des résidus clefs ont été ainsi identifiés. Les résidus L103, R107, E137 forment des liaisons ioniques avec le peptide VGVAPG et stabilisent l'interaction VGVAPG-EBP. De plus, les séquences QDEA et SYNS du V32 ont été identifiées comme importantes dans l'interaction VGVAPG/EBP (Blanchevoye et al., 2013). Ici, nous proposons d'utiliser le V14, correspondant à une sous partie du V32, comme récepteur soluble pouvant ainsi théoriquement bloquer la liaison des peptides d'élastine à l'EBP. La séquence du V14 utilisée est la suivante : VVGSPSAQDEASPL.

Bien que ce peptide ait été décrit comme permettant de bloquer l'action des EDP (Robinet et al., 2007 ; Toupance et al., 2012), aucune étude n'a validé son rôle de récepteur soluble au travers de sa capacité à lier les EDPs limitant son utilisation pharmacologique. Nous avons donc entrepris de réaliser ceci afin de valider son rôle potentiel d'antagoniste de la liaison des EDPs à EBP.

a) Docking moléculaire V14-VGVAPG

Afin de prédire l'interaction entre VGVAPG, le peptide d'élastine de référence (Moroy et al., 2005), et le V14, nous avons réalisé des expériences de docking moléculaire en utilisant un logiciel spécialisé nommé Autodock. L'interaction EBP-VGVAPG a donc été utilisée tout au long de cette étude *in silico* comme référence, en terme d'énergie de liaison et d'interaction, pour évaluer la fiabilité de l'interaction V14-VGVAPG.

Dans un premier temps, nous avons analysé les clusters obtenus après le docking moléculaire. Les histogrammes sont représentatifs des résultats issus du docking moléculaire entre EBP-VGVAPG et V14-VGVAPG et sont présentés dans les Figures 41A et 41B, respectivement. Un cluster est constitué d'un ensemble de configurations qui ne différent les unes des autres que de 2 Å au plus. Plus un cluster est peuplé plus la conformation du peptide VGVAPG est fréquente et donc plus elle est probable. A l'issue du docking VGVAPG-EBP (Figure 41A), nous avons obtenu deux clusters majoritaires à environ -7,2 et -8 kcal.mol^{-1} représentant des énergies de liaison suffisantes et satisfaisantes pour permettre une interaction entre les deux molécules. Nous avons sélectionné le cluster majoritaire. Cependant l'autre ne diffère que par la conformation qu'adopte la partie APG du VGVAPG. La partie VGV est fixe et stable dans les deux clusters. La richesse de ces clusters et leur faible énergie de liaison confirment l'interaction entre l'EBP et le VGVAPG et valident donc ce système choisi comme référence pour la suite de l'étude.

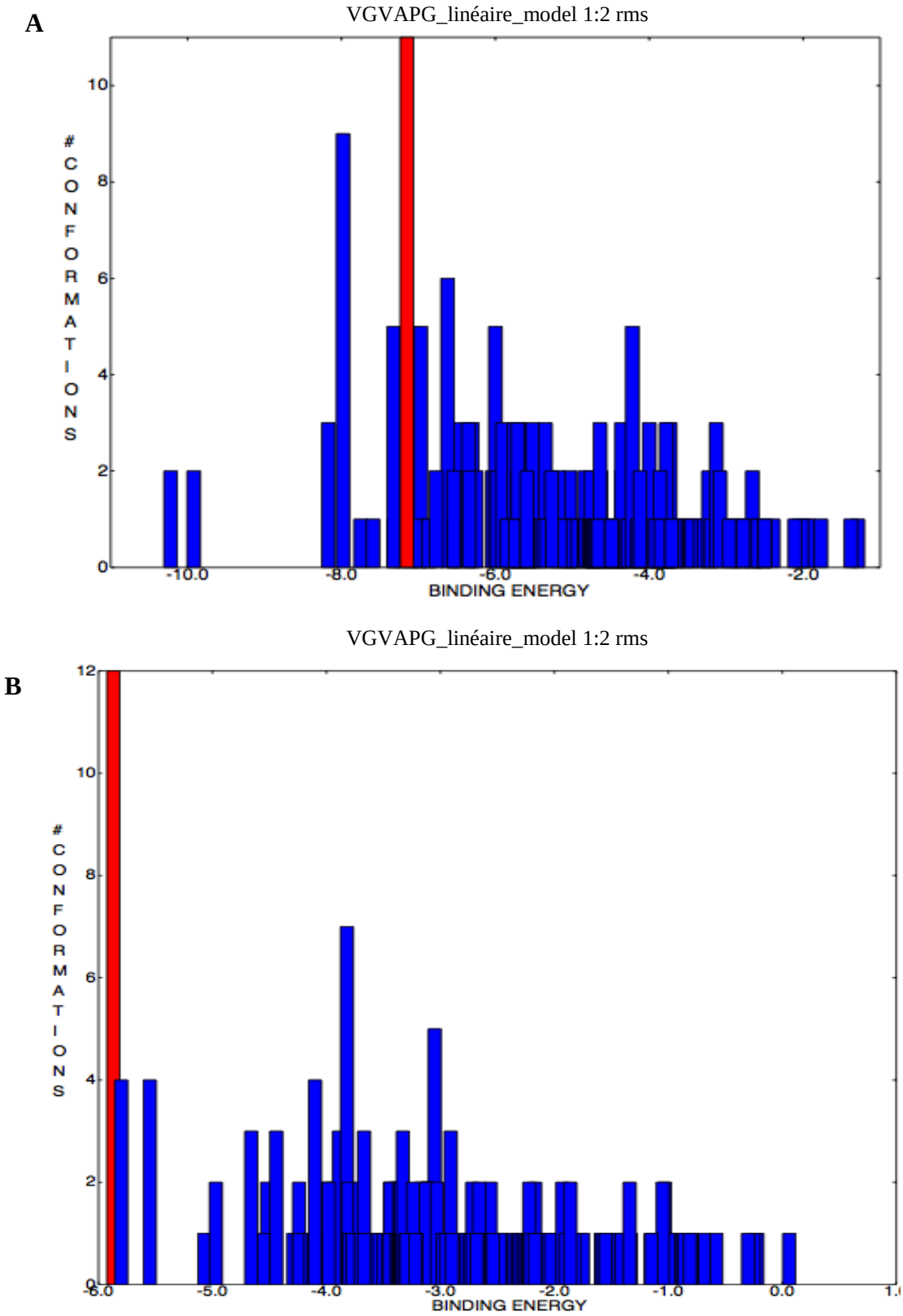


Figure 41. Représentation des différents clusters obtenus en fonction de leur énergie. **A.** Docking moléculaire entre le EBP et VGVAPG. Après avoir préparé les deux molécules et la boite contenant le système, le docking a été lancé sur 250 runs. L'histogramme représente les clusters de configuration qu'adopte le VGVAGP en fonction du niveau d'énergie. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des dockings réalisés (n=3). **B.** Docking moléculaire entre le V14 et VGVAPG. Après avoir préparé les deux molécules et la boîte contenant le système, le docking a été lancé sur 250 runs. L'histogramme représente les clusters de configuration qu'adopte le VGVAGP en fonction du niveau d'énergie. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des dockings réalisés (n=3).

Suite au docking moléculaire du VGVAPG sur le V14 (Figure 41B), nous avons obtenu un unique cluster majoritaire présentant une énergie de liaison de -6 kcal.mol^{-1}. L'énergie de liaison du docking V14-VGVAPG est légèrement moins forte comparée à celle obtenue avec l'EBP. Cependant, le V14 est plus petit provoquant ainsi plus de solutions au VGVAPG. Néanmoins, le nombre de candidats associés à une valeur d'énergie de liaison convenable permet de conclure que le V14 et le VGVAPG semblent être capables d'interagir ensemble.

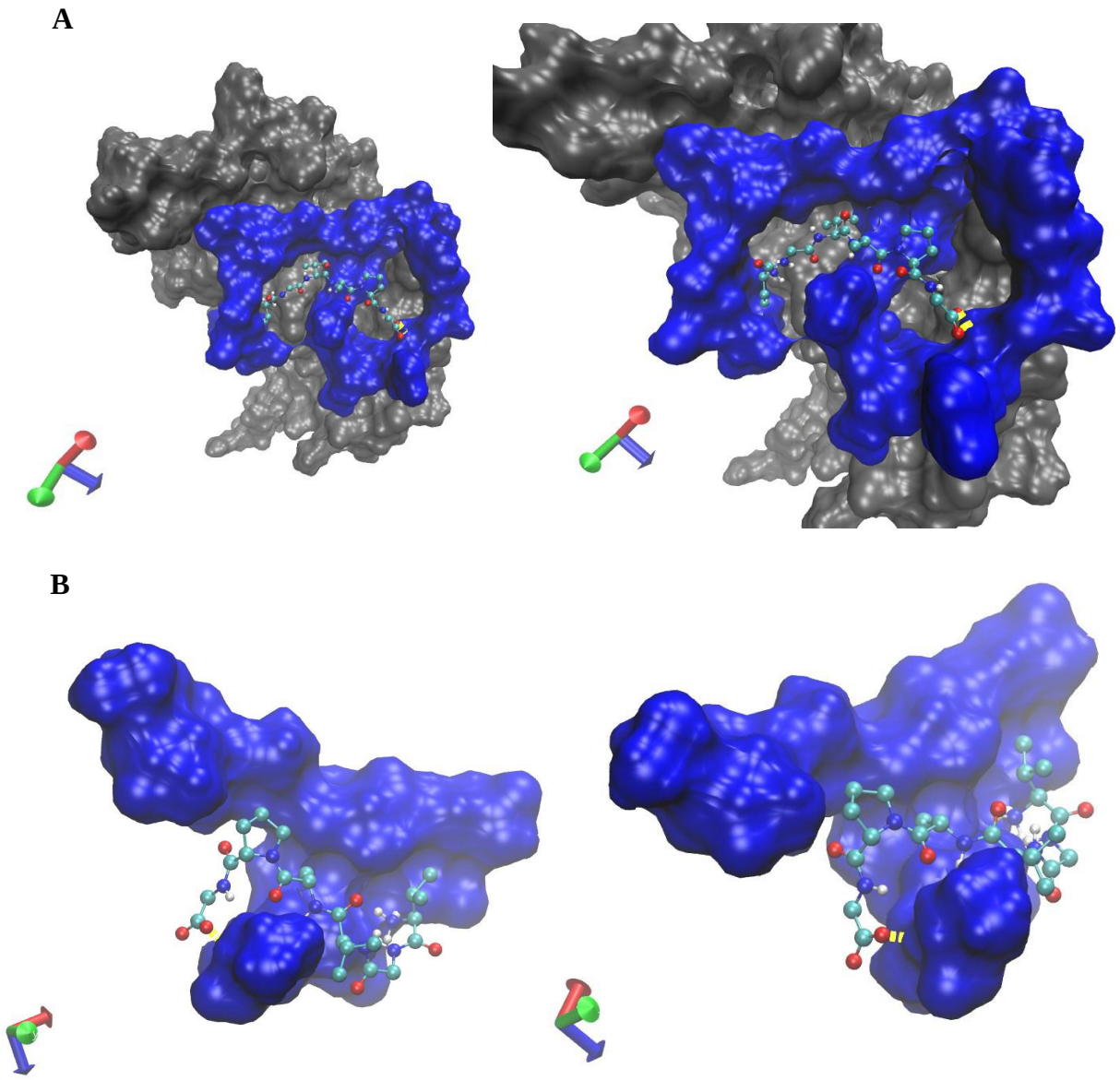


Figure 42. Visualisation des conformations majoritaires obtenues après le docking moléculaire des deux systèmes. **A.** Docking moléculaire entre EBP et VGVAPG. **B.** Docking moléculaire entre V14 et VGVAPG. Le logiciel VMD est utilisé afin de visualiser les structures et l'interaction après le docking moléculaire. En bleu est représenté la partie V32 de l'EBP (**A.)** ou V14 (**B.**), et le peptide VGVAPG est représenté en mode CPK (bleu : azote, rouge : oxygène et cyan : carbone). Les liaisons hydrogènes sont représentées en jaune.

Afin de confirmer les interactions potentiellement obtenues par le docking moléculaire, nous avons analysé la configuration des clusters les plus peuplés (Figure 42). Ainsi, le logiciel

de visualisation moléculaire VMD nous permet de mettre en évidence des distances propices à la formation d'interactions telles que des liaisons hydrogènes ou liaisons ioniques, des interactions électrostatiques ou hydrophobes impliquées dans la stabilisation de l'interaction. Dans la Figure 42A, nous observons la formation d'au moins une liaison hydrogène entre le VGVAPG et l'EBP, ainsi qu'une forte interaction hydrophobe entre le résidu L103 et la partie centrale VA du VGVAPG. Ces deux interactions potentielles permettent ainsi de prédire une stabilisation du complexe VGVAPG / EBP. Les résultats obtenus sont par ailleurs cohérents avec ceux reportés dans la littérature (Blanchevoye et al., 2013). La Figure 42B représente l'interaction V14-VGVAPG stabilisée par une liaison hydrogène entre le résidu G de APG et le résidu leucine L103 du V14. Ce résidu est également impliqué dans la formation d'une interaction hydrophobe entre le VA du VGVAPG. Ce complexe peut donc être stabilisé par ces deux interactions. Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet de prédire que l'interaction entre le V14 et le VGVAPG est possible et présente des propriétés trés similaires à l'interaction EBP-VGVAPG.

b) Dynamique moléculaire V14-VGVAPG

Nous avons précédemment prédit que l'interaction VGVAPG-V14 était probable et qu'elle pourrait être également stabilisée. Une manière très efficace de vérifier la stabilité d'un complexe est de vérifier sa stabilisation temporelle. En effet, cette méthode permet d'observer comment évolue le complexe au cours du temps, donnant ainsi des informations sur les structures, les conformations et sur la stabilité du complexe dans des conditions expérimentales connues et paramétrées. Pour chaque système, nous avons réalisé 200 ns de dynamique moléculaire en utilisant GROMACS, ce qui représente un temps suffisamment long et significatif pour étudier la stabilité des systèmes (Van Der Spoel et al., 2005; Pronk et al., 2013). De plus, nous avons utilisé le peptide V14 avec ces deux extrémités fixées afin de mimer les contraintes stériques rencontrées par le peptide au sein de l'EBP. Ce peptide a été nommé V14-Fixe.

La séquence QDEA joue un rôle essentiel dans l'interaction VGVAPG-EBP. C'est pourquoi nous avons analysé l'évolution de la distance entre les centres de masse des résidus QDEA du V14, contenu dans l'EBP ou sous forme peptidique, et celui du GV du VGVAPG (Figure 43). Ces deux groupes de résidus représentent des parties spécifiques de l'interaction.

Le panel du haut représente l'évolution de la distance entre les résidus QDEA du V14 contenu dans l'EBP et le GV du VGVAPG. Nous pouvons observer qu'il y a très peu de fluctuations entre les deux groupes de résidus au cours de la simulation. De plus, la distance est d'environ 8 Å ce qui est propice à une interaction entre les deux molécules. En effet, au-delà de 15 Å de distance, nous pouvons considérer que les deux molécules n'interagissent plus ensemble. Ces résultats montrent donc que durant 200 ns l'interaction VGVAPG-EBP est stable au cours du temps.

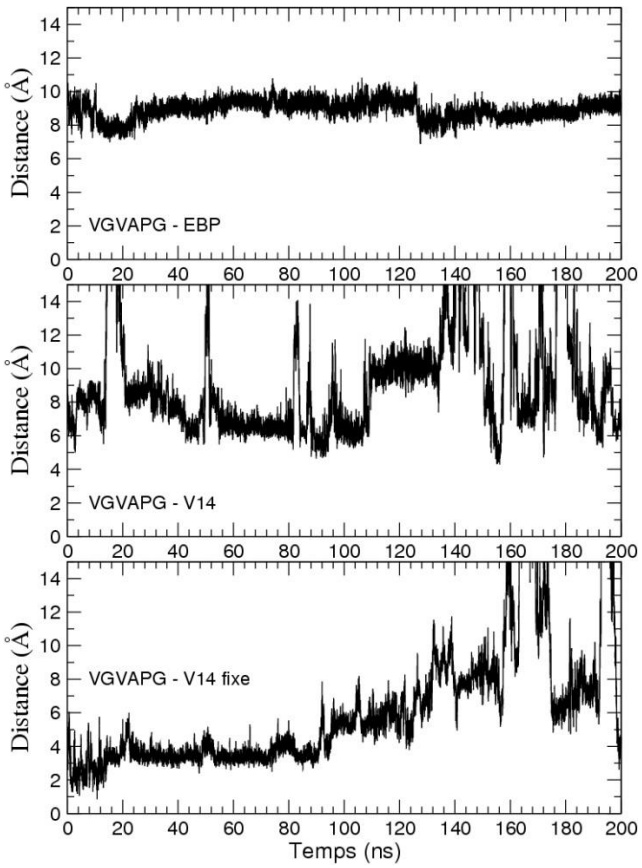


Figure 43. Représentation de l'évolution de la distance entre QDEA (V14/EBP) et GV(VGVAPG) au cours du temps. Après les 200ns de simulation de dynamique moléculaire, nous avons analysé la distance entre deux séquences connues pour interagir ensemble (QDEA et GV). Les graphes représentent l'évolution des distances en fonction du temps entre EBP et VGVAPG (haut), V14 et VGVAPG (milieu) et V14 Fixe et VGVAPG (bas).

Le panel du milieu représente l'évolution de la distance entre les résidus QDEA du V14 et le GV du VGVAPG. Dans ce cas, nous observons des fluctuations plus grandes mais une distance entre les deux groupes de résidus plus courte à environ 7 Å durant les 100 premières ns. Ces observations peuvent être expliquées par le fait que le V14 seul présente moins de contraintes stériques que le V14 contenu dans l'EBP, ce qui donne au peptide VGVAPG plus de possibilités de déplacement et une plus grande amplitude de mouvement possible.

Néanmoins, ces résultats montrent que malgré les fluctuations, les deux molécules restent globalement proches, ce qui permet de supposer une interaction durable entre ces deux molécules. Le panel du bas représente l'évolution de la distance entre les deux groupes de résidus précédemment décrit du V14 fixe et du VGVAPG. Nous observons des fluctuations essentiellement sur la fin de la simulation, cependant la distance globale entre les deux molécules reste faible. En effet, durant les 100 premières ns la distance est d'environ 4 Å. Nous montrons également que fixer les deux extrémités du V14 semble améliorer l'interaction et la stabilité entre le V14 et le VGVAPG, ce qui est cohérent avec les données obtenues avec l'EBP. L'ensemble de ces résultats permet de montrer que le V14 est capable d'interagir avec le VGVAPG et que cette interaction serait stable au cours du temps. Il apparait également que fixer les extrémités du V14 semble améliorer cette interaction.

Nous avons ensuite réalisé une carte de contacts représentant l'interaction des résidus entre le V14, libre ou non, et le VGVAPG sur l'ensemble de la simulation de dynamique moléculaire (Figure 44). Cette étape permet d'identifier les zones d'interaction et les résidus impliqués. Ainsi, plus les résidus sont proches, plus la couleur tend vers le noir. Inversement, plus ils sont éloignés, elle tend vers le blanc. Le panel du haut représente l'interaction entre l'EBP et le VGVAPG. Ainsi, nous pouvons observer que le VGVAPG interagit avec quasiment la totalité des résidus du V14 de l'EBP. De plus, nous montrons que les résidus VGV du VGVAPG interagissent préférentiellement avec les résidus GSP et PL du V14, alors que les résidus VAPG interagissent préférentiellement avec les résidus QDEA. Ces données suggèrent que le VGVAPG s'enroule autour de la structure en fer à cheval du V14, comme représenté par le schéma dans la figure 44, panel du haut. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus dans la littérature (Blanchevoye et al., 2013; Moroy et al., 2009). On remarque également la présence assez fréquente de couleur gris foncé suggérant que les résidus sont proches, avec des distances entre 1 et 3 Å environ. Cela permet de conclure que cette interaction est stable et spécifique.

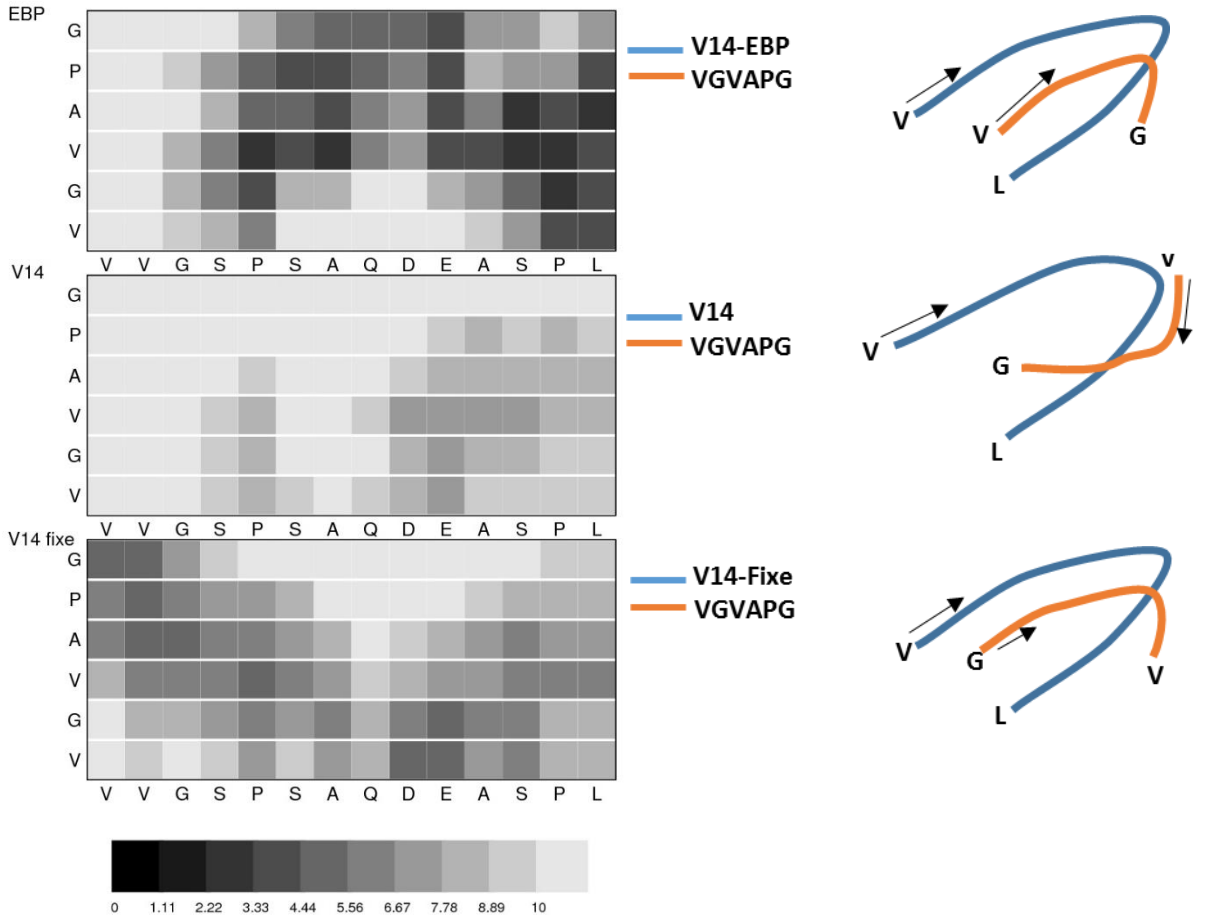


Figure 44. Carte de contacts représentant les distances entre les résidus du V14 et de VGVAPG. Après les 200ns de simulation de dynamique moléculaire, nous avons analysé les plus courtes distances moyennes obtenues au cours de la simulation entre les résidus du V14 et ceux du VGVAPG. Plus les résidus sont proches plus la couleur tend vers le noir et plus ils sont éloignés plus elle tend vers le blanc. Les cartes représentent ainsi l'évolution des distances entre les résidus des molécules EBP et VGVAPG (haut), V14 et VGVAPG (milieu) et V14 Fixe et VGVAPG (bas).

Dans le panel du milieu est représentée la carte de contacts entre le VGVAPG et V14 libre. Nous constatons que les couleurs sont globalement plus claires suggérant que les résidus sont moins proches, avec des distances comprises entre 5 et 8 Å environ. Les grandes fluctuations observées dans la Figure 43 pourraient être à l'origine de ces résultats. En effet, ici sont représentées les moyennes des plus petites distances entre deux résidus des deux molécules au cours des 200 ns de simulation. Toutefois, les résultats montrent une certaine proximité entre les résidus DEA du V14 et les résidus VGV du VGVAPG. De plus, nous savons que le peptide VGVAPG sur le V14 est retourné par rapport au VGVAPG docké sur l'EBP *via* les résultats obtenus en docking moléculaire, suggérant la conformation schématisée dans la Figure 44 (panel du milieu). Il est important de noter que, malgré une distance plus importante entre les

résidus comparée au complexe VGVAPG-EBP, elle est tout de même propice à une interaction. Ces résultats montrent que l'interaction entre le V14 et le VGVAPG est moins stable que celle avec l'EBP mais néanmoins possible. En effet, l'interaction du complexe V14-VGVAPG évolue plus que le complexe EBP-VGVAPG au cours du temps, mais la Figure 44 montre clairement que cette interaction perdure dans le temps.

Le panel inférieur de la Figure 44 représente la carte de contacts entre le V14 fixe et le VGVAPG. Les résultats montrent des interactions entre les résidus APG du VGVAPG et le début de la séquence du V14 soit VVGS. La séquence QDEA du V14 interagit plutôt avec la partie VGV du VGVAPG, tout comme le V14 libre. Par conséquent, la configuration représentée dans la Figure 44 panel inférieur pourrait être représentative de cette interaction. De plus, l'intensité des couleurs de la carte montre une certaine proximité des résidus favorable à une interaction, avec des distances comprises entre 3 et 6 Å environ. Ces résultats sont par ailleurs cohérents avec ceux obtenus précédemment.

L'ensemble de ces résultats montre qu'une interaction entre le V14 et le VGVAPG est possible et qu'elle peut être stabilisée par une interaction entre le QDEA du V14 et VGV du VGVAPG. Par ailleurs, nous avons observé des distances plus grandes dans l'étude du V14 et du V14 fixe. Ceci s'explique par les fluctuations de plus grande amplitude observées au cours de la simulation et un encombrement stérique moins important comparativement à l'EBP.

Ainsi ces premières analyses nous ont permis d'identifier une interaction entre le V14 et le VGVAPG, impliquant entre autre la séquence QDEA. Ces résultats sont par ailleurs cohérents avec ceux obtenus avec l'EBP ou le V14-Fixe permettant ainsi de prédire une interaction quasiment équivalente.

La formation de structures secondaires au cours de la dynamique moléculaire peut être un autre élément indicateur de la stabilité de nos systèmes. Nous avons donc évalué la formation de ces structures au cours des 200 ns de simulation en utilisant l'algorithme DSSP (Kabsch and Sander, 1983).

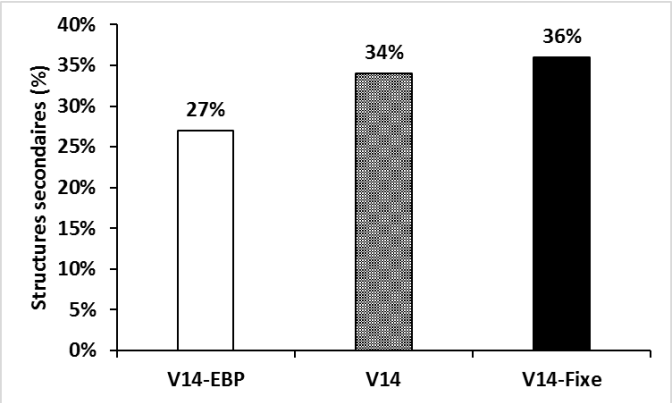


Figure 45. Pourcentage de structures secondaires formées entre V14 et VGVAPG. Après les 200 ns de simulation de dynamique moléculaire, nous avons analysé la formation de structures secondaires (structures en coude avec et sans liaisons hydrogènes, en feuillet β, en pont β et en désordre) au cours de la simulation en utilisant l'algorithme DSSP. L'histogramme représente la moyenne des structures secondaires formées au cours du temps en fonction du complexe étudié.

Comme le montre la Figure 45, le pourcentage de structures secondaires est plus important au cours de la simulation avec le V14 et le V14-Fixe comparativement à l'EBP. Ces résultats suggèrent ainsi que malgré la présence de fluctuation, l'interaction entre le V14 et le VGVAPG pourrait être stabilisée par la formation de structures secondaires comparativement à l'EBP. Dans le but de confirmer ces observations, nous avons analysé les différentes structures secondaires formées aux cours de chaque simulation pouvant stabiliser les complexes étudiés.

Au cours de la simulation du complexe EBP-VGVAPG, nous observons la formation de structures secondaires en coude avec et sans liaisons hydrogène ainsi que la formation de structures en pont β (Figure 46). Comparativement à l'EBP, nous observons une augmentation de la formation des structures secondaires pour le complexe V14-EBP, des structures en coudes avec et sans liaisons hydrogènes, des ponts et des feuillets β. Similairement au V14, le V14-fixe implique les mêmes types de structures secondaires, néanmoins nous retrouvons plus de feuillet β, ce qui est cohérent avec les résultats de la Figure 43 montrant une plus grande proximité des deux molécules au cours de la simulation. Ces résultats confirment la formation d'un plus grand nombre de structures secondaires au cours de la simulation V14 et V14 Fixe-VGVAPG comparativement à l'EBP, impliquant, entre autre, des structures stables telles que les feuillets β.

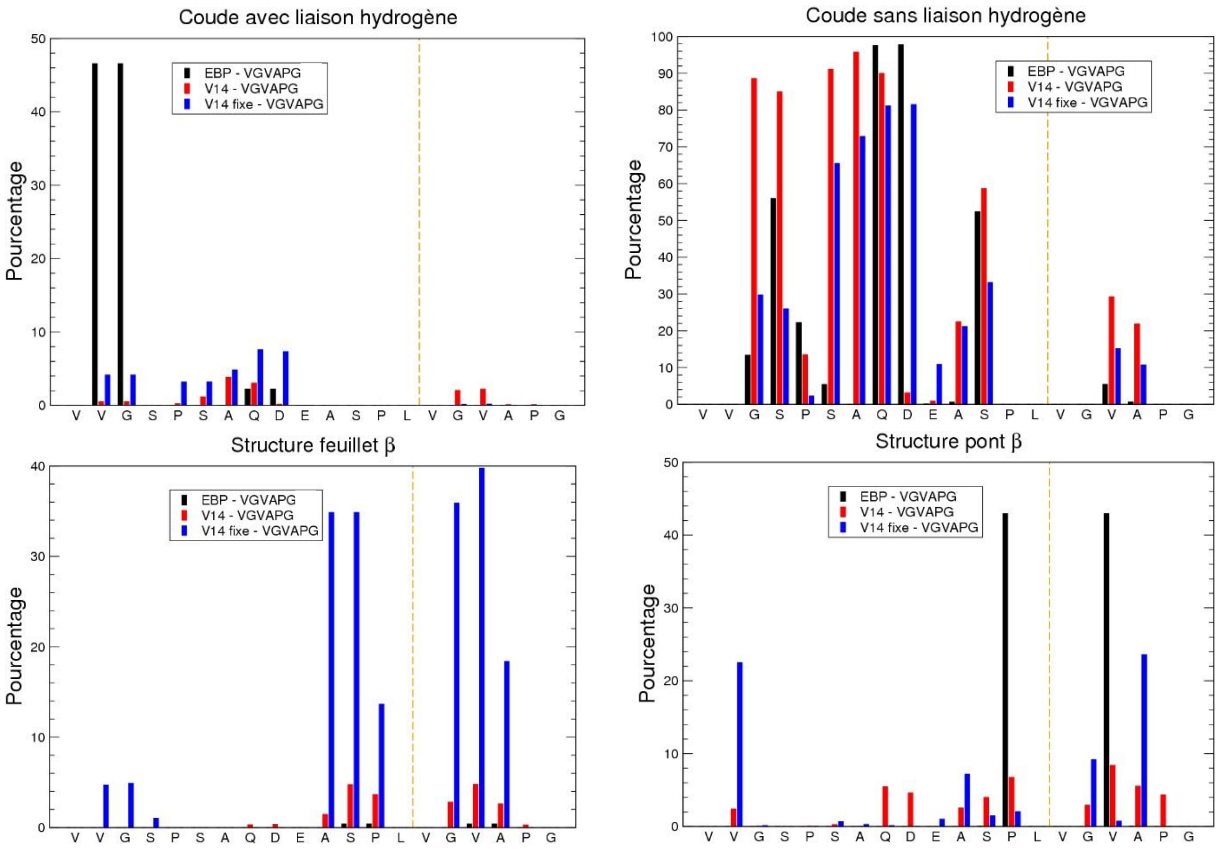


Figure 46. Structures secondaires formées entre V14 et VGVAPG. Après les 200 ns de simulation de dynamique moléculaire, nous avons analysé la formation de structures secondaires au cours de la simulation en utilisant l'algorithme DSSP. L'histogramme représente la quantité de structures secondaires formées au cours du temps en fonction du complexe étudié pour une structure secondaire donnée : coude avec liaison hydrogène, coude sans liaison hydrogène, pont β et feuillet β.

La Figure 47 représente l'évolution des structures secondaires au cours du temps dans les différents complexes moléculaires étudiés. Nous observons que malgré la stabilité de l'interaction EBP-VGVAPG, celle-ci est peu stabilisée par des structures secondaires comparativement aux résultats obtenus avec le V14 libre ou fixé. Ainsi l'ensemble de ces travaux permettent de démontrer que le V14 malgré la présence de fluctuations au cours de la simulation, due à l'absence d'encombrement stérique, montre une interaction potentielle avec le VGVAPG faisant intervenir les résidus QDEA connus comme essentiels à l'interaction des peptides d'élastine à l'EBP. De plus, nous montrons la formation de structures secondaires pouvant stabiliser l'interaction au cours du temps. L'ensemble de ces données propose pour la première fois une explication potentielle dans l'interaction du V14 avec le peptide d'élastine VGVAPG démontrant que celui-ci est potentiellement un bon antagoniste de la liaison des peptides d'élastine avec l'EBP, comme il l'a déjà été démontré dans d'autres études *in vitro* (Robinet et al., 2007).

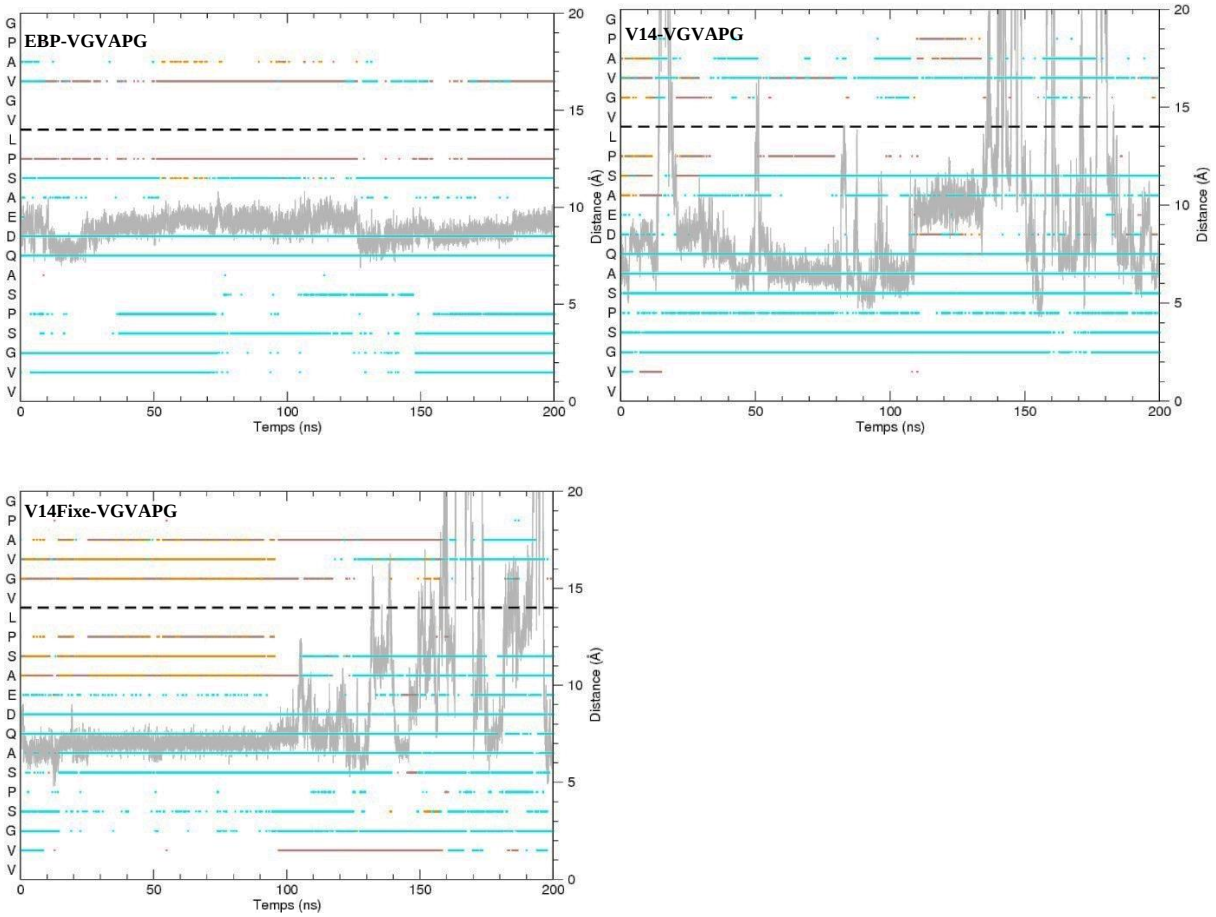


Figure 47. Représentation des structures secondaires entre V14 et VGVAPG corrélées à la distance entre ces deux molécules au cours du temps. Après les 200 ns de simulation de dynamique moléculaire, nous avons analysé la formation de structures secondaires au cours de la simulation en utilisant l'algorithme DSSP. Les résultats ont été superposés à l'évolution de la distance entre QDEA du V14 et GV du VGVAPG. La courbe représente les structures secondaires formées corrélées à l'évolution des distances entres les deux molécules au cours du temps en fonction du complexe étudié. Les structures secondaires représentent : cyan: coude sans liaison hydrogène, gris: coude avec liaison hydrogène et orange: pont et feuillet β.

2. Effet du V14 seul ou combiné au Dana sur l'invasion du mélanome *in vitro*.

Les résultats précédents montrent que le V14 est capable d'interagir avec le VGVAPG supposant ainsi qu'il pourrait antagoniser la liaison des peptides d'élastine à l'EBP en jouant le rôle de récepteur soluble. Le V14 est capable de bloquer les effets des peptides d'élastine *in vitro* au ratio molaire 2:1, soit 2 moles de V14 pour 1 mole de peptides d'élastine (Robinet et al., 2007; Toupance et al., 2012). Nous proposons d'évaluer l'efficacité de ce dernier pour bloquer la croissance tumorale du mélanome induite par les peptides d'élastine. Dans le but de montrer un potentiel effet synergique ou additif, nous avons également évalué l'impact de la double inhibition de Neu-1 et de l'EBP sur la croissance du mélanome *in vitro*.

Pour cela, les cellules de mélanome B16F1 sont prétraitées avec du V14 seul au ratio molaire 2:1 ou combiné avec du Dana en présence ou non de peptides d'élastine puis la prolifération est analysée (Figure 48).

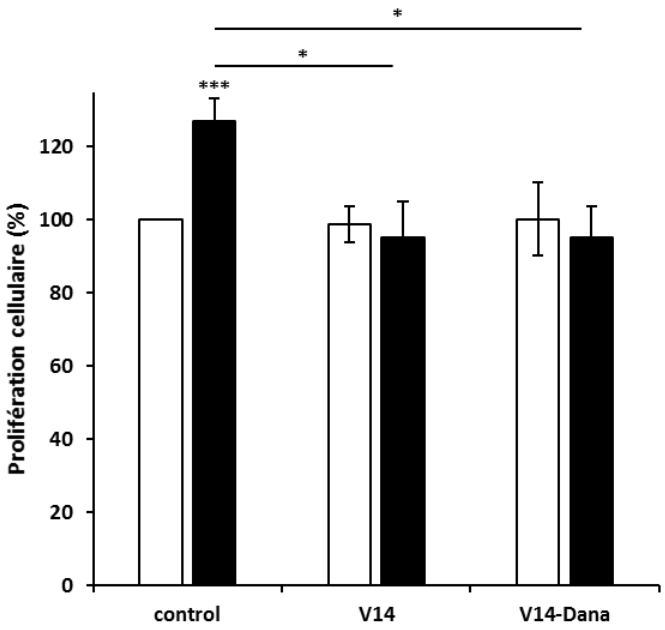


Figure 48. Inhibition de la prolifération induite par les peptides d'élastine par le V14 seul ou combiné au Dana. La prolifération des cellules de B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non d'un prétraitement au V14 (1,3 µM) avec ou sans Dana (400 µM) a été analysée par comptage au Bleu Trypan après 48 h de stimulation à 37°C. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Les résultats montrent une augmentation significative de la prolifération des cellules B16F1 en présence de peptides d'élastine. Par ailleurs, nous observons que le V14 seul ou combiné au Dana est capable de bloquer cette augmentation de manière significative. Cependant, nous n'observons pas d'effet synergique ou additif au cours de la co-inhibition, démontrant que le blocage de liaison EDPs/EBP est suffisant, phénomène tout à fait logique compte tenu du rôle primaire que joue l'EBP, responsable de l'activation de Neu-1.

La croissance tumorale s'accompagne d'une invasion tumorale impliquant des processus de migration cellulaire et de sécrétion de protéases. Afin d'évaluer l'impact du V14 seul ou combiné au Dana sur l'invasion du mélanome *in vitro*, nous avons analysé leurs effets sur la migration cellulaire et l'expression de la MMP-1 dans les cellules B16F1 stimulées avec des peptides d'élastine. Pour ce faire, la migration cellulaire est analysée par la méthode de blessure cicatricielle, et l'expression de la MMP-1, démontrée pour être sur-régulée par les peptides d'élastine dans le mélanome B16F1 (Devy et al., 2010), est analysée par Western Blot (Figure 49).

Les résultats de la Figure 49 montrent une augmentation significative des capacités migratoires des cellules B16F1 en présence de peptides d'élastine. Celle-ci peut être totalement inhibée par l'ajout de V14 seul ou combiné au Dana (Figure 49A). Ces résultats démontrent que le V14 est capable de bloque la liaison des peptides d'élastine à l'EBP et antagonise leurs effets sur la migration cellulaire *in vitro*. Similairement à la croissance tumorale *in vitro*¸ le co-traitement V14 et Dana donne des résultats identiques au V14 seul ou au Dana seul. Des résultats semblables sont obtenus sur l'étude de l'expression de la MMP-1 en présence des différents traitements (Figure 49B). En effet, nous observons une augmentation significative de l'expression de la MMP-1 en présence de peptides d'élastine. Cette dernière est significativement diminuée par un prétraitment au V14 seul ou combiné au Dana. Ces résultats montrent que le V14 seul ou combiné au Dana est capable de réduire la progression tumorale induite par les peptides d'élastine *in vitro*.

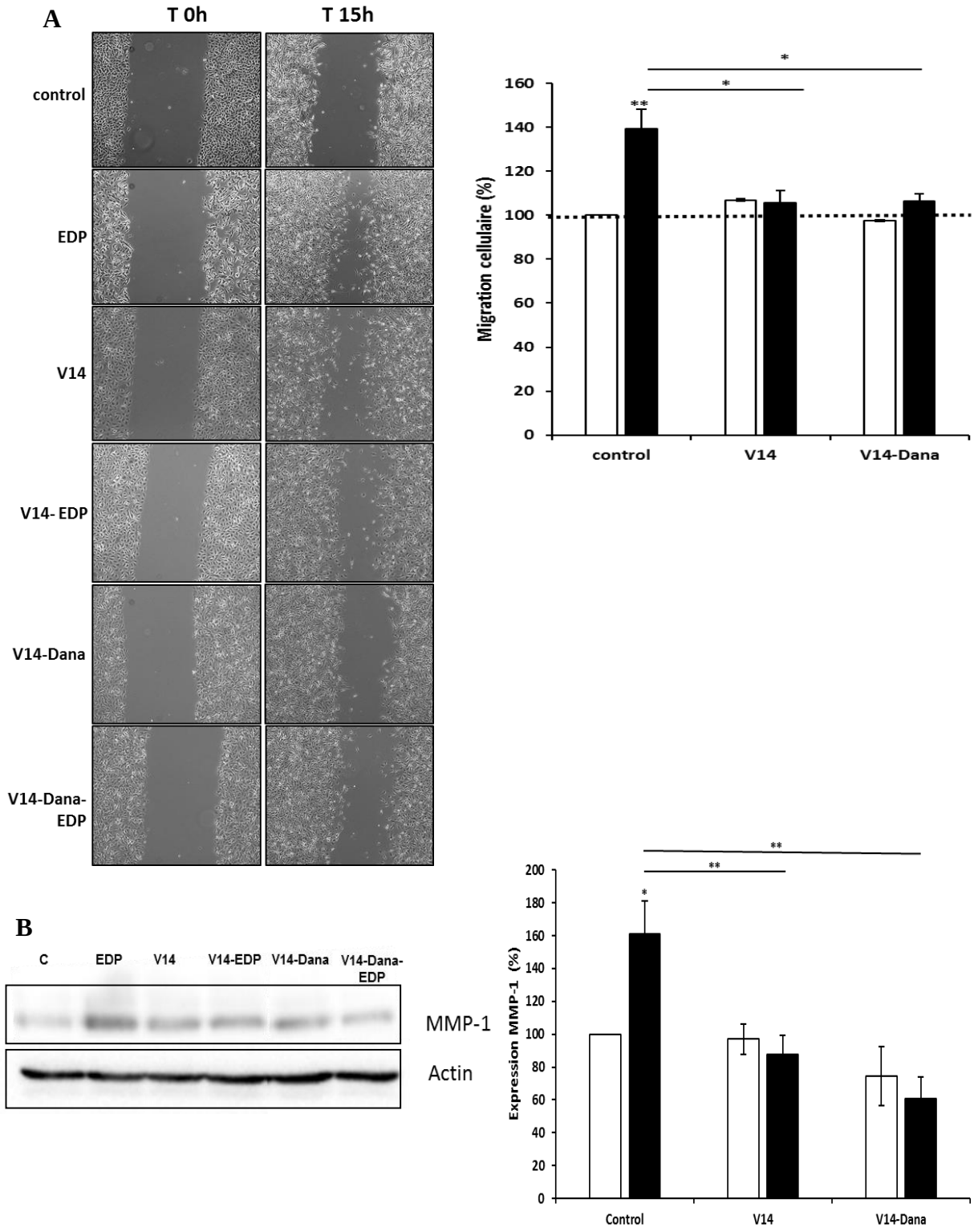


Figure 49. Le V14 seul ou combiné au Dana inhibe la migration et l'expression de la MMP-1 induites par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1. **A.** Les capacités migratoires des cellules B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de V14 (1,3 µM) avec ou sans Dana (400 µM) ont été évaluées par la méthode de blessure cicatricielle. Des photographies ont été réalisées à T0h, T15h et la distance parcourue a été mesurée. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3). **B.** L'expression de la MMP-1 dans des cellules B16F1 traitées ou non avec des EDP (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de V14 (1,3 µM) avec ou sans Dana (400 µM) a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps anti-MMP-1 et révélée par chimiluminescence. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

L'ensemble de ces processus cellulaires sont régulés par différentes voies de signalisation impliquant notamment la voie des MAPK, et plus précisément ERK1/2. Afin de confirmer que l'inhibition des processus cellulaires précédemment étudiés est due à une diminution de la transduction du signal médiée par les peptides d'élastine, nous avons étudié le niveau de phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules B16F1 en présence des différents traitements (Figure 50).

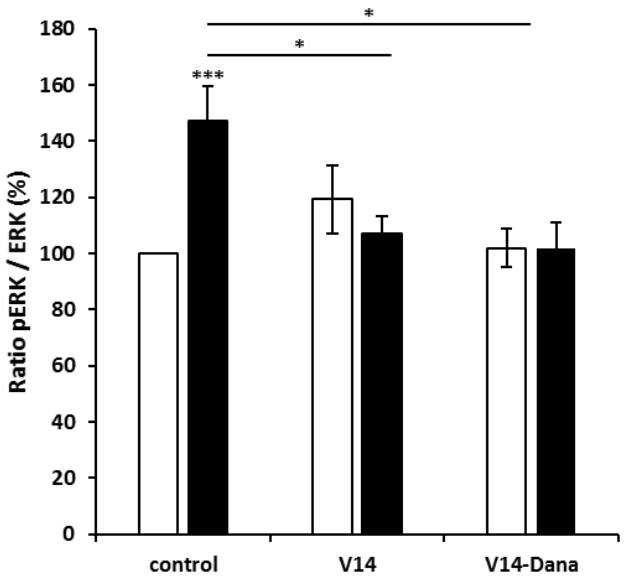


Figure 50. Le V14 seul ou combiné au Dana réduit l'activation d'ERK1/2 médiée par les peptides d'élastine dans les cellules B16F1. Le niveau d'activation de ERK1/2 a été analysé dans des cellules B16F1 traitées ou non aux peptides d'élastine (EDP) (50 µg/ml) en présence ou non de V14 (1,3 µM) avec ou sans Dana (400 µM) par Western blot en utilisant les anticorps anti-phospho-ERK1/2 et anti-ERK1/2 total. Le ratio phospho-ERK1/2/ERK1/2 traduit le niveau d'activation d'ERK1/2. L'histogramme représente le ratio phospho-ERK1/2 /ERK1/2 total représentatif des différentes expériences réalisées (n=3). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

La Figure 50 montre une augmentation significative du niveau de phosphorylation de ERK1/2 en présence de peptides d'élastine, ce qui corrobore les résultats précédemment obtenus et ceux que nous avons préalablement décrit (Duca et al., 2002). De plus, le V14 seul ou combiné au Dana réduit significativement les effets des peptides d'élastine sur la phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules B16F1.

L'ensemble de ces résultats montre que le V14 est capable d'antagoniser les effets des peptides d'élastine en bloquant leurs liaisons à l'EBP sur l'invasion du mélanome *in vitro*. Par ailleurs, nous pouvons conclure que le V14 bloque la transduction du signal médiée par le CRE et les processus cellulaires induits par les peptides d'élastine tels que la prolifération, la migration cellulaire ou encore la sécrétion de protéases comme la MMP-1. De plus, une co-inhibition ne semble pas induire d'effet synergique ou additif. Les sous-unités EBP et Neu-1

jouent donc toutes deux un rôle clé dans la transduction du signal médiée par les peptides d'élastine, ce qui est cohérent avec les données précédemment obtenus par notre équipe (Duca et al., 2007; Rusciani et al., 2010). Ainsi, cibler la sous-unité EBP seule ou cibler à la fois EBP et Neu-1 semblent être de bonnes stratégies pour lutter contre les effets des peptides d'élastine dans le cadre du développement du mélanome, bien que le blocage de l'EBP semble suffire, la combinaison des deux approches ne présentant pas de plus value.

3. Impact de l'antagoniste V14 seul ou combiné au Dana sur le développement tumoral du mélanome *in vivo.*

Nous avons démontré ci-dessus que les ciblages thérapeutiques de la sous-unité EBP seule ou combinée à celle de Neu-1 pourraient être des stratégies efficaces sur le développement du mélanome induit par les peptides d'élastine *in vitro*. Dans le but de valider ces stratégies, nous avons évalué leurs impacts sur le développement tumoral *in vivo* dans un modèle d'allogreffe de cellules B16F1 dans des souris syngéniques C57Bl6. Le développement tumoral s'est effectué sur 14 jours avec des rappels des différents traitements tous les 3 jours en péri-tumoral.

Les tumeurs deviennent visibles après 6 jours de développement tumoral et sont mesurables au 9ème jour. La figure 51 montre une augmentation significative du volume tumoral dans les tumeurs traitées aux peptides d'élastine dès le 9ème jour de développement tumoral et jusqu'au 14ème jour. Cette augmentation est significativement réduite par le V14 seul ou combiné au Dana signifiant que ces traitements sont capables de contrecarrer les effets des peptides d'élastine sur le développement du mélanome *in vivo.*

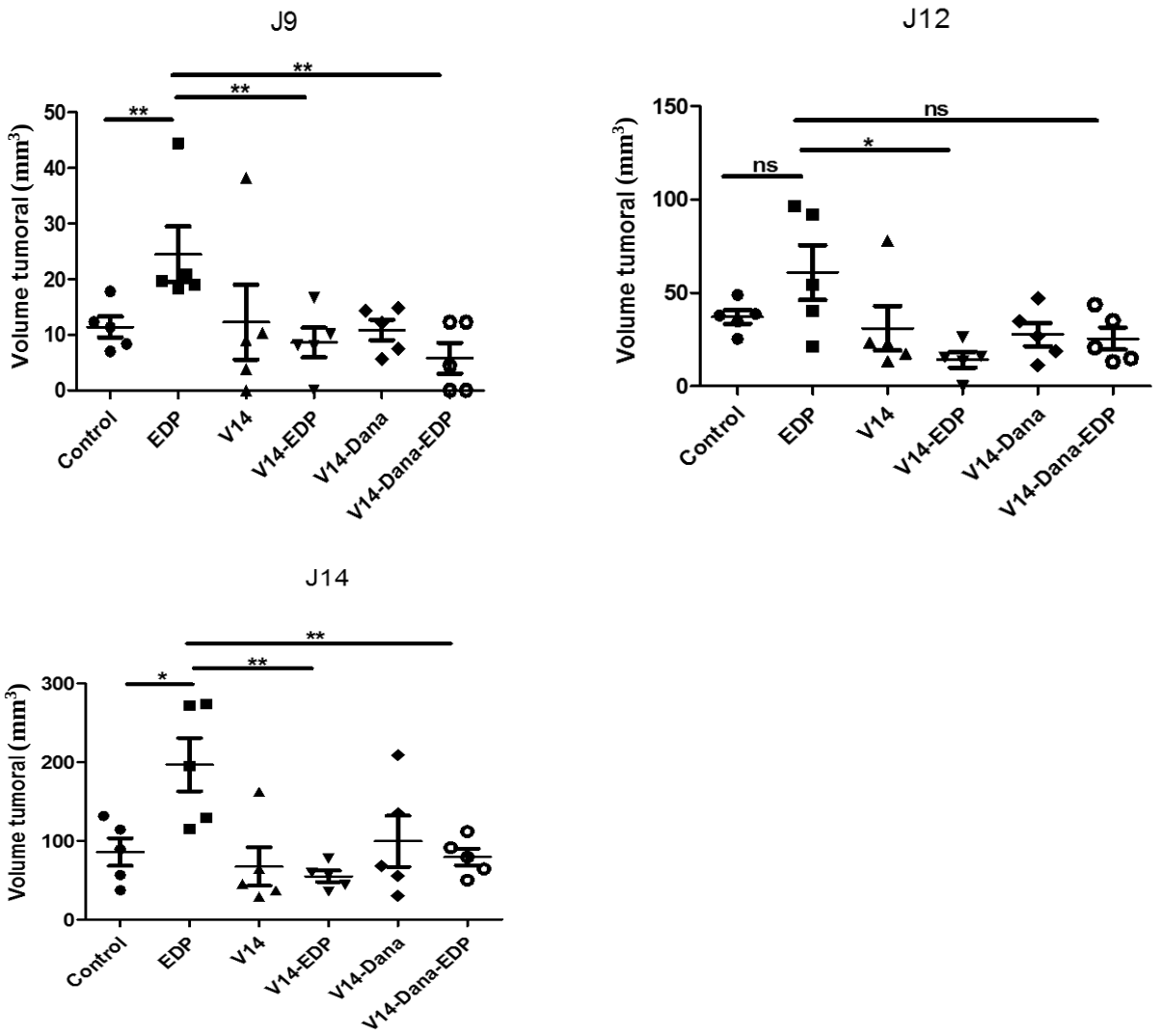


Figure 51. Le V14 seul ou combiné au Dana réduit la croissance tumorale médiée par les peptides d'élastine *in vivo*. **A-C.** Les cellules de mélanome B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de V14 (91 µg/kg) avec ou sans Dana (400 µM) ont été injectées en sous-cutané dans des souris syngéniques C57Bl6, à raison de 2,5 x 10^5 cellules par souris. Les souris ont été ensuite retraitées tous les 3 jours à raison de 5 mg/kg de EDP et/ou V14 (91 µg/kg) avec ou sans Dana (0,625 mg/kg) en péri-tumoral. Les souris ont été mises à mort après 14 jours de développement tumoral. La taille des tumeurs a été mesurée au pied à coulisse, et l'analyse statistique a été réalisée le test de Mann Whitney. Les données représentent la moyenne sur 5 souris par condition. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Nous avons ensuite réalisé une analyse immunohistochimique des tumeurs afin de mieux caractériser les différents traitements sur la progression du mélanome *in vivo* médiée par les peptides d'élastine. En effet, nous avons précédemment montré que les peptides d'élastine sont capables de moduler *in vitro* un grand nombre de processus cellulaires et moléculaires incluant la prolifération, l'angiogenèse et la sécrétion de protéases. Nous avons donc étudié ces différents paramètres en utilisant des marqueurs spécifiques pour évaluer l'impact de nos traitements sur ces propriétés pro-tumorales des peptides d'élastine *in vivo* (Figure 52). Pour

cela, les marqueurs de prolifération Ki67, d'angiogenèse VEGF et l'expression de la MMP-1 ont été évalués par immunohistochimie dans les tumeurs.

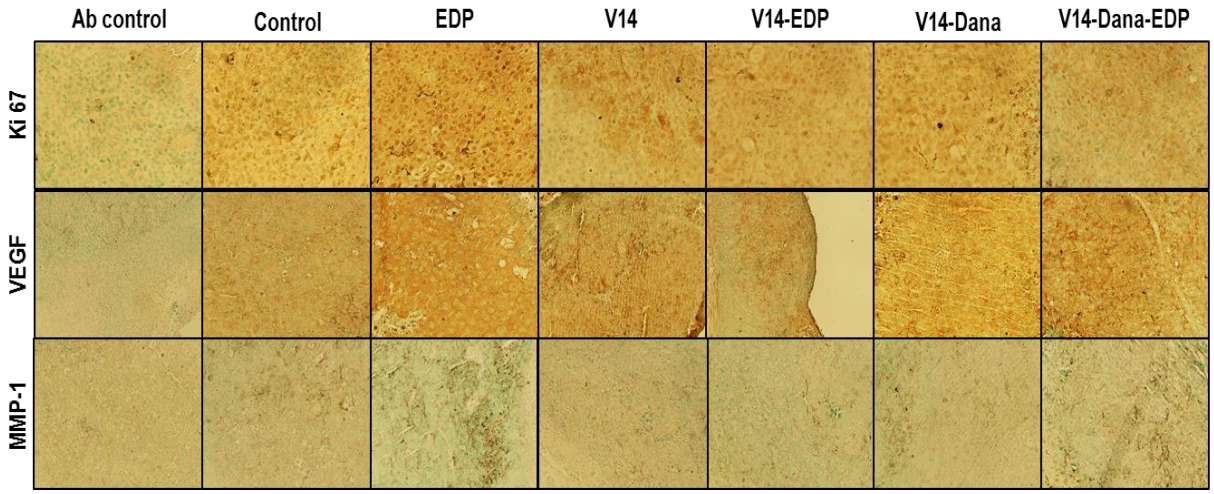


Figure 52. Analyse par immunohistochimie du Ki67, VEGF et de la MMP-1 dans les tumeurs issues des allogreffes de cellules B16F1 traitées au V14 seul ou combiné au Dana. Les expressions du Ki67, VEGF et MMP-1 dans les tumeurs traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (5 mg/kg) en présence ou non de V14 (91 µg/kg) avec ou sans Dana (0,625 mg/kg) sont analysées par immunohistochimie. Les coupes de tumeurs sont marquées avec les anticorps anti-Ki67, anti-VEGF et anti-MMP-1 qui apparaissent en une coloration brun/noir. Les coupes sont ensuite sur-colorées au vert de méthyle et observées au microscope optique à l'objectif ×20.

La Figure 52 montre une augmentation du marquage nucléaire Ki67 dans les tumeurs traitées aux peptides d'élastine comparativement aux tumeurs contrôles, confirmant ainsi les propriétés pro-prolifératives de ces derniers. Nous constatons également que le V14 seul ou combiné au Dana est capable de réduire l'expression nucléaire du Ki67, signifiant que ces traitements sont capables d'inhiber les effets pro-prolifératifs induits par les peptides d'élastine *in vivo.* Le marquage angiogénique VEGF est augmenté en présence de peptides d'élastine démontrant les capacités pro-angiogéniques de ces derniers. Le V14 seul réduit considérablement le marquage VEGF démontrant que le V14 est capable d'antagoniser les effets des peptides d'élastine sur l'angiogenèse *in vivo*. Nous observons dans les tumeurs traitées au V14 combiné au Dana une légère augmentation du marqueur VEGF, cohérent avec les résultats précédemment obtenus démontrant l'implication de l'activité sialidase dans la régulation de l'angiogenèse. Malgré cette augmentation du facteur pro-angiogénique dans les tumeurs traitées au V14 combiné au Dana, les volumes tumoraux montrent une diminution de la croissance tumorale comparée aux tumeurs traitées aux peptides d'élastine (Figure 51). La surexpression de la MMP-1 corrélée aux propriétés pro-tumorales des peptides d'élastine dans l'invasion du mélanome B16F1 *in vivo* est confirmée ici par immunohistochimie. Nous

montrons également que le V14 seul ou combiné au Dana est capable de réduire le marquage MMP-1 induit par les peptides d'élastine, ce qui corrobore les résultats obtenus *in vitro.*

L'ensemble de ces résultats démontrent que le ciblage thérapeutique basé sur l'inhibition de la liaison des peptides d'élastine à l'EBP par le V14 seul, ou combiné à l'inhibition de l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 peut moduler l'invasion du mélanome médié par les peptides d'élastine *in vivo.* Ainsi le ciblage thérapeutique du CRE offre de nouvelles perspectives innovantes et intéressantes pour le développement de nouveaux traitements.

4. Influence de l'inhibition de l'EBP combiné ou non à l'inhibition de la sous-unité Neu-1 sur l'angiogenèse

L'angiogenèse est un évènement clé dans la progression tumorale (Folkman and Hanahan, 1991) et les résultats ci-dessus décrivent le fait que le V14 est capable d'inhiber les effets des EDPs sur ce processus. Nous avons été plus loin et avons caractérisé l'influence du V14 seul ou combiné au Dana sur l'angiogenèse médiée par les peptides d'élastine *in vitro* (Figure 53) et *ex vivo* (Figure 54).

Nous avons tout d'abord évalué la capacité des cellules endothéliales à former des pseudotubes sur Matrigel *in vitro*. Les résultats de la Figure 53 montrent une augmentation de la formation de pseudotubes dans les cellules traitées avec des peptides d'élastine. Ces peptides induisent une augmentation significative du nombre de nœuds, du nombre de mailles ainsi que de la longueur du réseau tel que nous l'avons déjà démontré. Nous montrons également que le V14 est capable de réduire les effets des peptides d'élastine impliquant essentiellement une diminution significative du nombre de mailles et de la longueur du réseau alors que le nombre de nœuds semble être diminué. Cependant, cette dernière observation n'est pas significative (Figure 53). Une co-inhibition des deux sous-unités EBP et Neu-1 en l'absence de peptides d'élastine semble être capable d'augmenter significativement la longueur du réseau de pseudotubes sur Matrigel. Ces propriétés sont essentiellement dues à l'inhibition de l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1, capable de moduler l'angiogenèse, tel que nous l'avons précédemment montré dans ce manuscrit. Cependant, le V14 combiné au Dana semble inhiber les effets des peptides d'élastine sur le nombre de nœuds et le nombre de mailles, signifiant que le Dana pourrait moduler exclusivement la croissance des cellules endothéliales et non la ramification du réseau.

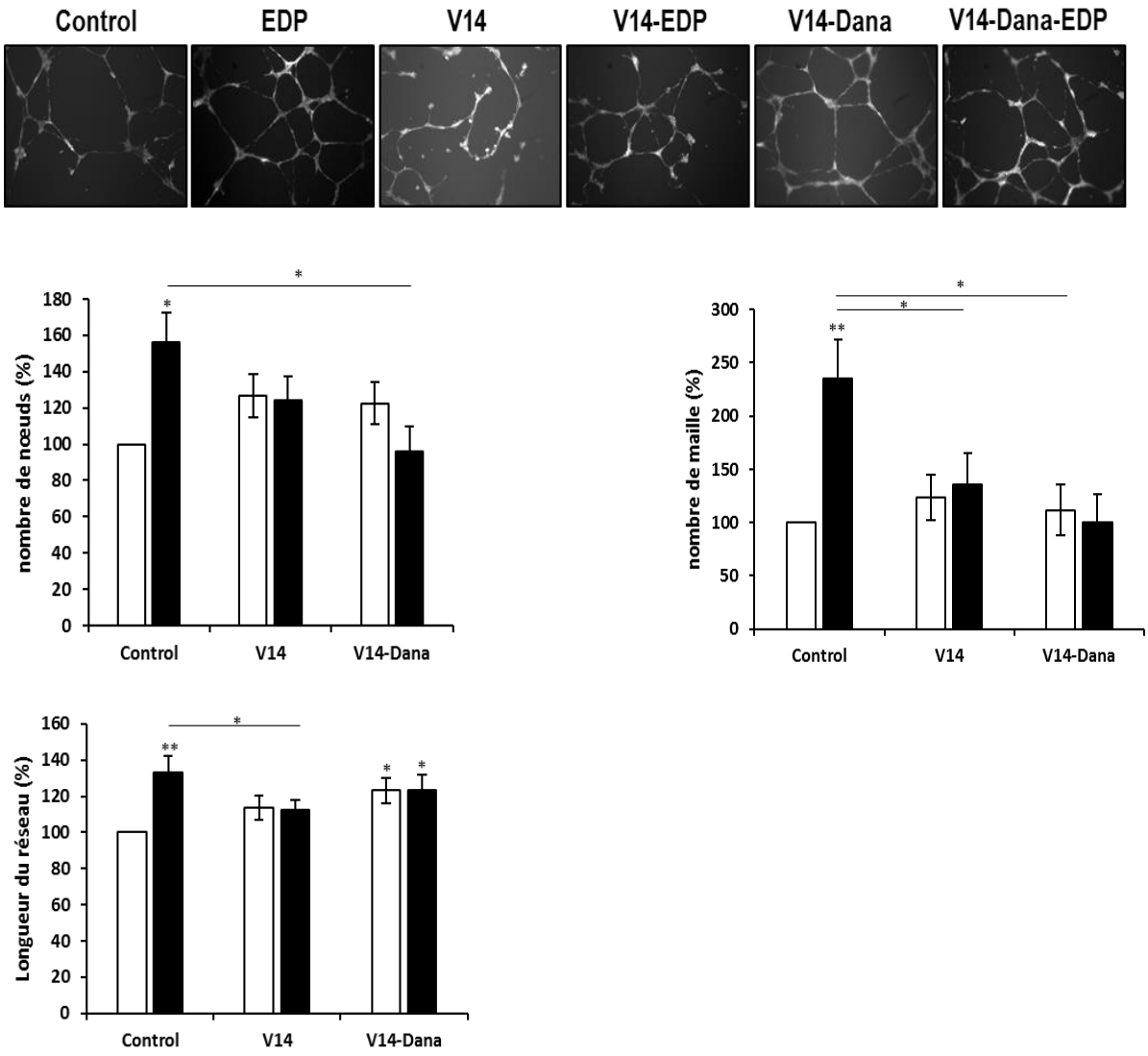


Figure 53. Effet du V14 seul ou combiné au Dana sur l'angiogenèse *in vitro*. **A.** La formation de pseudotubes sur Matrigel a été réalisée en présence de cellules traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) et/ou en présence de V14 (1,3 µM) seul ou combiné au Dana (400 µM) dans du milieu complet. La tubulogenèse s'est effectuée à 37°C entre 8h et 24h d'incubation. **B.** Les pseudotubes ont ensuite été analysés par Image J avec la macro angiogenesis analyzer permettant de quantifier le nombre de nœuds, de mailles et la longueur du réseau. Les histogrammes sont représentatifs de l'ensemble des résultats obtenus (n=3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons analysé ces différents traitements dans un modèle d'angiogenèse *ex vivo* utilisant la méthode des anneaux aortiques (Figure 54). Nos résultats confirment les propriétés pro-angiogéniques des peptides d'élastine et montrent que le V14 seul est capable d'inhiber ces effets *ex vivo*. Cependant, lorsque le V14 est combiné au Dana cette diminution n'est pas significative. En effet, le traitement V14 combiné au Dana en l'absence de peptides d'élastine est capable de moduler la néo-angiogenèse *ex vivo*. Comme précédemment décrit, ces observations sont essentiellement dues à l'effet du Dana sur l'angiogenèse.

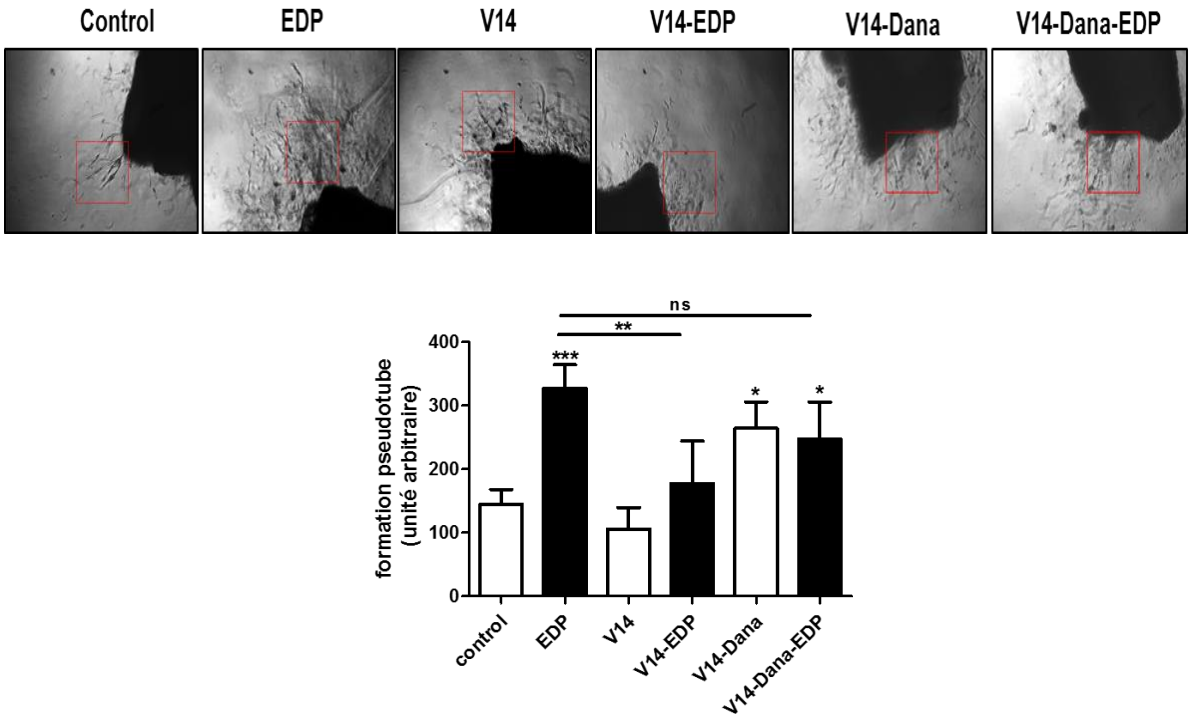


Figure 54. Impact du V14 seul ou combiné au Dana sur l'angiogenèse *ex vivo*. Les aortes thoraciques ont été obtenues à partir de souris C57Bl6 de 8 semaines. Une fois dégraissées, des anneaux homogènes d'environ 1 mm de long ont été réalisés. Les anneaux aortiques sont ensuite placés entre deux couches de matrigel. Les anneaux aortiques sont ensuite traités ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) et/ou avec de V14 (1,3 µM) seul ou combiné au Dana 400 µM pendant 14 jours à raison d'un changement de milieu tous les 3 jours. Des photographies sont réalisées au microscope inversé à l'objectif ×10. L'étalement des pseudotubes est mesuré par le logiciel Image J et l'histogramme représente l'ensemble des résultats obtenus (n=12). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Cette étude a permis de démontrer que le V14 est capable de moduler les effets des peptides d'élastine dans la progression du mélanome *in vitro* et *ex vivo.* De plus, un co-traitement V14-Dana semble être efficace pour réduire la progression du mélanome, malgré une légère potentialisation de l'angiogenèse, sans effet synergique ou additif. Il est important de noter que dans ces conditions l'angiogenèse ne semble pas être favorable à la tumeur. Nous démontrons ainsi que le CRE, que ce soit au travers de l'EBP ou de la sous-unité Neu-1, peut être une cible thérapeutique intéressante et efficace pour lutter contre les effets des EDPs sur le développement tumoral.

Seconde partie :
Impact de l'âge sur les effets pro-tumoraux des EDPs

A. Vieillissement et ciblage thérapeutique du CRE

Nous avons précédemment démontré que le ciblage thérapeutique du CRE dans le développement tumoral du mélanome semble efficace tant *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, en inhibant la sous-unité Neu-1, responsable de la transduction du signal *via* son activité sialidase, nous réduisons significativement les effets pro-tumoraux des peptides d'élastine dans le développement du mélanome *in vitro* et également *in vivo.* De plus, des résultats similaires ont été obtenus en bloquant la sous-unité EBP en utilisant le peptide synthétique V14, qui joue ici le rôle de récepteur soluble, mais également en ciblant les deux sous-unités Neu-1 et EBP du CRE. Ces résultats montrent pour la première fois que le ciblage thérapeutique du CRE visant à bloquer l'action des EDPs dans le cadre du mélanome peut être une stratégie efficace. Cependant, le mélanome est un cancer dont l'un des facteurs de risque principal est le vieillissement (van der Meijden et al., 2010; Syrigos et al., 2005). Un stroma tumoral âgé présente des caractéristiques potentiellement différentes de celles d'un stroma jeune et peut théoriquement influencer la progression tumorale. De plus, bien que les EDPs soient capables de stimuler directement les cellules de mélanomes, ils sont aussi capables de stimuler des effets pro-tumoraux chez les fibroblastes et les cellules endothéliales (Duca et al., 2004 ; Fahem et al., 2008), dénotant leur rôle important dans la réaction stromale. Enfin, il est parfaitement connu que le stroma joue un rôle crucial dans le développement du mélanome (Hornebeck et al., 2005; Labrousse et al., 2004; Ruiter and Herlyn, 2003).

Il est donc essentiel d'étudier l'impact de l'âge et plus particulièrement d'un stroma âgé sur l'influence des EDPs dans le développement tumoral. Nous nous sommes ainsi proposé dans un premier temps d'évaluer l'impact d'un stroma âgé sur le développement du mélanome puis d'analyser l'influence des différentes stratégies thérapeutiques développées dans cette étude en utilisant des modèles de vieillissement *in vitro* et *in vivo.*

1. Impact de l'âge sur le développement du mélanome stimulé par les EDPs et sur le ciblage thérapeutique du CRE *in vivo*

Afin d'étudier l'influence du stroma âgé sur le développement du mélanome stimulé par les EDPs, nous avons utilisé des souris âgées de 20 mois, Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'allogreffes de cellules de mélanome B16F1 dans des souris syngéniques C57Bl6, puis le développement tumoral a été suivi pendant 14 jours avec des rappels des différents traitements tous les 3 jours en péritumoral (Figure 55). Les tumeurs ont commencé à être

visibles après le 6ème jour de développement tumoral, et elles deviennent mesurables à partir du 9ème jour.

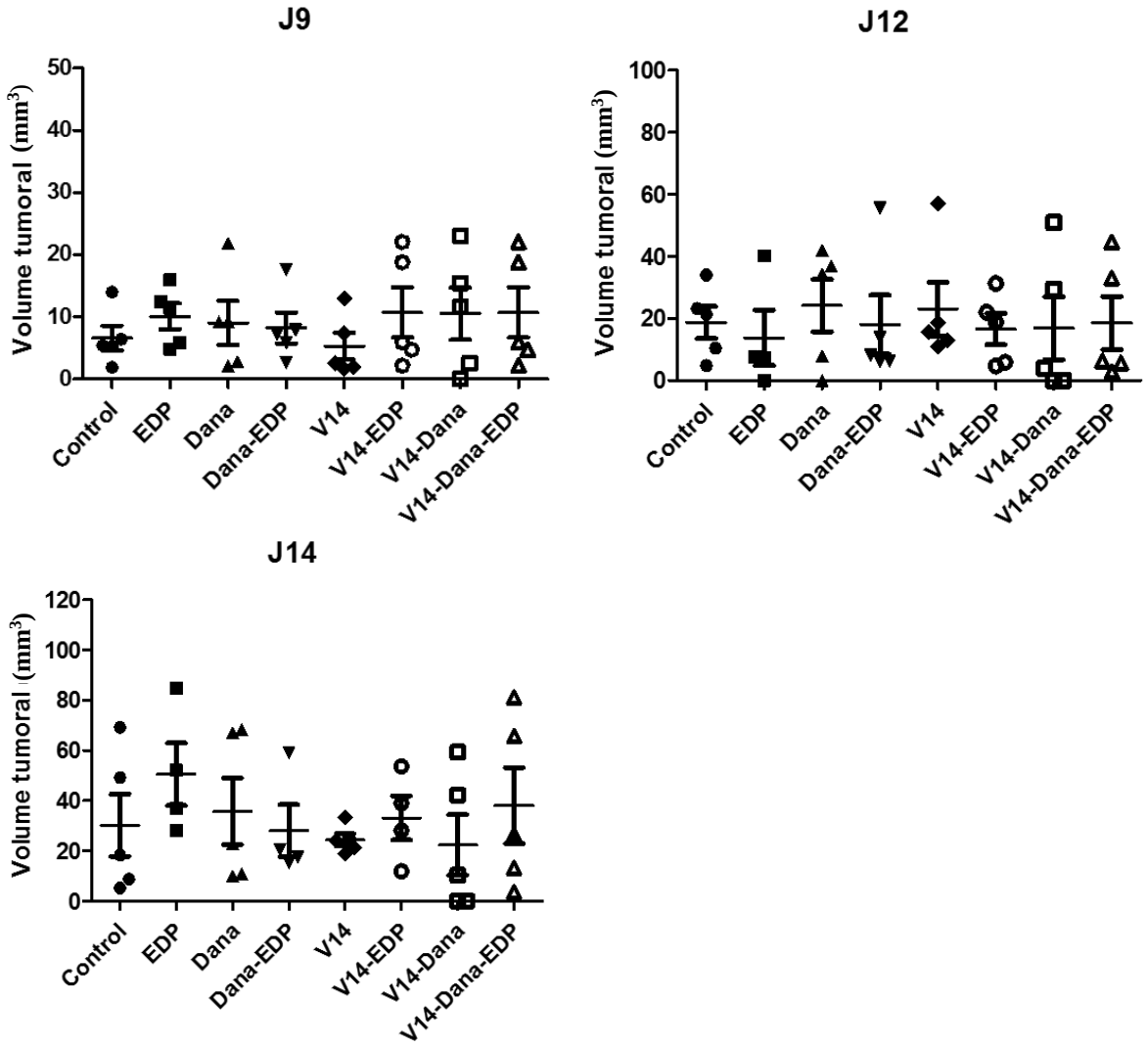


Figure 55. Effet du Dana, du V14 seul ou de la combinaison des deux sur la croissance tumorale médiée par les peptides d'élastine *in vivo*. Les cellules de mélanome B16F1 traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de V14 (91 µg/kg) et/ou Dana (400 µM) ont été injectées en sous-cutané dans des souris syngéniques C57Bl6 âgées de 20 mois, à raison de 2.5 x 10^5 cellules par souris. Les souris ont été ensuite retraitées tous les 3 jours à raison de 5 mg/kg de EDP et/ou V14 (91 µg/kg) et/ou Dana (0,625 mg/kg) en péritumoral. Les souris ont été mises à mort après 14 jours de développement tumoral. La taille des tumeurs a été mesurée au pied à coulisse, et la significativité des mesures a été calculée par le test de Mann Whitney. Les données représentent la moyenne sur 5 souris par condition.

Les résultats de la Figure 55 montrent que les peptides d'élastine tendent à augmenter le volume tumoral des tumeurs traitées avec des peptides d'élastine à partir du 14ème jour de développement tumoral ; cependant, cette augmentation n'est pas significative. Nous n'observons aucune différence significative entre les tumeurs quelque soit le traitement appliqué, suggérant une perte d'activité des EDPs vis-à-vis d'un stroma âgé. De manière intéressante, en comparant les volumes tumoraux obtenus à partir de souris jeunes et âgées non traitées par des EDPs, nous pouvons également constater une croissance tumorale ralentie. En

effet, la Figure 56 montre une diminution des volumes tumoraux provenant des souris âgées comparativement aux souris jeunes (8 semaines) et ce dès le 9ème jour de développement tumoral. Cet écart devient significatif à partir du 12ème jour et au 14ème. Ces résultats suggèrent que le stroma tumoral âgé n'est plus capable de favoriser la progression du mélanome *in vivo*. Nous avons ensuite analysé les tumeurs par immunohistochimie afin de mieux caractériser l'impact de chaque traitement (Figure 57). Nous avons donc étudié l'expression du marqueur nucléaire de prolifération Ki67, du VEGF et de la MMP-1.

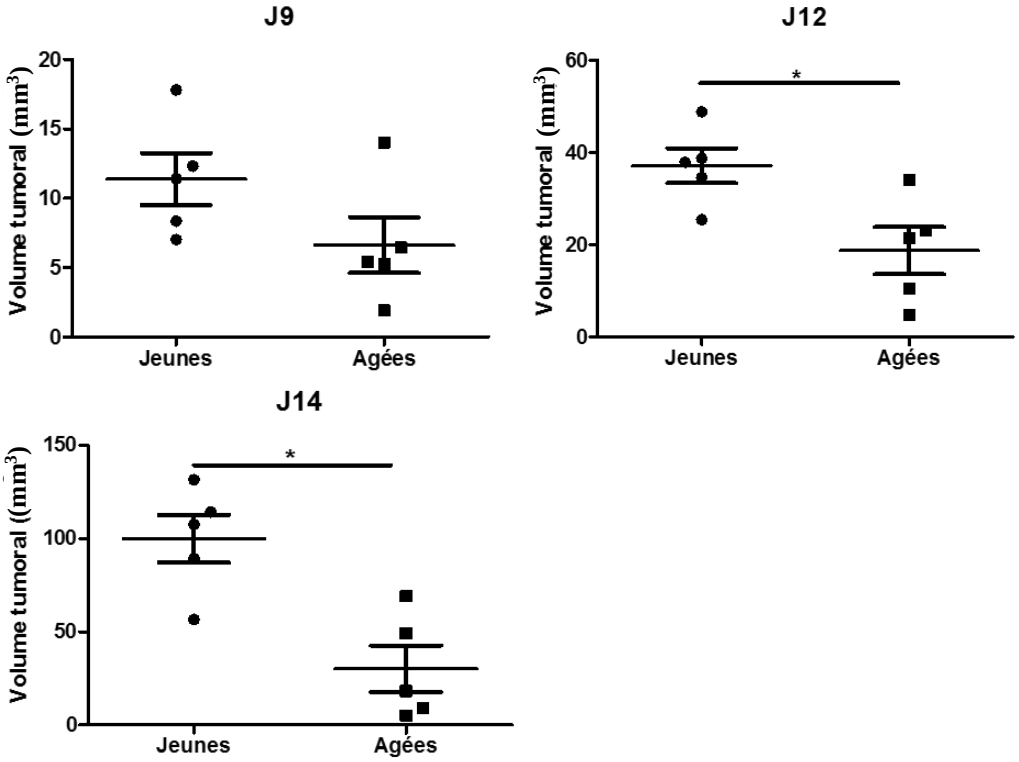


Figure 56. Modulation de la croissance tumorale en fonction de l'âge *in vivo*. Les cellules de mélanome B16F1 ont été injectées en sous-cutanée dans des souris syngéniques C57Bl6, à raison de 2.5 x 10^5 cellules par souris jeunes (8 semaines et âgées 20 mois). Les souris ont été mises à mort après 14 jours de développement tumoral. La taille des tumeurs a été mesurée au pied à coulisse, et la significativité des mesures a été calculée par le test de Mann Whitney. Les données représentent la moyenne sur 5 souris par condition. * $p < 0.05$.

La Figure 57 ne montre aucune différence dans l'expression du marqueur nucléaire Ki67 dans les tumeurs et ce, quelque soit le traitement appliqué. Ces résultats démontrent les faibles capacités prolifératives de ces tumeurs et sont en accord avec les résultats de la Figure 57, démontrant une diminution de la croissance tumorale avec l'âge. L'étude de l'expression du VEGF ne montre aucune différence entre les traitements, suggérant en conséquence la mise en place d'une angiogenèse moindre. Par ailleurs, nous observons une nette augmentation de l'expression de la MMP-1 dans l'ensemble des tumeurs et ce quelques soit le traitement. Cependant, aucune différence dépendante des traitements n'est observée.

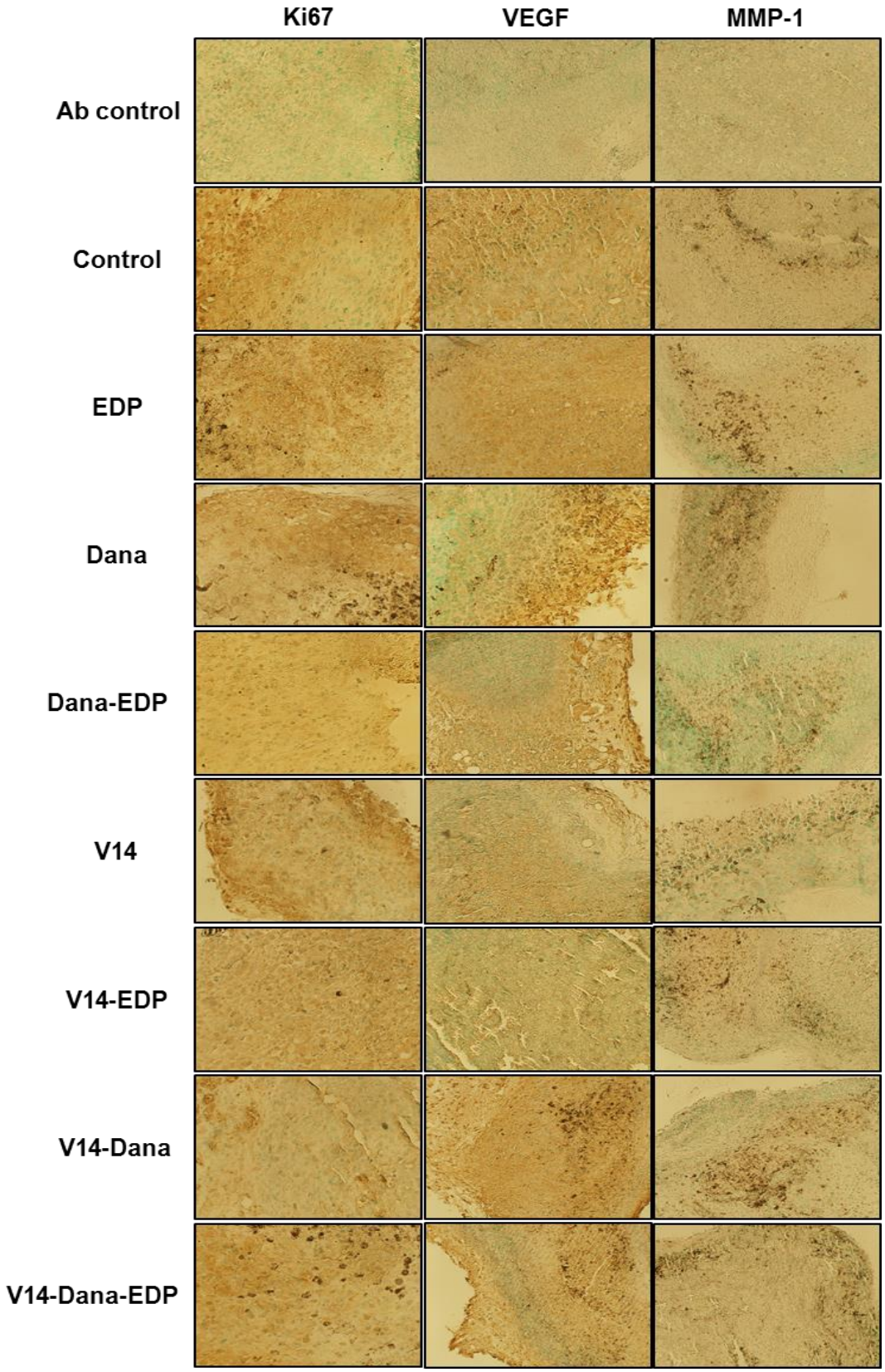


Figure 57. Analyse par immunohistochimie du Ki67, VEGF et de la MMP-1 dans les tumeurs issues des allogreffes sur souris âgées. Les expressions du Ki67, VEGF et MMP-1 dans les tumeurs traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 5 mg/kg) en présence ou non de V14 (91 µg/kg) et/ou Dana (0,625 mg/kg) sont analysées par immunohistochimie. Les coupes de tumeurs sont marquées avec les anticorps anti-Ki67, anti-VEGF et anti-MMP-1 qui apparaissent en une coloration brun/noir. Les coupes sont ensuite sur-colorées au vert de méthyle et observées au microscope optique à l'objectif ×20.

L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que le stroma âgé n'est plus capable de favoriser le développement tumoral du mélanome *in vivo* et que les peptides d'élastine sont incapables d'exercer leurs effets. Ces données suggérent également que bien que les EDP soient capables d'influer directement sur les cellules de mélanome (Partie I de ce manuscrit), ils semblent exercer principalement leurs effets pro-tumoraux *in vivo via* le stroma dans ce modèle d'étude. Nous avons donc décidé de pousser plus loin nos investigations et d'étudier le mécanisme sous-jacent à la perte d'effets potentiels des peptides d'élastine sur les fibroblastes dermiques et les cellules endotéhliales.

2. Analyse *in vitro* des effets des EDPs sur les fibroblastses dermiques et les cellules endothéliales au cours du viellissement *in vitro*

Afin d'étudier l'impact de l'âge sur la réaction stromale induite par les EDPs, nous avons utilisé un modèle de vieillissement *in vitro*. Le passage successif de cellules primaires en culture est utilisé dans cette étude comme un système *in vitro* pour analyser les effets de l'âge. En effet, ce modèle est capable de mimer les modifications cellulaires et géniques observées dans le vieillissement normal *in vivo* (Chen et al., 2013; Rubin, 1997). De plus, ce modèle permet de limiter la variabilité inter-individuelle. Dans cette étude, nous avons développé deux types de modèles de vieillissement *in vitro* basés sur deux types cellulaires très impliqués dans la réaction stromale que sont les cellules endothéliales (HUVECs) et les fibroblastes (fibroblastes dermiques humains). Ces deux types cellulaires sont directement impliqués dans la progression tumorale du mélanome et représentent, par conséquent, des cellules cibles potentiellement intéressantes dans notre étude. Globalement, les changements morphologiques, la diminution des capacités réplicatives, l'expression de la β-galactosidase à pH acide (Debacq-Chainiaux et al., 2009), la production de ROS et de la MMP-1 sont des marqueurs corrélés à la sénescence cellulaire (Dasgupta et al., 2010; Fisher et al., 2009; Vigneron and Vousden, 2010). Par conséquent, nous avons analysé ces paramètres afin de valider le vieillissement normal dans nos modèles de vieillissement *in vitro* (Figure 58).

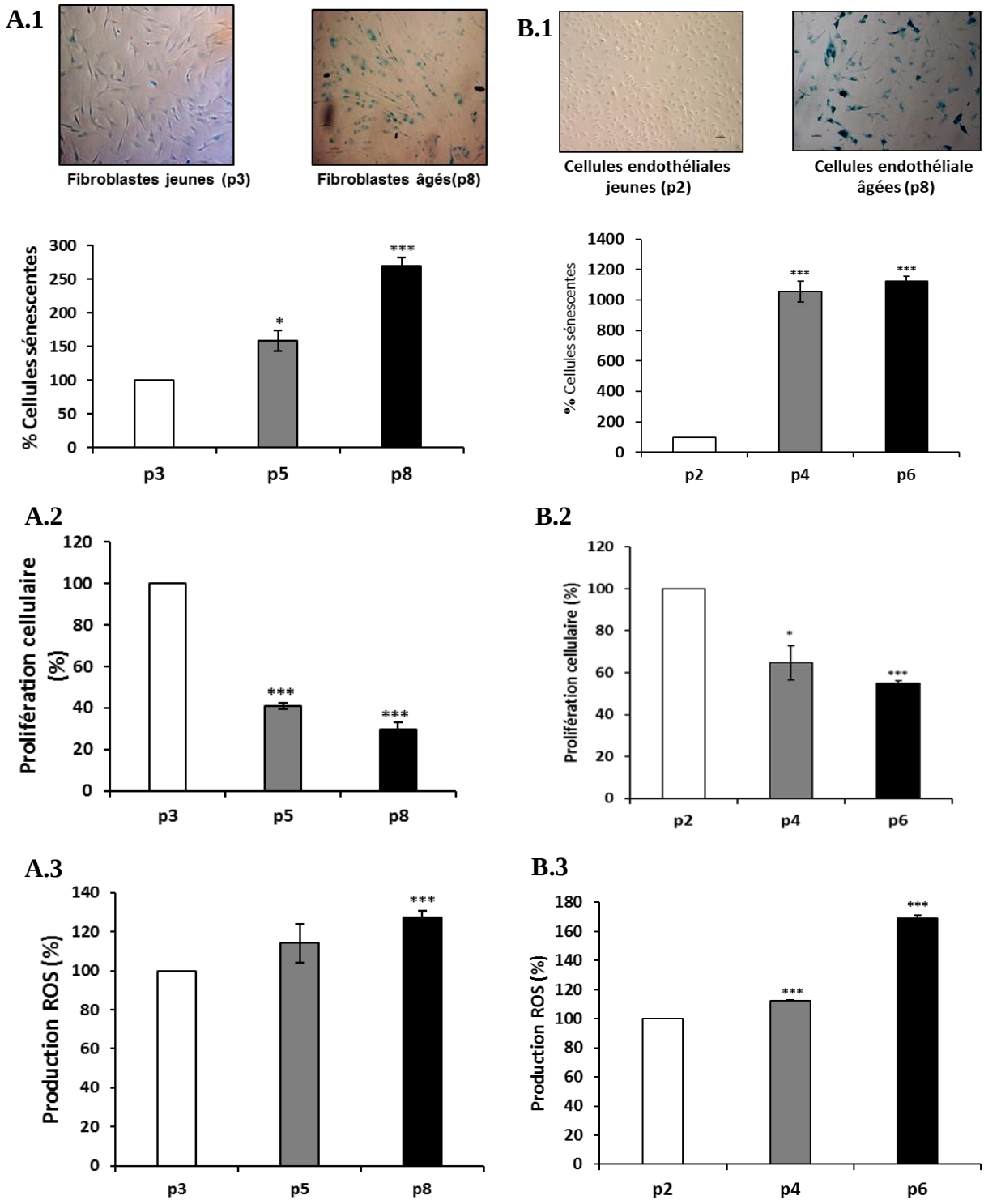


Figure 58. Caractérisation du modèle de vieillissement *in vitro*. A. Les fibroblastes jeunes, adultes et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). B. Les cellules endothéliales jeunes, adultes et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). A1-B1. Détection de la β-galactosidase au cours du vieillissement *in vitro*. Les cellules sont cultivées en plaque de culture et la β-galactosidase à pH acide est détectée en utilisant le β-galactosidase staining kit. Les cellules positives représentent les cellules sénescentes en bleu. Les cellules sont observées au microscope optique (×40) et comptées. A2-B2. Diminution de la prolifération au cours du vieillissement *in vitro.* Les cellules sont incubées avec de l'Uptiblue dilué au 1/10ème pendant 3h à 37°C et la prolifération est évaluée par mesure de l'absorbance à 560 nm. A3-B3. Production d'espèces réactives de l'oxygène au cours du vieillissement *in vitro.* Les cellules sont cultivées en plaques 24 puits et les ROS sont détectés par le kit Image-iT^{TM} LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (I36007). Les ROS sont détectés par fluorescence ($\lambda_{excitation}$ 495 nm/ $\lambda_{emission}$ 529 nm).

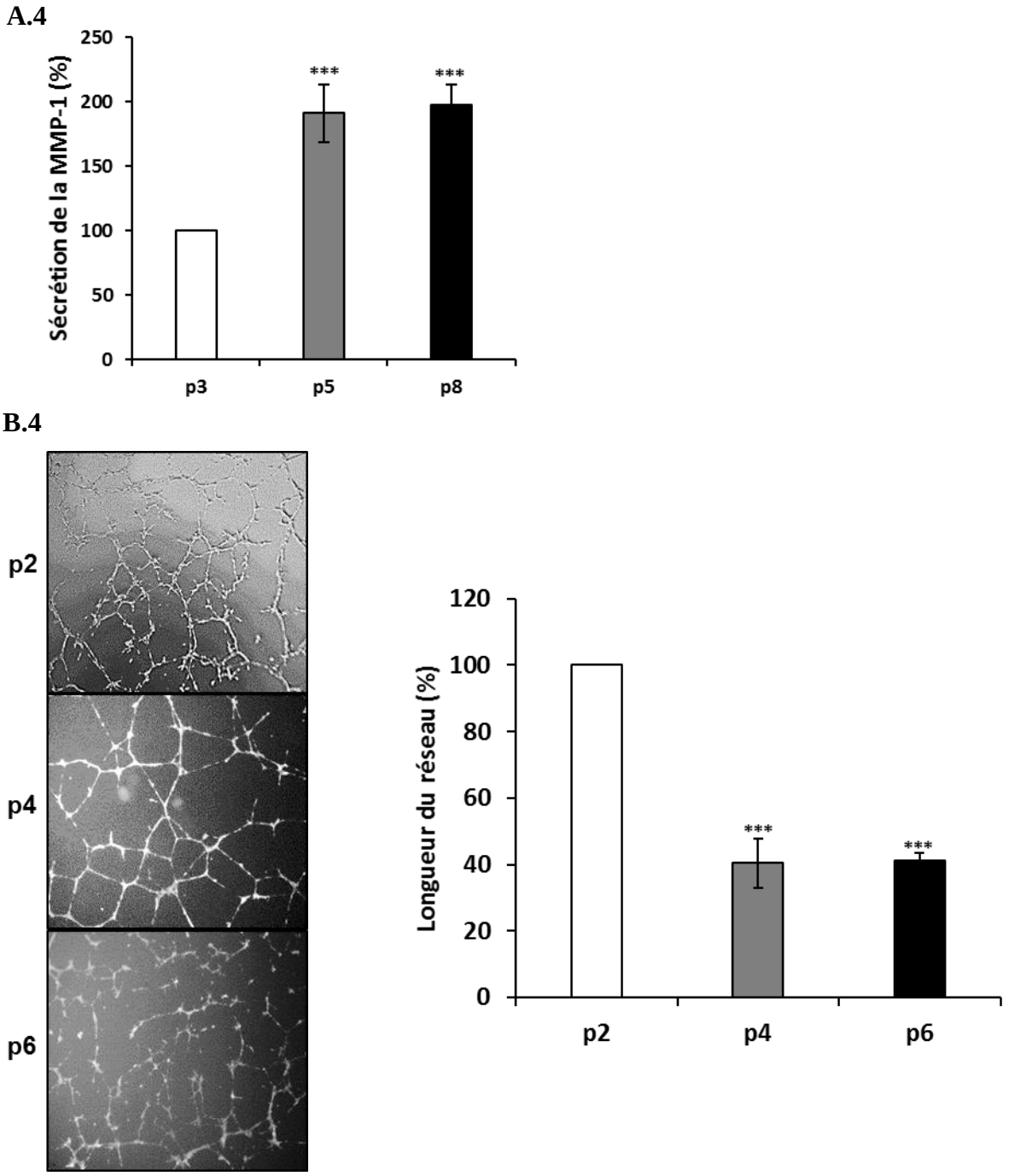


Figure 58 (suite). Caractérisation du modèle de vieillissement *in vitro*. **A.** Les fibroblastes jeunes, adultes et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). **B.** Les cellules endothéliales jeunes, adultes et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). A**4.** Sécrétion de la MMP-1 au cours du vieillissement *in vitro*. Les cellules sont cultivées en plaques 6 puits et les milieux conditionnés sont collectés après 24 h à 37°C. La sécrétion de la MMP-1 est dosée par ELISA. **B4.** Les cellules endothéliales sont ensemmencées sur Matrigel dans du milieu complet et la formation spontannée de pseudotubes est observée après 24 h à 37°C. Chaque expérience est représentative de trois expériences indépendantes. *, $p < 0,05$, ***, $p < 0,001$.

Nos deux modèles de vieillissement *in vitro* réalisés par passages successifs en culture présentent des caractéristiques de sénescence cellulaire tels que l'expression de la β-galactosidase à pH acide (Figure 58 A1 et B1), la perte de capacité réplicative (Figure 58 A2

et B2), l'augmentation de la production de ROS (Figure 58 A3 et B3), la production de la MMP-1 dans les fibroblastes (Figure58 A4) et la perte de capacité à former des pseudotubes sur Matrigel pour les cellules endothéliales (Figure 58 B4). Ces résultats permettent de valider ces modèles de vieillissement induit et leur utilisation pour étudier le vieillissement *in vitro* dans cette étude. Ainsi, nous considèrerons que les cellules jeunes sont représentées par les passages p3 pour les fibroblastes et p2 pour les cellules endothéliales (blanc), les cellules de stades « intermédiaires » par les passages p5 et p4 respectivement (gris) et les cellules âgées par les passages p8 et p6 respectivement (noir).

Ces modèles de vieillissement *in vitro* ont été ensuite utilisés pour évaluer l'impact du vieillissement sur les effets biologiques des peptides d'élastine et la capacité de nos stratégies thérapeutiques à les inhiber. Cette étude nous permet également d'analyser si les différentes stratégies efficaces sur les cellules tumorales le sont aussi sur le stroma.

La Figure 59 représente les résultats obtenus au cours du vieillissement des fibroblastes dermiques humains.

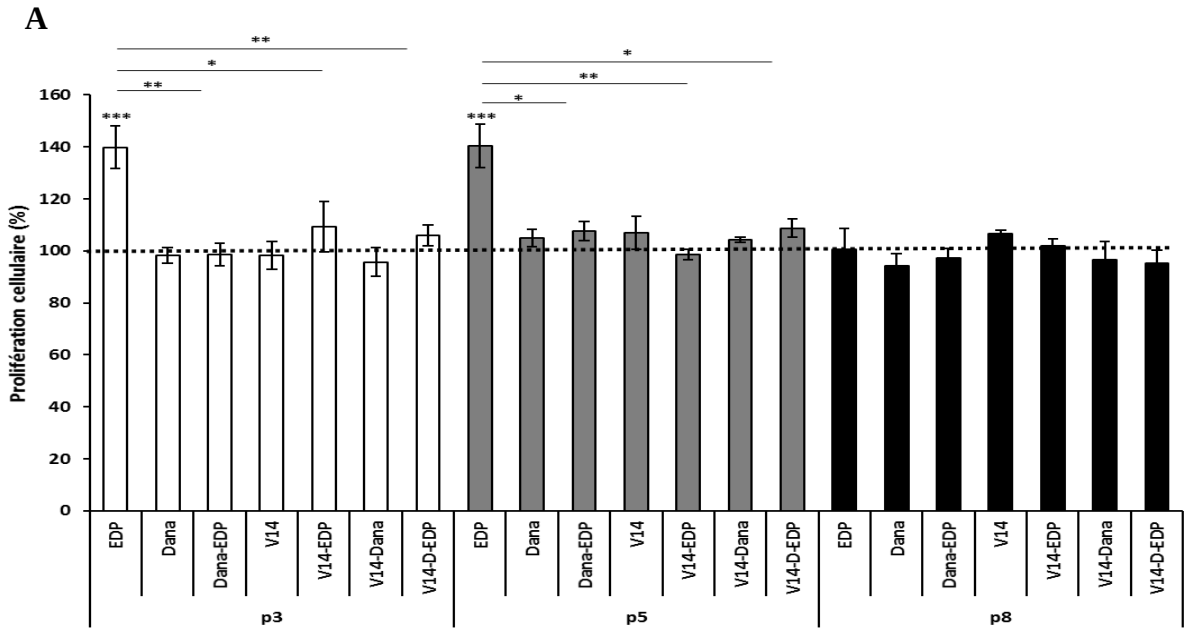


Figure 59. Impact de l'âge et des différents traitements sur les fibroblastes du stroma. Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). **A**. La prolifération des fibroblastes traités ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non d'un prétraitement avec du V14 (1,3 µM) et/ou au Dana (400 µM) a été analysée par comptage au Bleu Trypan après 48 h de stimulation à 37°C.

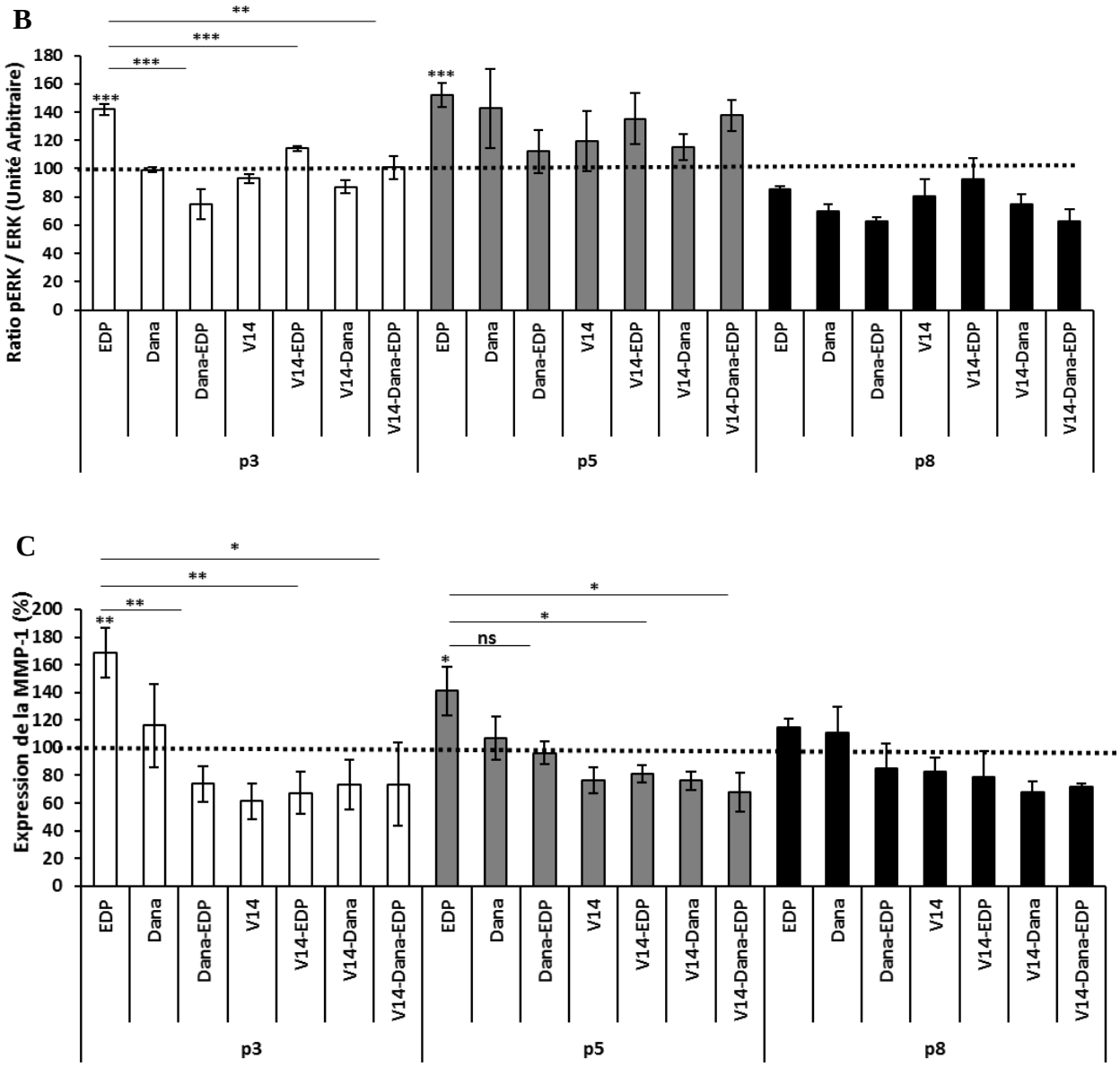


Figure 59 (suite). Impact de l'âge et des différents traitements sur les fibroblastes du stroma. **B**. Le niveau d'activation d'ERK1/2 a été analysé dans des fibroblastes traités ou non avec des EDP (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de V14 (1,3 µM) et/ou Dana (400 µM) par Western blot en utilisant les anticorps anti-phoshoERK1/2 et anti-ERK1/2 total. Le ratio phosphoERK1/2 /ERK1/2 total a été réalisé traduisant le niveau d'activation d'ERK1/2. **C.** L'expression de le MMP-1 dans des fibroblastes traités ou non avec des EDP (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de V14 (1,3 µM) et/ou Dana (400 µM) a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps anti-MMP-1 et révélée par chimiluminescence. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ainsi, nous observons une augmentation significative de la prolifération des fibroblastes jeunes et de statut intermédiaire en présence de peptides d'élastine, alors que les fibroblastes âgés ne semblent plus répondre (Figure 59A). Nous observons également que cette augmentation observée dans les fibroblastes jeunes et adultes est significativement réduite par les différents traitements que sont le Dana, le V14 et la combinaison des deux, alors qu'ils n'ont

aucun effet dans les fibroblastes âgés. La prolifération cellulaire est régulée par l'activation de la voie ERK1/2. Nous avons ainsi étudié son niveau de phosphorylation au cours du vieillissement et selon les différents traitements (Figure 59B). Des résultats similaires à ceux observés pour la prolifération sont obtenus. Enfin, les fibroblastes régulent la progression tumorale du mélanome au travers, entre autres, la sécrétion de MMP-1 au sein du stroma (Wandel et al., 2000). De plus, les EDP induisent sa sécrétion par ces cellules (Brassart et al., 2001; Duca et al., 2002). Nous avons ainsi analysé l'expression de la MMP-1 dans les fibroblastes dermiques humains en fonction de l'âge et des différents traitements en présence ou non de peptides d'élastine (Figure 59C). Des résultats comparables ont été obtenus, démontrant l'augmentation significative de l'expression de la MMP-1 en présence de peptides d'élastine dans les cellules jeunes et intermédiaires comparativement aux âgées. Par ailleurs, les différents traitements se montrent efficaces sur les cellules jeunes et de statut intermédiaire alors qu'aucun effet n'est observé dans les cellules âgées.

Nous avons par la suite évalué l'influence du viellissement cellulaire sur les effets induits par les EDPs dans des cellules endothéliales HUVECs.

Les résultats montrent que les peptides d'élastine sont capables de promouvoir la prolifération des cellules endothéliales jeunes et intermédiaires, mais n'ont aucun effet sur les cellules endothéliales considérées comme âgées (Figure 60A). Nous constatons également que le Dana seul ou combiné aux peptides d'élastine est capable d'augmenter significativement la prolifération des cellules endothéliales jeunes et de statut intermédiaire. Cependant, le traitement combiné au V14 ne présente pas d'effet additif. De plus, nous montrons que le V14 est capable de moduler les effets des peptides d'élastine sur la prolifération des cellules endothéliales jeunes et intermédiaires. Afin de corréler la prolifération à l'activation d'ERK1/2, nous avons évalué le niveau de phosphorylation d'ERK1/2 dans les différentes conditions précédemment décrites (Figure 60B). Nous observons une augmentation significative du niveau de phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules endothéliales jeunes et adultes comparativement aux cellules âgées. De plus, nous observons une augmentation du niveau de phospho-ERK1/2 en présence d'un traitement au Dana combiné aux peptides d'élastine et/ou au V14. Les traitements ne montrent pas de diminution significative des effets des peptides d'élastine sur le niveau de phospho-ERK1/2 pouvant s'expliquer par le fait que les cellules endothéliales sont des cellules très fragiles qui peuvent répondre à un grand nombre de stimuli extérieurs rendant leur utilisation compliquée dans les études signalitiques.

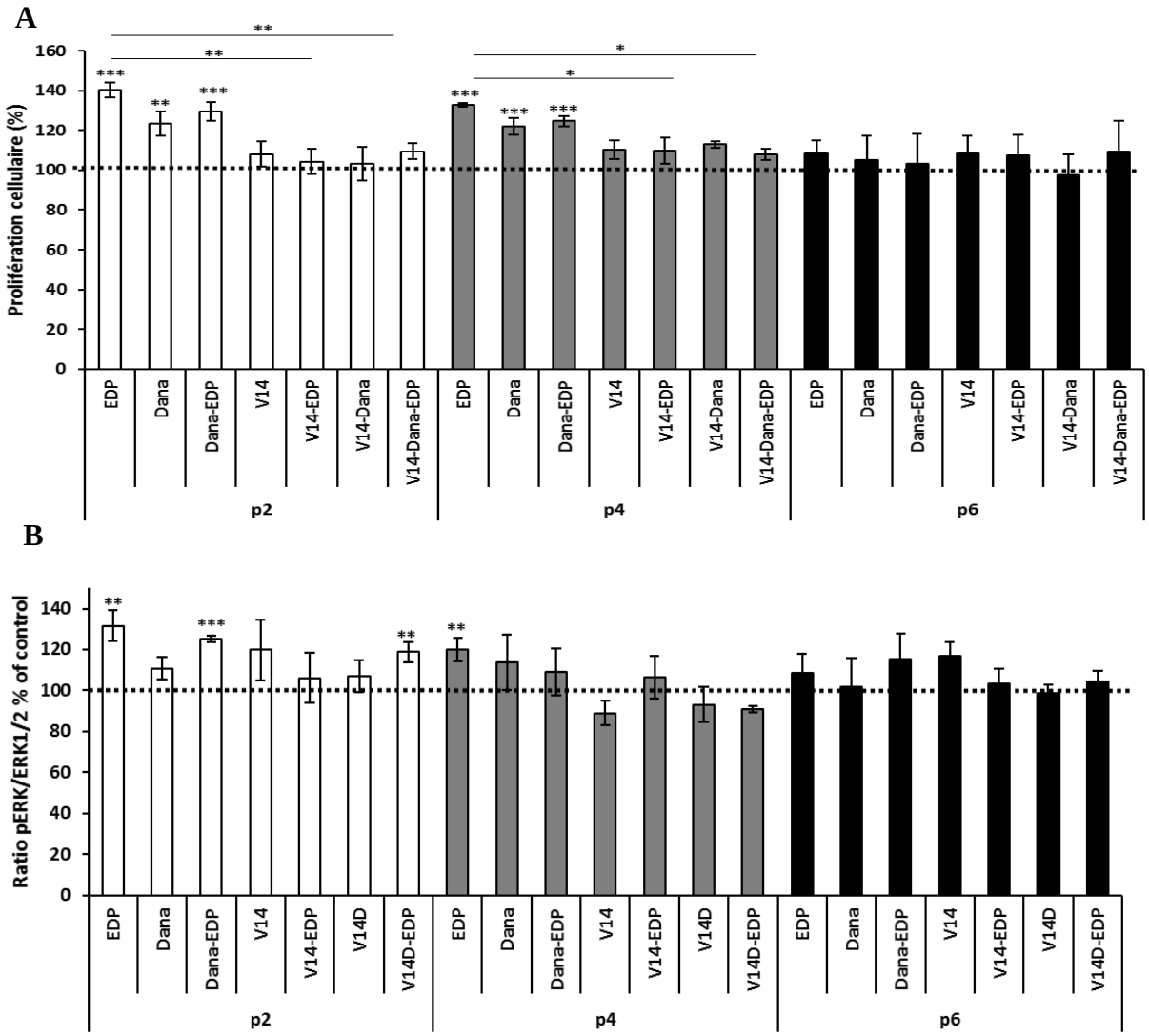


Figure 60. Impact de l'âge et des différents traitements sur les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales jeunes, adultes et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). **A.** La prolifération des cellules endothéliales traitées ou non avec des peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) en présence ou non d'un prétraitement au V14 (1,3 µM) et/ou au Dana (400 µM) a été analysée par comptage au Bleu Trypan après 48 h de stimulation à 37°C. L'histogramme est représentatif de l'ensemble des expériences qui ont été réalisées (n=3). **B**. Le niveau d'activation d'ERK1/2 a été analysé dans des cellules endothéliales traitées ou non avec des EDP (kE, 50 µg/ml) en présence ou non de V14 (1,3 µM) et/ou Dana (400 µM) par Western blot en utilisant les anticorps anti-phospho-ERK1/2 et anti-ERK1/2 total. Le ratio phospho-ERK1/2 /ERK1/2 total traduit le niveau d'activation d'ERK1/2. L'histogramme représente le ratio phosphoERK1/2 /ERK1/2 total représentatif des différentes expériences réalisées (n=3) * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

L'ensemble de ces résultats démontre que le ciblage thérapeutique du CRE peut être efficace tant sur les cellules de mélanome que sur le stroma. Néanmoins, il est important de noter que ces stratégies ne s'avèrent pertinentes dans notre modèle que sur des statuts jeunes et intermédiaires, les EDP perdant leurs effets sur cellules stromales âgées, expliquant la perte d'effet observé dans les modèles murins âgés de 20 mois.

La perte de capacité signalitique du CRE a été décrit auparavant (Faury et al., 1997a; Fulöp et al., 2001; Varga et al., 1997) bien que le mécanisme sous-jacent soit inconnu. Dans la dernière partie de ce manuscrit, nous nous sommes attachés à l'élucider.

B. Analyse de l'étude du découplage du CRE au cours du vieillissement

Nos résultats suggèrent fortement un potentiel découplage du CRE avec l'âge, processus ayant également été décrit par d'autres équipes dans des modèles différents. En effet, Faury et ses collaborateurs ont observé une perte des effets vasodilatateurs des EDP avec l'âge, dans un modèle d'anneau aortique (Faury et al., 1997b). Par ailleurs, des altérations reliées à l'âge dans la signalisation du CRE ont été décrites suggérant le découplage du CRE au cours du vieillissement (Fulöp et al., 2001). Cependant, à ce jour aucune explication n'a été reportée.

Dans cette partie, nous avons étudié la cascade d'évènements cellulaires et moléculaires déclenchée par les peptides d'élastine en fonction de l'âge, allant de l'expression du récepteur jusqu'à sa fonctionnalité. Ainsi, nous proposons une explication pour ce découplage lié à l'âge dans nos modèles de vieillissement *in vitro*.

1. Impact de l'âge sur l'expression du CRE

La perte des effets médiés par les peptides d'élastine au cours de l'âge n'implique pas de modification de l'expression de l'EBP ni de son affinité (Varga et al., 1990). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une modification de l'expression des ARNm et/ou du niveau protéique d'un autre partenaire du complexe CRE (Neu-1/PPCA) pourrait expliquer cette diminution. Le niveau d'expression des trois sous-unités du CRE a été évalué par RT-qPCR (Figure 61) et les protéines correspondantes ainsi que leur localisation membranaire ont été analysées par Western blot (Figure 62) et immunofluorescence (Figure 63). Dans cette série d'expériences, deux types de peptides d'élastine ont été utilisés, de la kE et le peptide canonique VGVAPG. De plus, un peptide scramble de VGVAPG a été utilisé afin de vérifier la spécificité de l'effet observé.

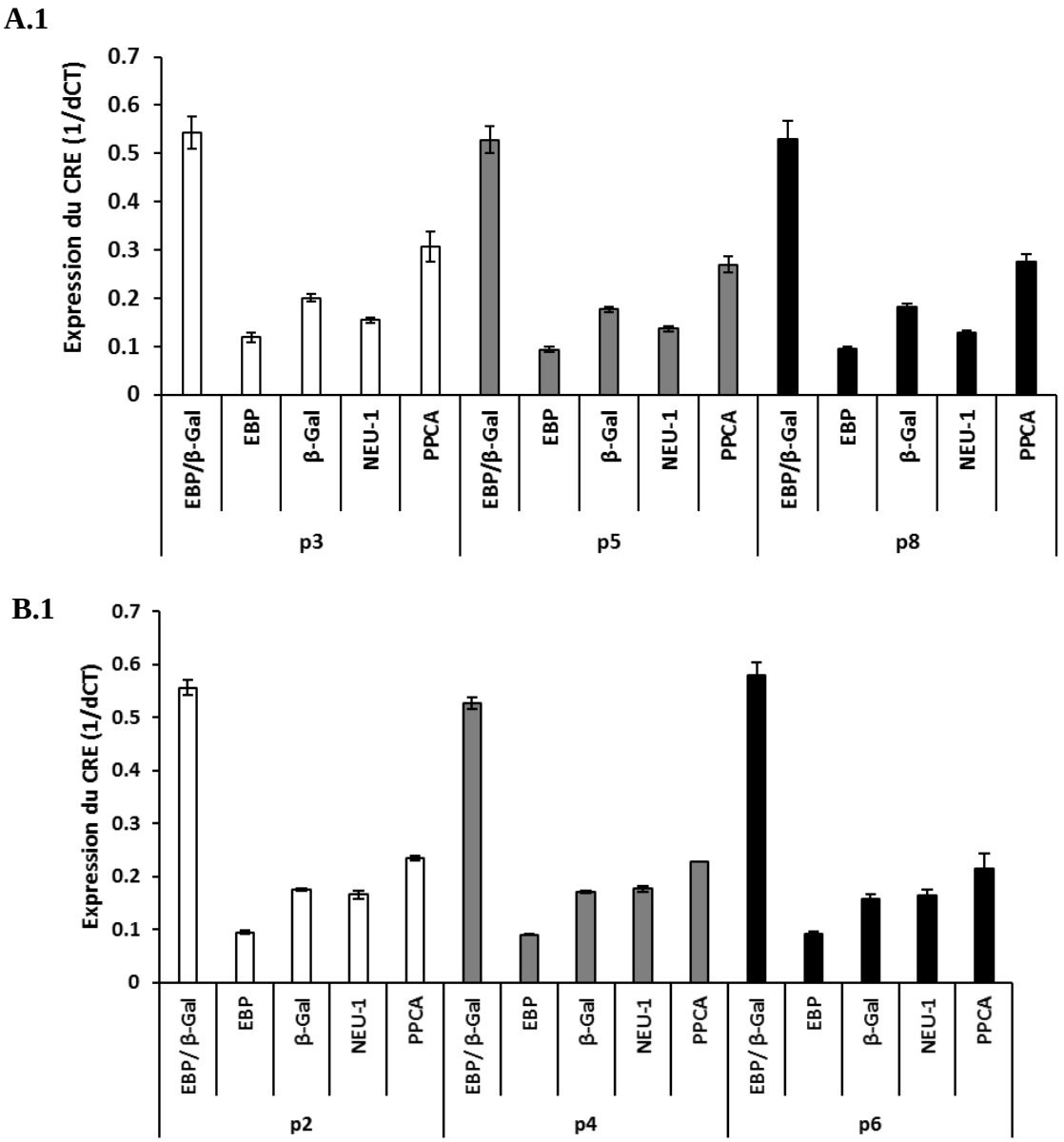


Figure 61. Expression des ARNm des trois sous-unités du CRE au cours du vieillissement *in vitro*. A.1 Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). B.1 Les cellules endothéliales jeunes, intermédiaires et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). 1. Expression des ARNm de EBP, β-galactosidase, NEU-1 et PPCA obtenus au cours du vieillissement *in vitro.*

A.2

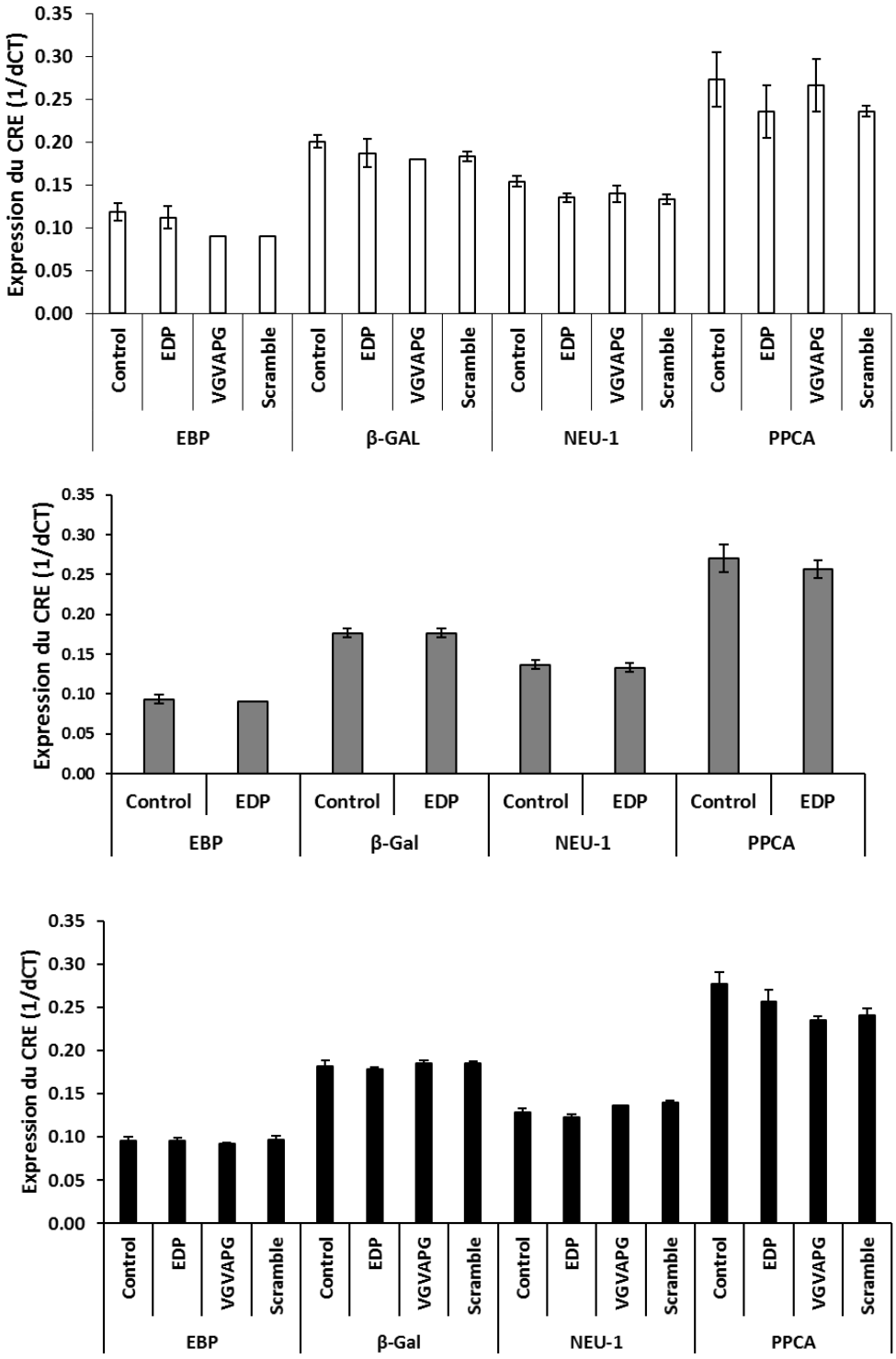


Figure 61 (suite 1). Expression des ARNm des trois sous-unités du CRE au cours du vieillissement *in vitro*. A. Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). B. Les cellules endothéliales jeunes, intermédiaires et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). 2. Impact des peptides d'élastine sur l'expression des ARNm des sous-unités du CRE au cours du vieillissement *in vitro.* L'expression des ARNm des sous-unités du CRE est analysée après 24 h de stimulation à 37°C avec ou sans peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml), ou du VGVAPG ou du peptide Scramble (20 0µg/ml). Les résultats sont exprimés en 1/CT. Chacun d'entre eux est représentatif de trois expériences indépendantes.

B.2

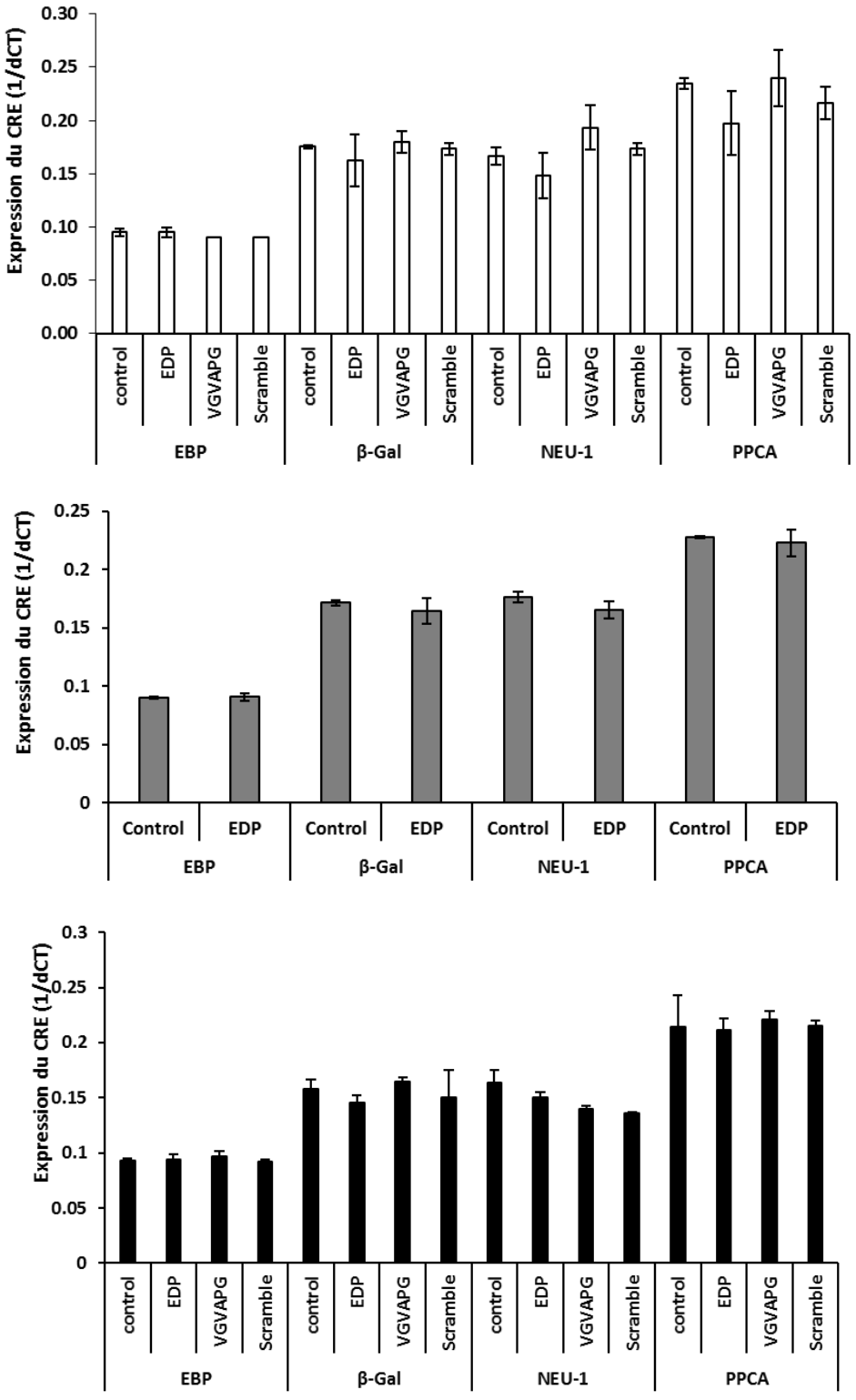


Figure 61 (suite 2). Expression des ARNm des trois sous-unités du CRE au cours du vieillissement *in vitro*. **A.** Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). **B.** Les cellules endothéliales jeunes, intermédiaires et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). **2.** Impact des peptides d'élastine sur l'expression des ARNm des sous-unités du CRE au cours du vieillissement *in vitro.* L'expression des ARNm des sous-unités du CRE est analysée après 24 h de stimulation à 37°C avec ou sans peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml), ou du VGVAPG ou du peptide Scramble (20 0µg/ml). Les résultats sont exprimés en 1/CT.Chacun d'entre eux est représentatif de trois expériences indépendantes.

Nos résultats montrent qu'il n'y a aucun changement dans l'expression des ARNm des différentes sous-unités du CRE (EBP, β-Gal, NEU-1 et PPCA), ni dans le ratio EBP/β-Gal au cours du processus de vieillissement *in vitro*, et ce, quelque soit le type cellulaire (Figure 61 A1-B1). De plus, nous démontrons également qu'une stimulation avec des peptides d'élastine (kE et VGVAPG) pendant 24 h n'induit pas de modifications de ces expressions tant dans les fibroblastes que dans les cellules endothéliales, et ni au cours du vieillissement *in vitro* de ces cellules (Figure 61 A2-B2). Ces résultats démontrent que le niveau transcriptionel du CRE n'est pas affecté par le vieillissement, que ce soit en présence ou en absence de peptides d'élastine.

La variation potentielle de l'expression protéique de l'EBP a déjà été étudié et ne montre aucune différence au cours du vieillissement (Varga et al., 1990). Nous nous sommes ainsi focalisés sur le niveau protéique (Figure 62) et la localisation membranaire (Figure 63) de Neu-1 et de PPCA. Les niveaux protéiques des sous-unités Neu-1 et PPCA ne sont pas affectés au cours du vieillissement *in vitro*, quelque soit le type cellulaire. Dans les cellules traitées avec les peptides d'élastine, nous n'observons pas de variation des niveaux protéiques, ni pour Neu-1 ni pour PPCA. De plus, aucune modification de ces profils n'est observée au cours du vieillissement *in vitro,* que ce soit dans les fibroblastes ou dans les cellules endothéliales (Figure 62). Les mêmes résultats ont été obtenus lors de l'analyse de la localisation membranaire de Neu-1 et PPCA par immunofluorescence (Figute 63). En effet, nous n'observons pas de modification ni de la quantité ni de la localisation de PPCA ou Neu-1 au cours de l'âge, que ce soit en absence ou en présence de peptides d'élastine, et ce, quelque soit le type cellulaire étudié (Figure 63). Nous pouvons donc conclure que le niveau protéique et la localisation d'au moins deux des trois sous-unités du CRE restent inchangés au cours du vieillissement. Par conséquent, nous excluons cette possible explication pour le découplage du CRE observé avec l'âge. Une modification plus en aval, comme celle de l'activité enzymatique de Neu-1, qui est essentielle à la transduction du signal médié par les peptides d'élastine (Duca et al., 2007), pourrait être à l'origine du découplage du CRE avec l'âge.

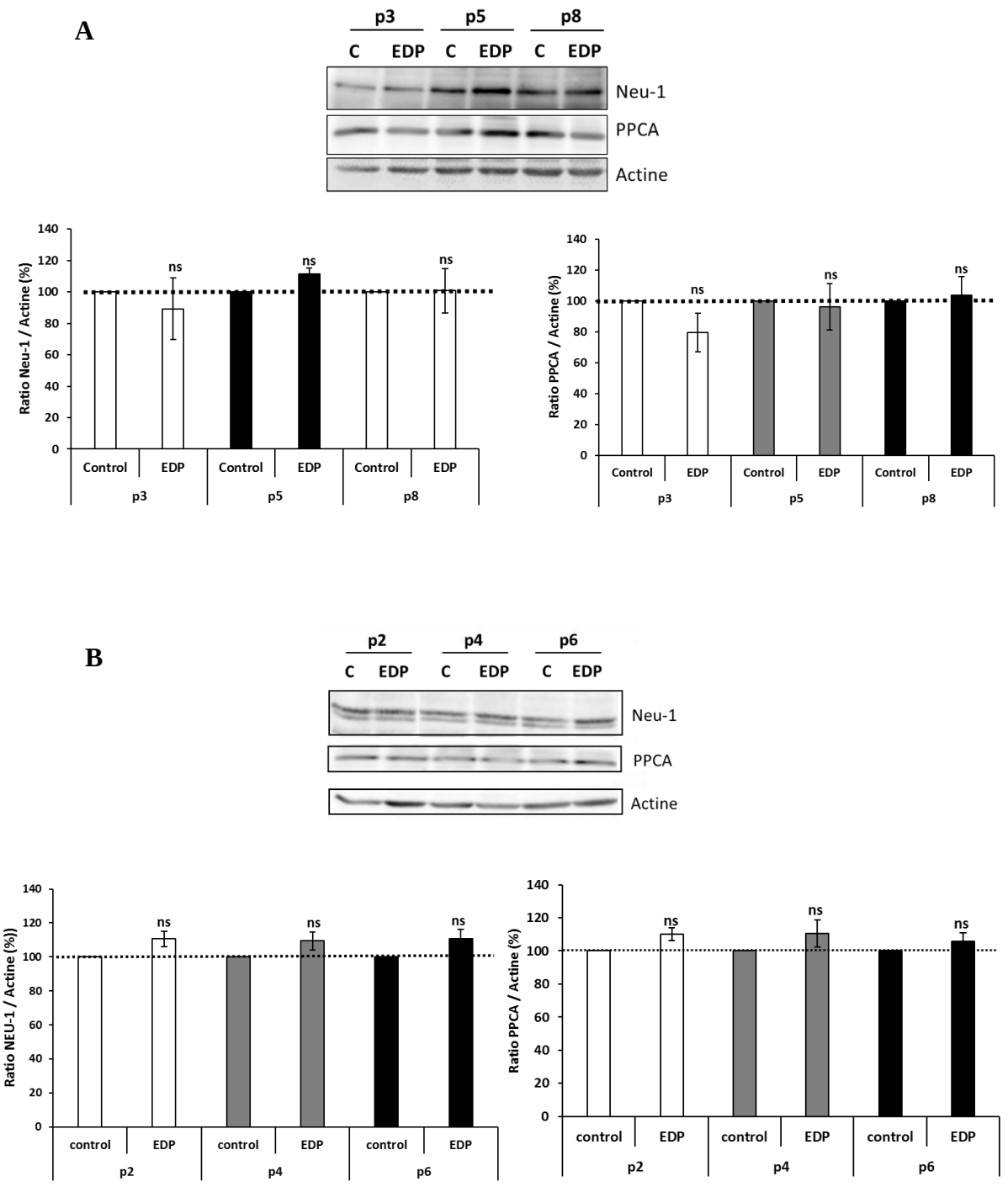


Figure 62. Analyse de l'expression protéique de Neu-1 et PPCA au cours du vieillissement *in vitro*. **A.** Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). **B.** Les cellules endothéliales jeunes, intermédiaires et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). Les niveaux protéiques de Neu-1 et PPCA sont analysés après 24h de stimulation avec ou sans peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml) suivie d'une extraction protéique. Les détections de Neu-1 et PPCA sont ensuite réalisées par Western blot avec des anticorps anti-Neu-1 (1/500) et anti-PPCA (1/1000). Les résultats sont exprimés en ratio Neu-1 ou PPCA / actine et sont normalisés et exprimés en pourcentage du contrôle. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

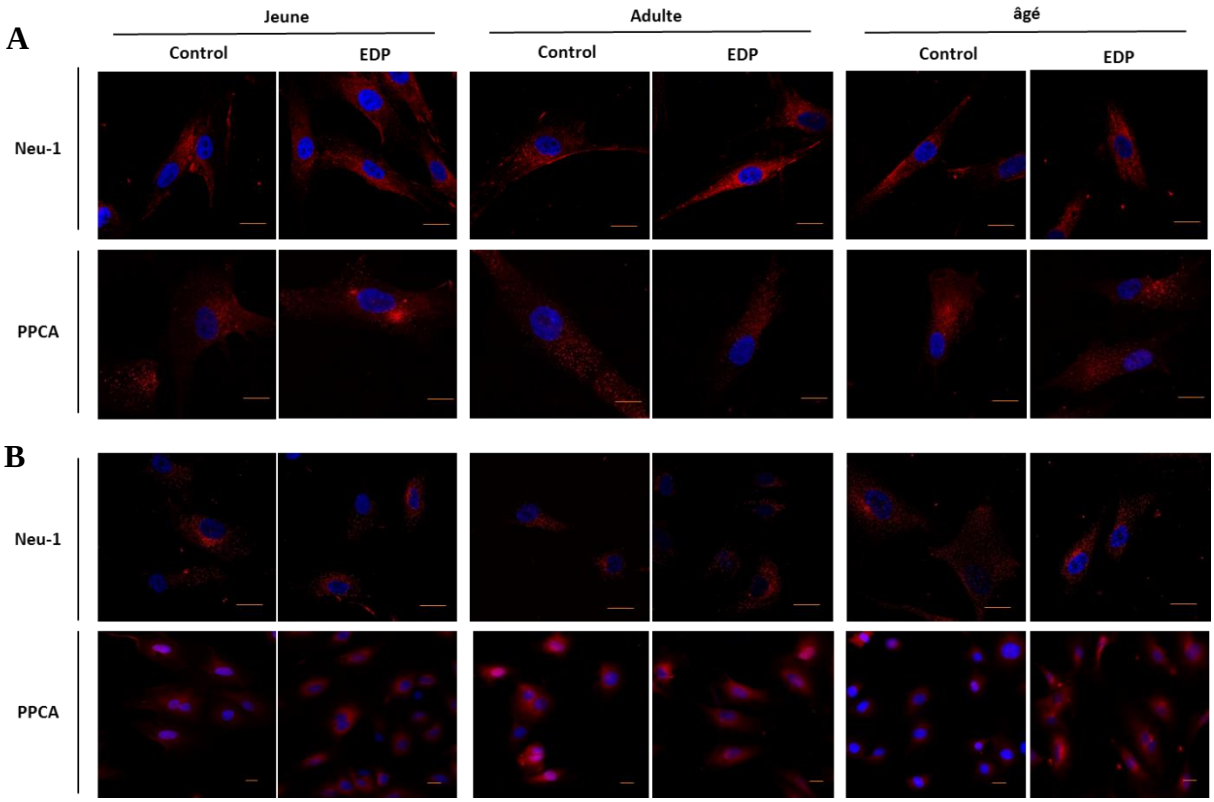


Figure 63. Localisation de Neu-1 et PPCA au cours du vieillissement *in vitro*. **A.** Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés correspondent aux passages p3, p5 et p8. **B.** Les cellules endothéliales jeunes, intermédiaires et âgées correspondent aux passages p2, p4 et p6. Les localisations de Neu-1 et PPCA sont analysées par microscopie confocale avec des anticorps anti-Neu-1 (1/500) et anti-PPCA (1/500) indirectement couplés à un AlexaFluor-568 (rouge). Les expressions membranaires de Neu-1 et PPCA sont analysés après 24h de stimulation avec ou sans peptides d'élastine (EDP) (kE, 50 µg/ml). Neu-1 et PPCA apparaissent rouge et les noyaux en bleu. L'échelle indique 10 µm.

2. Altération de la fonctionnalité du CRE au cours de l'âge

Nous avons précédemment montré que le découplage du récepteur CRE au cours de l'âge n'implique pas de modification des niveaux d'ARNm, de protéine et de la localisation des différentes sous-unités du CRE. Nous savons qu'après la fixation des peptides d'élastine sur l'EBP, le signal est transduit à la sous-unité Neu-1 (Duca et al., 2007). Cette dernière transmet les signaux au niveau intracellulaire au travers son activité sialidase régulant la conversion du GM_3 membranaire en LacCer intracellulaire (Rusciani et al., 2010). Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que l'activité sialidase pourrait être à l'origine du découplage du CRE avec l'âge.

a) Influence du viellissement sur l'activité sialidase du CRE

Afin d'évaluer si l'activité sialidase de Neu-1 pourrait être affectée par le vieillissement, nous avons mesuré l'activité sialidase induite par les peptides d'élastine en fonction de l'âge dans nos modèles de vieillissement *in vitro,* à l'aide d'un substrat chromogénique (Figure 64). Dans un premier temps, nous avons analysé l'activité sialidase basale en fonction de l'âge dans nos cellules, fibroblastes et cellules endothéliales (Figure 64 A1-B1). Comparativement aux fibroblastes jeunes, nous observons une augmentation de cette activité sialidase basale de deux fois dans les fibroblastes d'âge intermédiaire et de trois fois les fibroblastes âgés (Figure 64 A1). De façon similaire, les activités sialidases basales des cellules endothéliales adultes et âgées montrent une augmentation significative de respectivement 29% et 69% comparées aux cellules jeunes (Figure 64 B1). Les mêmes expériences ont été réalisées en présence de peptides d'élastine (Figure 64 A2-B2). Une augmentation significative de l'activité sialidase induite par les peptides d'élastine est observée dans les fibroblastes jeunes, représentant 50% d'augmentation. Cette augmentation est plus faible de 20% dans les fibroblastes intermédiaires et n'est plus observée dans les fibroblastes âgés (Figure 64A2). Des résultats quasiment semblables ont été obtenus au cours du vieillissement des cellules endothéliales. Une augmentation de 40% de l'activité sialidase induite par les peptides d'élastine dans les cellules jeunes a été mise en évidence. Cette augmentation s'établit à seulement 20% et 3% pour les cellules intermédiaires et âgées respectivement, bien que ces augmentations ne soient pas significatives (Figure 64 B2).

Ainsi, nous démontrons que les peptides d'élastine perdent leur capacité à déclencher l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1 au cours du vieillissement *in vitro*. Cependant, il est important de noter que l'activité sialidase basale augmente de manière significative avec l'âge et ce, quelque soit le type cellulaire utilisé. Par conséquent, nous pouvons supposer que chez les sujets âgés l'activité sialidase basale est à son maximum provoquant ainsi un phénomène de saturation. Cette hypothèse pourrait expliquer la perte des effets des peptides d'élastine au cours du vieillissement.

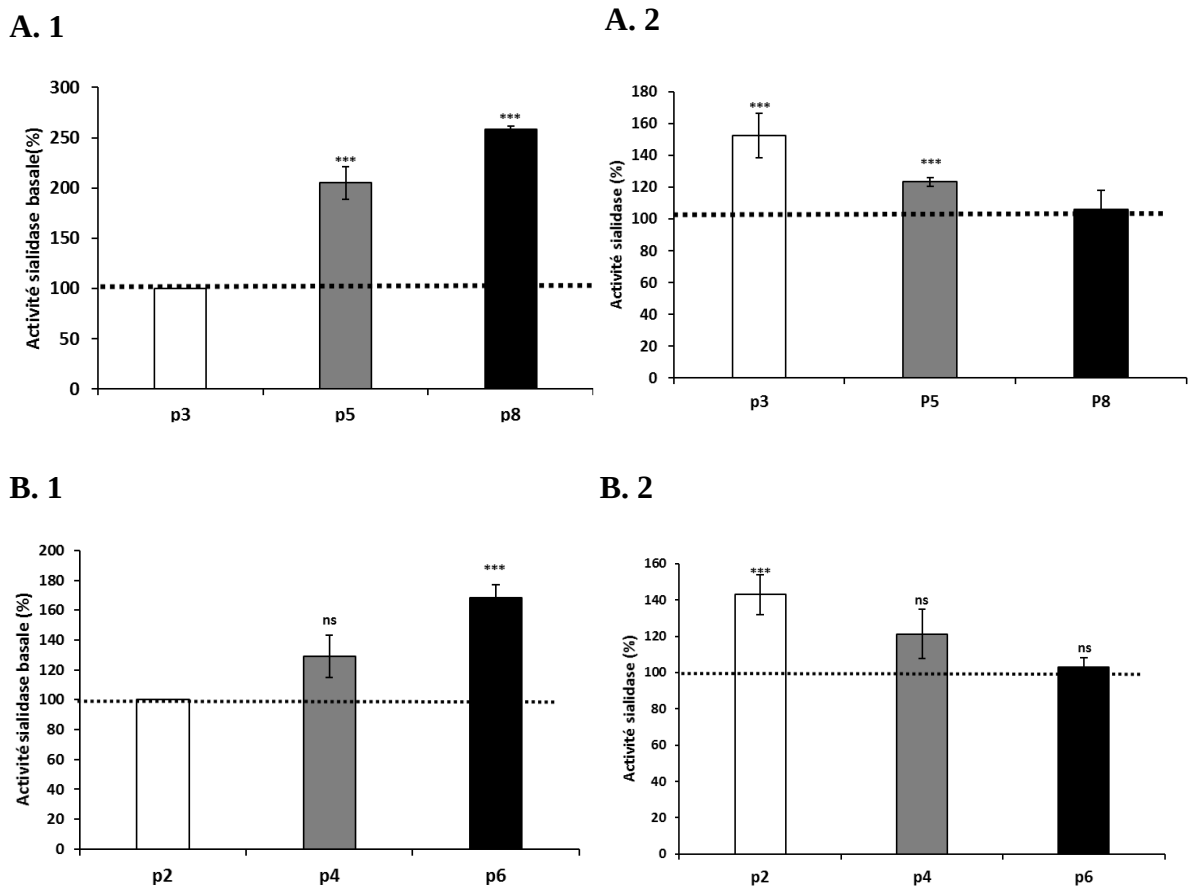


Figure 64. Impact de l'âge sur l'activité sialidase induite par les peptides d'élastine. **A.** Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). **B.** Les cellules endothéliales jeunes, intermédiaires et âgées sont représentées par les passages p2 (blanc), p4 (gris) et p6 (noir). **1.** L'activité sialidase basale est mesurée avec 50 µg de « crude » membranes avec un substrat chromogénique, le para-nitrophenyl-NANA pendant 4 h à 37°C à l'abri de la lumière. Les histogrammes représentent l'activité sialidase basale exprimée. **2.** L'activité sialidase induite par les peptides d'élastine est évaluée sur des cellules pré-stimulées ou non aux peptides d'élastine (EDP, kE) (50 µg/ml) pendant 30 min à 37°C. Ensuite, 50 µg de « crude » membranes sont utilisés pour mesurer l'activité sialidase *via* le para-nitrophenyl-NANA pendant 4 h à 37°C à l'abri de la lumière. Les histogrammes représentent les résultats normalisés par rapport au contrôle et exprimés en pourcentage. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. *** $p < 0{,}001$.

b) Influence du viellissement sur la production de LacCer

Pour évaluer si la modification de l'activité sialidase observée pourrait être corrélée à la modification de la production de LacCer, nous avons mesuré cette dernière au cours du processus de vieillissement *in vitro*. Nos résultats montrent (Figure 65A) une augmentation progressive et significative du niveau basal de LacCer avec l'âge. Le niveau de LacCer atteint ainsi une production maximale dans les fibroblastes âgés avec une augmentation de 50% comparativement aux cellules jeunes. Par conséquent, l'augmentation du LacCer produit est cohérente avec l'évolution de l'activité sialidase au cours du vieillissement *in vitro*. L'augmentation liée à l'âge semble impliquer une activité sialidase et non une biosynthèse *de novo* comme le montre la modulation de la production du LacCer après prétraitement au Dana.

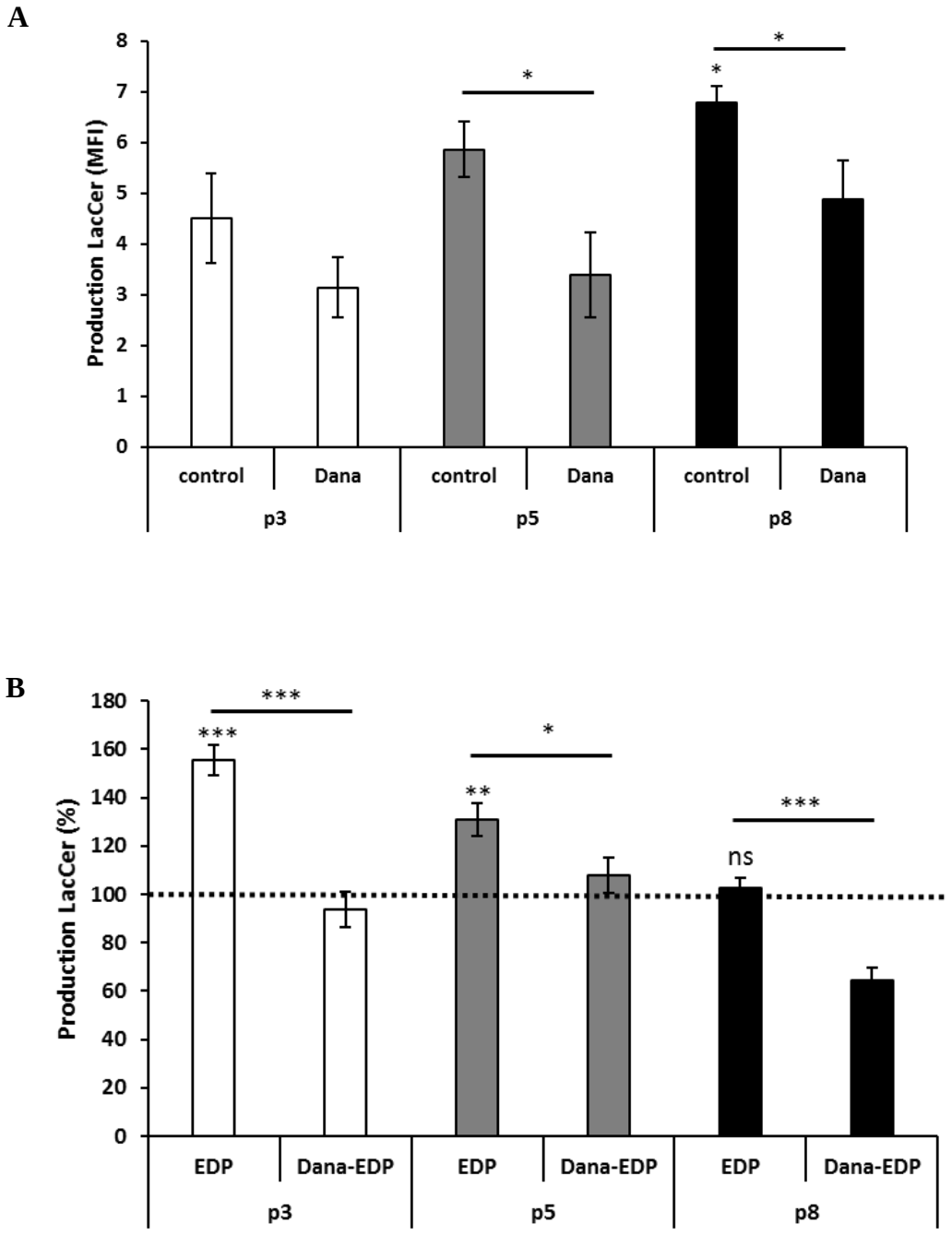


Figure 65. Impact de l'âge sur la production de LacCer induite par les peptides d'élastine. Les fibroblastes jeunes, intermédiaires et âgés sont représentés par les passages p3 (blanc), p5 (gris) et p8 (noir). **A.** La production de LacCer au cours de l'âge est détectée par cytométrie en flux avec ou sans prétraitement au Dana (400 µM) pendant 1h à 37°C suivie d'un immunomarquage avec un anticorps anti-CD17-FITC (LacCer) incubé pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Les histogrammes représentent les résultats exprimés en MIF (mean intensity fluorescence). **B.** Les cellules sont stimulées pendant 30 min avec ou sans peptides d'élastine (EDP) (50 µg/ml) en présence ou non de Dana (400 µM, 1 h). Le LacCer produit est analysé par cytométrie en flux en utilisant un anticorps anti-CD17-FITC incubé pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité. Les histogrammes représentent les résultats normalisés par rapport au contrôle et exprimés en pourcentage. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0,001$.

La stimulation des cellules avec des peptides d'élastine induit une augmentation significative de la production de LacCer dans les fibroblastes jeunes (+50%). Cette augmentation est comparable dans les cellules intermédiaires mais est perdue dans les cellules

âgées (Figure 65B). De plus, nous montrons qu'un prétraitement au Dana régule les effets des peptides d'élastine sur la production de LacCer. Ces résultats démontrent l'implication de la sous-unité Neu-1 dans la production du LacCer médiée par les peptides d'élastine. Nos résultats suggèrent donc que le découplage du CRE est dû à la perte de la capacité des peptides d'élastine à déclencher la production de LacCer dépendant de l'activité sialidase de Neu-1.

Discussion et Perspectives

V. Discussion et Perspectives

A. Discussion

Le mélanome est l'un des cancers les plus agressifs. Dans celui-ci, le stroma tumoral joue un rôle extrêmement important (Labrousse et al., 2004). En effet, les cellules endothéliales (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005), les fibroblastes (Brassart et al., 2001; Duca et al., 2002) et les protéines matricielles (Feinmesser et al., 2002) sont capables de moduler l'invasion du mélanome. Au sein de la MEC, les peptides d'élastine issus de la dégradation de l'élastine sont capables d'influencer le développement tumoral du mélanome (Hornebeck et al., 2005; Ntayi et al., 2004; Pocza et al., 2007). L'ensemble de ces données sont issues d'expériences réalisées *in vitro* et suggèrent très fortement leur implication dans cette pathologie. La fragmentation des fibres élastiques est observée chez des patients atteints de mélanomes invasifs, confirmant ainsi leur présence *in vivo* et renforçant l'hypothèse de leur rôle central dans l'évolution de la pathologie (Labrousse et al., 2004; Ntayi et al., 2004).

Nous avons été les premiers à démontrer que les EDPs sont capables de stimuler *in vivo* le développement des mélanomes au travers de l'augmentation de la prolifération des cellules tumorales, de leur migration et de leur invasion *via* l'induction de la MMP-1 (Devy et al., 2010). Ces travaux auquels j'ai pu participer lors de mon stage de Master et de mon arrivée en thèse suggéraient ainsi que le complexe récepteur de l'élastine, le CRE, pouvait constituer une cible pharmacologique potentielle et innovante afin de lutter contre la progression de ce cancer extrêmement grave.

Nous avons ainsi entrepris lors de ma thèse d'étudier l'influence du ciblage pharmacologique de ce récepteur, de développer des stratégies d'inhibition et de prendre en compte la composante viellissement dans ce contexte. Nos résultats démontrent que le ciblage pharmacologique du CRE à l'aide de Dana, inhibiteur de Neu-1, et de V14, agissant tel un récepteur soluble des EDP, sont des stratégies intéressantes présentant un fort pouvoir d'inhibition de l'effet pro-tumoral des EDPs. Nous montrons également l'importance du stroma dans les effets des peptides d'élastine, un stroma âgé incapable de répondre à leur stimulation ne permettant plus de favoriser le développement de ce cancer cutané. Enfin, nous avons mis à jour le mécanisme de découplage du récepteur de sa signalisation et de ses effets biologiques apparaissant au cours du vieillissement.

Le CRE est composé de trois sous-unités, la protéine liant l'élastine et ses peptides (EBP), la neuramidase-1 (Neu-1) et la protéine protectrice-cathepsine-A (PPCA) (Hinek et al., 2008;

Mecham et al., 1991; Wang et al., 2009). Chaque sous-unité joue un rôle central au sein du récepteur. L'EBP permet la liaison des peptides de l'élastine entraînant ensuite la transduction du signal (Baranek et al., 2007; Blanchevoye et al., 2013). La sous-unité Neu-1 est capable de transduire le signal médié par la liaison des peptides à l'EBP au niveau intracellulaire *via* son activité sialidase (Duca et al., 2007) et, plus particulièrement, en permettant la conversion du GM_3 membranaire en LacCer, un second messager intracellulaire impliqué dans la signalisation des peptides d'élastine (Rusciani et al., 2010). La sous-unité PPCA, quant à elle, permet le maintien de l'intégrité du récepteur et assure une activation optimale de la sialidase Neu-1 (Bonten et al., 2009a; D'Agrosa and Callahan, 1988). Nous avons proposé de développer deux stratégies pouvant être efficaces pour cibler le CRE au sein du stroma tumoral: (*i*) basée sur l'inhibition de l'activité sialidase de Neu-1 directement impliquée dans la transduction du signal intracellulaire, et (*ii*) basée sur le bloquage de la liaison des peptides d'élastine à l'EBP atténuant ainsi le signal médié par ces derniers.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisé sur l'inhibition de l'activité sialidase de la sous-unité Neu-1. Pour cela, le Dana, un inhibiteur compétitif du site actif des sialidases, a été utilisé pour inhiber la sous-unité Neu-1. Ce type d'approche a déjà été utilisé dans l'insulino-résistance médiée par les peptides d'élastine (Blaise et al., 2013). Cependant aucune donnée n'a été démontrée dans le développement du mélanome. Nous avons évalué cette stratégie sur le mélanome murin B16F1 pour lequel les effets des peptides d'élastine ont été démontrés (Devy et al., 2010). Cette lignée cellulaire présente une forte proportion de ganglioside GM_3 membranaire (Hirabayashi and Taniguchi, 1989), un des substrats clivés par Neu-1 suite à un traitement par les peptides d'élastine. Dans le mélanome B16, la présence du GM_3 est associée à la formation de métastases pulmonaires (Saha and Mohanty, 2003). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que les puissants effets pro-tumoraux des peptides d'élastine sur les cellules B16F1 pourraient être directement liés au fait que ces cellules présentent un taux élevé de GM_3 membranaire. Ainsi, le traitement de ces cellules par les peptides d'élastine conduirait à une plus importante génération de LacCer, le second messager du CRE et donc à des effets importants. Ces constatations renforcent la pertinence de notre stratégie basée sur l'inhibition de l'activité sialidase de Neu-1.

Les peptides d'élastine régulent diverses fonctions biologiques dont certaines sont directement associées à la progression tumorale comme la prolifération cellulaire (Devy et al., 2010; Ghuysen-Itard et al., 1992; Mochizuki et al., 2002; Tajima et al., 1997), la migration et

l'invasion (Devy et al., 2010; Robinet et al., 2005; Toupance et al., 2012), la sécrétion de protéases (Brassart et al., 2001; Duca et al., 2002; Ntayi et al., 2004; Siemianowicz et al., 2010), ou l'angiogenèse (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005). Nous avons démontré que le Dana est capable d'inhiber la progression du mélanome *in vitro,* en réduisant la prolifération, la migration cellulaire et la sécrétion de la MMP-1 médiées par les peptides d'élastine. De plus, nous montrons que la diminution des effets des peptides d'élastine est due à l'impossibilité de la sous-unité Neu-1 à transduire un signal intracellulaire menant à l'activation de la voie de signalisation ERK1/2. En effet, il a été démontré que l'activité catalytique de Neu-1 est essentielle à la transduction du signal médiée par les peptides d'élastine (Duca et al., 2007). L'inhibition de la sous-unité Neu-1 s'est avérée très efficace *in vitro*. Nous avons donc étudié l'impact de cette inhibition sur le développement tumoral du mélanome *in vivo*. Nos résultats montrent que le Dana est capable de moduler la croissance du mélanome médiée par les peptides d'élastine *in vivo*, comme nous pouvons l'observer par une diminution significative des volumes tumoraux.

Ces résultats démontrent que des molécules issues du stroma, et plus particulièrement les peptides d'élastine, suffisent à influencer le développement du mélanome. Ces observations renforcent les données de la littérature démontrant le rôle central du stroma dans l'agressivité et l'évolution de cette pathologie (Feinmesser et al., 2002; Labrousse et al., 2004; Ruiter and Herlyn, 2003; Smolle et al., 1995). L'analyse par immunohistochimie de différents marqueurs a permis de caractériser les effets du traitement *in vivo*. Nous démontrons une diminution de l'expression nucléaire du marqueur de prolifération Ki67 médiée par le Dana dans les tumeurs traitées aux peptides d'élastine. Cette observation confirme que le Dana est capable de moduler la croissance tumorale *in vivo via* une diminution de la prolifération des cellules de mélanome en présence de peptides d'élastine. De manière très intéressante, la détection du marqueur de prolifération Ki67 dans les tumeurs permet de prédire la formation de métastases chez les patients (Matsumoto et al., 1999). Ces données démontrent que le Dana serait capable de moduler la progression tumorale du mélanome et la formation de métastases *in vivo*, bien que ce dernier point n'ait pas été abordé dans cette étude.

Nous avons analysé également l'expression de la MMP-1, connue pour être surexprimée en présence de peptides d'élastine dans le mélanome (Devy et al., 2010; Iida and McCarthy, 2007b). Nos résultats montrent que le Dana est capable de réduire l'expression de la MMP-1 médiée par les peptides d'élastine, observée notamment par une diminution du marquage en

immunohistochimie. Ces résultats démontrent que le Dana module la croissance du mélanome *in vivo* en inhibant la sécrétion de la MMP-1 induite par les peptides d'élastine, permettant ainsi une diminution de la collagénolyse et donc de l'invasion tumorale intra-dermique (Chimal-Ramírez et al., 2013).

Au cours de la croissance tumorale, l'un des facteurs limitant est l'angiogenèse. En effet, celle-ci est indispensable lorsque la tumeur atteint une taille critique (1 mm^3 ;(Folkman and Hanahan, 1991). Elle participe à l'apport en nutriments, en oxygène et à l'élimination des déchets (Potente et al., 2011). Ainsi, l'angiogenèse favorise l'invasion du mélanome conduisant à la formation de métastases. Il est maintenant bien connu que les peptides d'élastine sont capables de moduler l'angiogenèse, en régulant notamment l'expression de la MT1-MMP et en favorisant la migration des cellules endothéliales (Fahem et al., 2008; Robinet et al., 2005). Nous avons confirmé ces observations dans un contexte tumoral en démontrant l'augmentation de l'expression du facteur pro-angiogénique VEGF dans les tumeurs traitées aux peptides d'élastine par immunohistochimie. En effet, le marqueur VEGF peut être directement associé à l'angiogenèse (Claffey et al., 1996; Senger et al., 1997). De manière surprenante, nos résultats démontrent également une augmentation de l'expression de ce facteur angiogénique par le Dana dans les tumeurs stimulées ou non avec des peptides d'élastine. Au vu de ces résultats étonnants, il semblerait que le Dana soit capable de favoriser l'angiogenèse tumorale. Nous avons donc étudié l'influence du Dana dans différents modèles d'angiogenèse *in vitro* par la formation de pseudotubes sur Matrigel, *ex vivo* par la méthode des anneaux aortiques, et *in vivo* par la méthode de Matrigel plug. Toutes ces méthodes sont décrites comme des méthodes de choix dans l'étude de l'angiogenèse (Akhtar et al., 2002b; Norrby, 2006; Zimrin et al., 1995). L'ensemble des résultats obtenus avec ces modèles permet de démontrer très clairement une augmentation de l'angiogenèse médiée par le Dana seul. Ces résultats supposent donc qu'une activité sialidase est impliquée dans la régulation de l'angiogenèse en utilisant possiblement celle de Neu-1. En effet, l'activité sialidase de Neu-1 participe à la régulation négative de récepteurs adjacents comme l'IGFR et le PDGFR en les désialylant (Hinek et al., 2008) et en les inactivant. Par ailleurs, il a été reporté très récemment que le récepteur CD31, impliqué dans l'angiogenèse, est régulé négativement par l'activité sialidase de Neu-1 (Lee et al., 2014a). Ainsi, l'inhibition de l'activité de Neu-1, certainement indépendante de celle retrouvée au sein du CRE, permettrait de lever son effet inhibiteur sur ce récepteur, conduisant à la mise en place du processus angiogénique. En effet, bien que Neu-1 ait été décrite au sein du CRE, il a également été retrouvé à la membrane plasmique en dehors de ce complexe appuyant cette

hypothèse (Pshezhetsky et Hinek, 2011). Il apparaît donc que l'activité sialidase de Neu-1 puisse moduler l'angiogenèse. Cependant, dans notre étude, l'angiogenèse mise en place ne semble pas favoriser le développement tumoral, une diminution du volume tumoral dans les tumeurs stimulées aux peptides d'élastine et traitées au Dana étant observée.

De plus en plus d'études démontrent que la « normalisation » vasculaire, un procédé qui consiste à développer une angiogenèse normale et mature, pourrait être une stratégie intéressante et novatrice pour diminuer la croissance tumorale. La normalisation vasculaire permet de diminuer la perméabilité vasculaire observée dans l'angiogenèse tumorale, d'améliorer par conséquent la délivrance réelle des agents thérapeutiques et de diminuer la formation de métastases (Goel et al., 2011, 2012). Par ailleurs, la normalisation vasculaire permet une ré-oxygénation des tumeurs, laquelle est directement impliquée dans l'efficacité de la radiothérapie utilisant l'oxygène pour former des radicaux libres et détruire la tumeur (Cerniglia et al., 2009). Ainsi, nous pourrions envisager que le Dana pourrait favoriser la formation d'une vascularisation normale au sein de la tumeur sans influencer la croissance tumorale et permettre une meilleure distribution et une efficacité accrue des drogues sur les cellules de mélanome. Le récepteur PDGFR est impliqué dans la maturation et l'imperméabilité vasculaire en favorisant l'assemblage des péricytes autour des vaisseaux (Hellberg et al., 2010). Le niveau de sialylation de ce récepteur est régulé par l'activité sialidase de Neu-1 (Hinek et al., 2008). En effet, lorsque celui-ci est sialylé, il est actif et inversement lorsqu'il est désialylé. Un traitement à l'aide de Dana, bloquant la désialylation du récepteur au PDGF et le rendant actif, pourrait participer à l'augmentation de l'angiogenèse observée. Une normalisation vasculaire pourrait donc se mettre en place en présence de Dana.

Nous avons également développé une stratégie basée sur le ciblage de la sous-unité EBP. Pour cela, nous avons utilisé le peptide V14 correspondant à une partie de la séquence V32 spécifique à l'EBP et impliquée dans la liaison des peptides d'élastine (Blanchevoye et al., 2013; Privitera et al., 1998). L'objectif fût d'utiliser ce peptide comme récepteur soluble dans le but d'antagoniser la liaison des peptides à l'EBP. Bien que Robinet et ses collaborateurs aient démontré que ce peptide V14 puisse inhiber les effets des peptides d'élastine (Robinet et al., 2007), il ne fût jamais montré que ce peptide puisse réellement agir comme récepteur soluble limitant son utilisation pharmacologique. Nous avons ainsi utilisé des outils de modélisation moléculaire afin de prédire et d'analyser l'interaction entre ces deux molécules. Ces mêmes outils ont déjà été utilisés pour proposer un modèle d'interaction entre EBP-VGVAPG. Celui-

ci a permis d'identifier les séquences impliquées sur l'EBP, les conformations qu'adoptent le peptide VGVAPG et les résidus essentiels à cette interaction (Blanchevoye et al., 2013; Moroy et al., 2005, 2009). En utilisant une méthode de docking moléculaire, nous avons pu prédire l'interaction entre le peptide V14 et le VGVAPG. De plus, nos résultats montrent une énergie de liaison et un groupe de conformations très peuplé présentant des caractéristiques favorables à une bonne interaction. Une analyse plus poussée a également permis de mettre en évidence la formation de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes semblables à celles observées dans le docking EBP-VGVAPG (Blanchevoye et al., 2013). La stabilité d'un complexe moléculaire peut être étudiée grâce à la méthode de dynamique moléculaire, qui permet de faire évoluer un système dans le temps dans des conditions bien définies. Par ailleurs, cet outil est couramment utilisé afin de prédire le comportement moléculaire de molécule simple ou au sein d'un complexe (Housaindokht et al., 2008). Ces données confèrent ainsi des informations de structure et permettent de déterminer des zones d'interactions potentielles. Nos résultats montrent que la séquence QDEA du peptide V14 et la partie VGV du peptide d'élastine VGVAPG interagissent ensemble et de manière relativement stable dans le temps. Par ailleurs, ces interactions ont également été décrites dans l'interaction EBP-VGVAPG (Moroy et al., 2009). Ces résultats permettent de démontrer que l'interaction du peptide V14 au VGVAPG présente des caractéristiques quasi-similaires à celle observées entre le VGVAPG et l'EBP, supposant que cette interaction est possible, cohérente et stable. De plus, nous montrons que l'interaction entre les peptides V14 et VGVAPG est stabilisée par la formation de structures secondaires impliquant ou non des liaisons hydrogène, comme le décrivent les résultats obtenus par l'analyse DSSP. Ce type de structure est connu pour stabiliser une conformation dans le temps, ce qui renforce l'idée que l'interaction entre nos deux peptides est stable. Par ailleurs, le nombre de structures secondaires formées dans ce complexe est supérieur à celles formées dans l'interaction EBP-VGVAPG. Ce résultat conforte l'hypothèse que V14 interagit avec VGVAPG. Cette interaction est stabilisée de façon similaire à l'interaction EBP-VGVAPG, et semble même plus stable. Ainsi, l'ensemble de cette étude démontre que le peptide V14 interagit avec le peptide d'élastine VGVAPG et que cette interaction présente des caractéristiques structurales et de conformation quasi-similaires à celles observées dans l'interaction EBP-VGVPAG (Blanchevoye et al., 2013; Moroy et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc que le V14 peut antagoniser la liaison des peptides d'élastine à l'EBP.

Nous avons donc évalué l'influence de cette stratégie thérapeutique dans le mélanome. Comme pour l'inhibition de la sous-unité Neu-1, cette stratégie a été analysée sur les processus

cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement du mélanome. Ainsi, nous montrons que le peptide V14 est capable d'antagoniser les effets des peptides d'élastine sur la prolifération cellulaire, la migration, et la sécrétion de la MMP-1. Ces effets impliquent l'inhibition de la transduction du signal médiée par les peptides d'élastine par le peptide V14, comme observé par l'étude du niveau de phosphorylation de ERK1/2. Par conséquent, ces données renforcent celles précédemment obtenues et démontrent clairement que non seulement la sous-unité Neu-1 joue un rôle central, mais que la liaison des peptides d'élastine à l'EBP l'est tout autant. Par ailleurs, ces données *in vitro* ont été confirmées dans l'étude du développement du mélanome *in vivo*. En effet, nos résultats montrent une diminution du volume tumoral en présence du peptide V14 dans les tumeurs traitées aux peptides d'élastine. Celle-ci s'accompagne d'une diminution des expressions du marqueur nucléaire de prolifération Ki67, de la MMP-1 et également du marqueur pro-angiogénique VEGF, observée notamment par la diminution du marquage immunohistochimique des tumeurs. Robinet et ses collaborateurs ont démontré que le peptide V14 est capable d'inhiber les effets pro-angiogéniques des peptides d'élastine *in vitro* (Robinet et al., 2007). Nous validons ici ces observations dans un contexte tumoral et également en étudiant l'angiogenèse dans différents modèles tels que la formation de pseudotubes sur Matrigel *in vitro* et la méthode des anneaux aortiques *ex vivo*. Ces résultats sont en parfaite cohérence avec le niveau d'expression du marqueur VEGF observé dans les tumeurs stimulées aux peptides d'élastine et traitées avec le peptide V14. Nos résultats démontrent que le peptide V14 est capable de moduler la progression du mélanome en agissant d'une part sur la tumeur mais également en régulant l'angiogenèse médiée par les peptides d'élastine. Il apparaît ainsi clairement la possibilité de bloquer l'influence délétère des EDP vis-à-vis du développement du mélanome en utilisant soit un récepteur soluble, le V14 soit un inhibiteur de Neu-1, le Dana. Il est cependant important de rappeler que le Dana n'est pas spécifique de Neu-1 et peut tout à fait inhiber une autre sialidase membranaire, la neuraminidase-3 (Neu-3). Cependant, dans un contexte tumoral, ceci pourrait être un bénéfice. En effet, Neu-3 *via* une altération de la composition gangliosidique des tissus et des cellules, mène à la modulation de la transduction du signal de différents récepteurs tels que l'EGFR (Tringali et al., 2012), ou l'IR (Alghamdi et al., 2014), et présente un effet pro-tumoral (Tringali et al., 2012). Néanmoins, à ce jour, aucune donnée sur la présence de Neu-3 dans les cellules de mélanome B16F1 n'a été récensée. De plus, Neu-3 n'a jusqu'à présent jamais été reliée aux effets des peptides d'élastine ni même au complexe récepteur de l'élastine. Par ailleurs, les résultats obtenus avec le Dana sont similaires à ceux obtenus avec le peptide antagoniste V14

suggèrant l'implication du même récepteur et excluant un potentiel effet de la Neu-3 dans les effets observés.

Nous montrons également qu'une co-inhibition de la sous-unité EBP et Neu-1 n'induit pas d'effet synergique ou additif, et donne des résultats similaires à ceux obtenus avec des traitements au Dana ou au V14 seuls. Le peptide V14 présente la particularité de cibler la liaison des peptides d'élastine à l'EBP et donc de cibler uniquement la voie du CRE. Ces résultats suggèrent donc que, dans le cadre du mélanome B16F1, les peptides d'élastine n'engagent que le CRE et sa signalisation associée (Duca et al., 2007). En effet, l'utilisation du Dana ou du peptide antagoniste V14 bloquent totalement les effets des peptides d'élastine suggèrant ainsi que les autres récepteurs potentiels des peptides d'élastine tels que la galectine-3 (Pocza et al., 2007) ou l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Patel et al., 2012; Rodgers and Weiss, 2004) ne sont pas engagés dans les effets observés dans ce modèle d'étude.

Le stroma joue un rôle essentiel dans le développement du mélanome (Labrousse et al., 2004) et les peptides d'élastine sont théoriquement capables de moduler ses activités présentant des effets sur les fibroblastes (prolifération, sécrétion de protéases…Duca et al., 2004) et sur les cellules endothéliales (Fahem et al., 2008). Cependant, ces études n'ont jamais tenues compte de la composante vieillissement du stroma. Le vieillissement est l'un des facteurs de risque principal qui influence le développement du mélanome (Hegde et al., 2009). En effet, l'incidence du mélanome est estimée à 60 ans, bien que celui-ci tende à apparaître de plus en plus tôt dû à l'exposition au soleil. Par conséquent, il nous a semblé essentiel d'évaluer l'influence des EDP et l'efficacité du ciblage du CRE sur la progression du mélanome dans un contexte âgé.

Nous avons ainsi analysé le développement tumoral du mélanome par implantation de cellules B16F1 dans des souris C57B/J6 très âgées (20 mois), correspondant chez l'Homme à environ 80-90 ans (Pettan-Brewer et al., 2012). Nos résultats montrent que les peptides d'élastine ne permettent plus de stimuler la croissance du mélanome *in vivo.* Ces observations confirment que la réponse stromale vis-à-vis des peptides d'élastine est très importante pour la progression du mélanome (Feinmesser et al., 2002; Labrousse et al., 2004; Ruiter et al., 2002; Smolle et al., 1995). Par conséquent, nos traitements ne montrent aucun effet significatif dans les volumes tumoraux, ni même dans l'expression du marqueur nucléaire Ki67, et du marqueur

angiogénique VEGF. Cependant, l'expression de la MMP-1 semble quant à elle être surexprimée dans toutes les tumeurs. Cette augmentation est cohérente avec les données de la littérature qui reportent une forte augmentation de l'expression de la MMP-1 avec l'âge (Fisher et al., 2009). Par ailleurs, celle-ci fait partie des biomarqueurs de vieillissement (Pitiyage et al., 2012). D'une manière très surprenante, nous avons observé une diminution significative de la taille des tumeurs dans les souris âgées comparativement aux tumeurs des souris jeunes, tumeurs non traitées avec des EDP. Ces résultats sont étonnants, au vu des données retrouvées dans la littérature démontrant l'état inflammatoire, la richesse en protéases et en fragments dérivés de l'élastine présents dans le stroma âgé, lesquels peuvent directement être associés à la tumorigenèse (Begley et al., 2008; Ićurup and Vucković, 1994; Kim et al., 2013; Lisanti et al., 2011; Petersen et al., 2002; Shan et al., 2009). Nous aurions, en effet, pu nous attendre à une intense stimulation de la croissance tumorale. Bien que frappants, ces résultats démontrent que l'âge du stroma peut influencer la tumeur et qu'un stroma très âgé ne semble pas capable de constituer un écosystème propice au développement d'une tumeur.

L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que le stroma âgé n'est plus capable de favoriser le développement tumoral du mélanome *in vivo* et que les peptides d'élastine sont incapables d'exercer leurs effets. Ces données suggérent également que bien que les EDP soient capables d'influencer directement les cellules de mélanome (Partie I de ce manuscrit), ils semblent exercer principalement leurs effets pro-tumoraux *in vivo via* le stroma. Nous avons donc décidé de pousser plus loin nos investigations et d'étudier le mécanisme sous-jacent à la perte d'effets des peptides d'élastine sur les fibroblastes dermiques et les cellules endothéliales.

Pour cela, nous avons développé un modèle de vieillissement *in vitro* par passages successifs de cellules primaires (fibroblastes dermiques et cellules endothéliales). ces deux types cellulaires présents dans le stroma sont clairement impliqués dans le développement tumoral (Erhard et al., 1997; Park et al., 1999; Pietras and Östman, 2010; Wandel et al., 2002). Les passages successifs en culture cellulaire sont considérés comme une méthode de choix pour développer un modèle de vieillissement *in vitro* (Chen et al., 2013; Rubin, 1997). Ce modèle reproduit les modifications liées à l'âge telles que la diminution des capacités réplicatives, le changement morphologique (Chen et al., 2013), l'augmentation de l'expression de la β-galactosidase à pH acide (Debacq-Chainiaux et al., 2009), l'augmentation de la production de ROS et de la MMP-1 (Dasgupta et al., 2010; Fisher et al., 2009). Ces marqueurs de sénescence

ont été utilisés pour caractériser nos deux modèles et confirment l'induction d'un vieillissement efficace.

Suite aux résultats obtenus *in vivo*, nous nous sommes donc attachés à évaluer l'impact du vieillissement sur les effets biologiques induits par les EDP sur ces cellules stromales ainsi que les conséquences du ciblage du CRE dans nos modèles de vieillissement *in vitro*.

Dans les fibroblastes et les cellules endothéliales âgés, nous n'observons plus d'effet des peptides d'élastine sur les processus précédemment étudiés. Les stratégies d'inhibition mises en place ne sont par conséquent efficaces que sur des cellules jeunes ou de statut intermédiaire démontrant un potentiel inhibiteur uniquement sur la réaction stromale associée à un stroma jeune ou adulte.

Nos résultats montrent en effet que le peptide V14 semble inhiber la prolifération cellulaire, l'expression de la MMP-1 et l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 médiées par les peptides d'élastine dans des fibroblastes jeunes et d'âge intermédiaire *in vitro*. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules endothéliales jeunes modulées par les peptides d'élastine, impliquant une diminution de la prolifération et de l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 *in vitro*. Ces résultats démontrent que l'inhibition de la liaison des peptides d'élastine à l'EBP permet de moduler à la fois la tumeur mais également les cellules stromales telles que les fibroblastes et les cellules endothéliales. Le ciblage de la sous-unité Neu-1 par le Dana montre des résultats similaires sur les fibroblastes jeunes et intermédiaires. Cependant, un effet pro-prolifératif du Dana est observé sur des cellules endothéliales, possiblement dû à la levée de l'inhibition qu'exerce Neu-1 sur le CD31 tel que nous l'avons décrit ci-dessus et rapporté dans la littérature (Lee et al., 2014a).

La perte d'effet des EDPs sur les cellules âgées suggère fortement un potentiel découplage du CRE de ses voies de signalisation avec l'âge, processus ayant également été décrit par d'autres équipes dans des modèles différents. Cependant, à ce jour, aucune explication n'a été reportée. Dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes proposé de mettre en évidence une explication potentielle à ce découplage lié à l'âge en utilisant nos modèles de vieillissement *in vitro*.

Diverses données de la littérature rapportent que la signalisation induite par la liaison des peptides d'élastine à l'EBP est perturbée avec l'âge. Parmi eux, on retrouve l'impossibilité d'activer des protéines Gi (Varga et al., 1990), l'altération de la signalisation du calcium (Faury et al., 1997b; Fülöp et al., 1986; Robert, 1996) et la modulation des activités MAPK (Garrington and Johnson, 1999). L'ensemble de ces données et nos résultats expérimentaux suggèrent un découplage du CRE impliquant une modification d'un ou de plusieurs évènements moléculaires de la cascade de signalisation.

Les altérations de la signalisation des peptides d'élastine n'impliquent pas de modification de l'expression de l'EBP ni de son affinité (Varga et al., 1997). De plus, nous montrons que le vieillissement n'affectent pas les expressions des ARNm des trois sous-unités du CRE, ni même le niveau d'expression et la localisation de PPCA et Neu-1, et ce, que ce soit dans les fibroblastes ou dans les cellules endothéliales. Ainsi, nous démontrons que ni l'expression des ARNm, ni le niveau protéique et ni la localisation cellulaire du CRE ne peuvent expliquer le découplage de ce dernier au cours de l'âge.

Par conséquent, nous avons supposé que les altérations liées à l'âge dans la signalisation des peptides d'élastine pourraient concerner les premières étapes de sa signalisation. En effet, des modifications de l'activité sialidase de Neu-1 ou de la composition lipidique membranaire pourraient expliquer le découplage du CRE. Les gangliosides sont des glycosphingolipides contenant des acides sialiques présents dans les micro-domaines des membranes plasmiques (Rusciani et al., 2010). Ils sont impliqués dans les interactions cellulaires et dans les processus de transduction du signal (Allende and Proia, 2002; Miyagi et al., 2008). La liaison des peptides d'élastine à l'EBP entraîne l'activation de la sialidase Neu-1 menant à la conversion du GM_3 membranaire en LacCer. Celui-ci agit ensuite comme un second messager intracellulaire et active la signalisation des peptides d'élastine (Duca et al., 2007; Rusciani et al., 2010). Nos résultats mettent en évidence une augmentation de l'activité sialidase basale avec l'âge. Par ailleurs, celle induite par les peptides d'élastine montre une altération au cours du vieillissement *in vitro,* et ce, quelque soit le type cellulaire. De telles variations ont déjà été rapportées par Saito et ses collaborateurs, qui démontrent des modulations de l'activité sialidase au cours de l'âge dans des membranes synaptiques isolées de cerveau de souris (Saito et al., 1995). De plus, nous observons que le niveau basal de production de LacCer augmente avec l'âge, lequel est directement corrélé avec l'augmentation de l'activité sialidase précédemment observée et non à une synthèse de novo comme le montrent les résultats d'inhibition de la production de LacCer

en présence de Dana. Nous montrons également une altération de la production de LacCer médiée par les peptides d'élastine au cours de l'âge, observée par une diminution du LacCer produit en réponse aux peptides d'élastine dans les fibroblastes âgés comparativement aux jeunes et aux adultes. L'inhibition par le Dana confirme l'implication de la sous-unité Neu-1 dans la production de LacCer médiée par les peptides d'élastine. Nos résultats suggèrent donc que le découplage du CRE est dû à la perte de la capacité des peptides d'élastine à réguler la production de LacCer dépendant de l'activité sialidase de Neu-1.

Cette hypothèse a plusieurs conséquences. LacCer est un second messager capable d'activer diverses fonctions biologiques telles que l'activation de la voie ERK1/2 (Bhunia et al., 1998). Ainsi, son augmentation dérégulée au cours du vieillissement pourrait expliquer en partie l'augmentation de l'activation d'ERK1/2 et de la sécrétion de la MMP-1 subséquente observée avec l'âge dans cette étude. Les modifications observées dans la capacité de production du LacCer par les EDP et le découplage en découlant pourraient également expliquer pourquoi les effets bénéfiques des peptides d'élastine sont limités aux individus jeunes comme il l'a été démontré pour leurs effets cardioprotecteurs (Robinet et al., 2007).

De plus, la sous-unité Neu-1 est impliquée dans l'élastogenèse. En effet, elle participe à la désialylation des microfibrilles (Hinek et al., 2006; Tatano et al., 2006), un processus dépendant de la liaison de la tropoélastine à l'EBP. Nos résultats pourraient ainsi poser l'hypothèse selon laquelle la dérégulation de l'activité sialidase de Neu-1 au cours du l'âge pourrait en partie expliquer les difficultés à réactiver une élastogenèse efficace chez les individus âgés.

B. Perspectives

Ce travail offre de nombreuses perspectives afin de confirmer et poursuivre nos hypothèses de travail.

Nous avons démontré dans cette étude que le stroma tumoral joue un rôle essentiel dans la progression du mélanome. Par ailleurs, il semble que dans notre modèle un stroma âgé ne soit plus en mesure de favoriser la progression du mélanome *in vivo*. Dans le but de confirmer ces résultats, nous pourrions envisager d'étudier l'invasion du mélanome *in vitro* dans un modèle de co-culture, contenant par exemple des fibroblastes provenant des donneurs âgés, ou provenant de vieillissement induit ou non *in vitro,* lesquels seront mis en contact *via* un système de Transwell avec des cellules de mélanome B16F1. Ensuite, la sécrétion de protéases, l'invasion, la migration liée au chimotactisme, et la prolifération cellulaire,… pourraient être alors analysées. Ainsi, nous pourrions essayer de comprendre au travers ces expériences pourquoi le stroma âgé dans notre modèle ne favorise plus la progression du mélanome (Kim et al., 2013).

Nous avons démontré que le ciblage du CRE permet de limiter la progression du mélanome *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats démontrent clairement que la composante matricielle, représentée par les peptides d'élastine, favorise la progression de ce dernier. Ainsi il serait intéressant d'une part d'évaluer les effets des peptides d'élastine sur la formation de métastases *in vivo,* et dans un second temps d'évaluer l'influence du ciblage de CRE sur ce processus. En effet, cette étude pourrait être pertinente au vu du haut potentiel métastatique du mélanome humain. Pour cela, nous pourrions envisager d'utiliser la lignée B16F10, correspondant à des cellules de mélanome murin capable de métastaser (Hamsa and Kuttan, 2011; Siveen and Kuttan, 2013). La formation de métastases pulmonaires pourrait être ainsi suivie par scanner MicroCT (Chang et al., 2006) et l'influence du ciblage du CRE sur ce processus pourrait être évaluée.

Nous avons utilisé le Dana, un inhibiteur compétitif non sélectif des sialidases dans le but d'inhiber la sous-unité Neu-1 responsable de la transduction du signal médiée par les peptides d'élastine. En effet, cet inhibiteur a déjà démontré son efficacité auparavant dans d'autres études (Duca et al., 2007; Robinet et al., 2007). Cependant, comme nous l'avons précédemment décrit le Dana n'est pas un inhibiteur spécifique. Pour palier à ceci, il a été récemment démontré que l'Oseltamivir phosphate (Roche, nommé également « Tamiflu »), un agent antigrippal utilisé contre la grippe H1N1, est capable d'inhiber spécifiquement la neuraminidase-1 (Hata et al., 2008). Cette approche permettant de ne cibler que cette dernière pourrait donc être

envisagée. Par ailleurs, de plus en plus d'études démontrent l'utilisation du « Tamiflu » comme agent anti-cancéreux contre certains types de cancers (O'Shea et al., 2014), suggérant que cette approche est pertinente et prometteuse. Dans ce sens, nous avons réalisé des expériences préliminaires *in vitro* démontrant l'impact du « Tamiflu » sur les effets des peptides d'élastine sur les cellules de mélanome B16F1. Ainsi, nous observons une diminution de la prolifération cellulaire médiée par les peptides d'élastine en présence de « Tamiflu ». Des résultats similaires ont été obtenus sur la migration cellulaire, démontrant que le « Tamiflu » inhibe la migration médiée par les peptides d'élastine. Ces premiers résultats sont très encourageants quant à l'utilisation du « Tamiflu » pour lutter efficacement contre les effets des peptides d'élastine dans la progression du mélanome.

Nous avons également démontré que le Dana est capable de moduler l'angiogenèse tumorale et normale *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. L'activité sialidase de Neu-1 est impliquée dans la trans-activation d'autres récepteurs pouvant être impliqués notamment dans l'angiogenèse (Hinek et al., 2008; Lee et al., 2014a). Parmi eux, nous retrouvons les récepteurs CD31 et PDGFR régulés au niveau de leur sialylation par Neu-1. Afin de confirmer, notre hypothèse d'un rôle potentiel du Dana dans la mise en place d'une normalisation vasculaire, nous pourrions envisager plusieurs expériences. Dans un premier temps, il semble impératif de démontrer que dans nos modèles nous observons une interaction entre Neu-1 et les deux récepteurs CD31 et PDGFR impliqués dans le processus d'angiogenèse et potentiellement régulés par cette sialidase. Pour cela, des expériences de split ubiquitine pourraient être envisagées. Cette méthodologie a été importée récemment au sein du laboratoire et permet de démontrer une intéraction directe entre deux molécules (Bashline and Gu, 2015) contrairement à l'immunoprécipitation où une tierce molécule pourrait être engagée dans l'interaction. D'autre part, nous pourrions étudier le niveau de sialylation de ces deux récepteurs en présence ou non de Dana permettant de confirmer l'implication de Neu-1 dans leur régulation. Nous pourrions également étudier les médiateurs issus de l'activation de ces deux récepteurs en présence ou non de Dana afin de confirmer que la sous-unité Neu-1 est capable de moduler l'activation de ces récepteurs et de leurs fonctions biologiques. Dans un second temps, nous pourrions étudier plus en détail l'angiogenèse tumorale mise en place dans les tumeurs traitées avec du Dana. En effet, nous pourrions rechercher une amélioration de la perfusion des vaisseaux, de leur maturation, une diminution de l'hypoxie au profit d'une réoxygénation de la tumeur,… par des études d'immunnohistochimies en utilisant des marqueurs spécifiques (α-SMA, desmine, CD31, Ki67, PDGFR,…), ou des sondes fluorescentes permettant de visualiser la perfusion des

vaisseaux (lectin-FITC), de mesurer leur taille, ou encore de rechercher des zones hypoxiques dans les tumeurs avec un marqueur spécifique (HIF-α,…). Ce type d'expériences est couramment utilisé pour démontrer la mise en place d'une normalisation vasculaire (Helfrich et al., 2010; Mazzone et al., 2009). Ces travaux pourraient permettre de démontrer et d'expliquer l'efficacité du traitement avec le Dana sur la croissance tumorale malgré une angiogenèse améliorée.

Nous avons utilisé des outils bio-informatiques tels que le docking et la dynamique moléculaire afin de prédire et d'étudier l'interaction entre les peptides V14 et VGVAPG dans le but d'utiliser le V14 comme antagoniste de l'EBP. Ces résultats offrent de nombreuses perspectives de travail. Dans le but de confirmer que le V14 peut jouer le rôle d'inhibiteur compétitif vis à vis de l'EBP, nous pourrions réaliser des expériences de bio-informatique pour déterminer la fiabilité de l'interaction VGVAPG-EBP et V14-VGVAPG. Ces travaux permettraient d'optimiser *in silico* les propriétés d'inhibition compétitive du V14. De plus, au cours de l'étude de la stabilité du complexe par dynamique moléculaire, nous avons observé des profils biphasiques entre le V14-VGVAPG et le V14 fixe-VGVAPG. Ces profils montrent essentiellement de grandes fluctuations entre les molécules pendant la deuxième moitié du temps de simulation. Ainsi, il serait intéressant d'analyser comment les deux molécules interagissent entre elles au cours des 100 premières ns, puis dans un second temps au cours des 100 dernières. Ces observations permettraient d'expliquer et de comprendre les grandes fluctuations observées dans ces deux systèmes, bien que l'on suppose qu'elles sont essentiellement dues à la grande flexibilité des deux molécules. D'autre part, nous pourrions envisager d'améliorer l'interaction entre le V14 et le VGVAPG en designant de nouvelles molécules issues du peptide V14 afin de développer de nouveaux antagonistes de l'EBP. Les outils de bio-informatiques présentent la particularité de pouvoir prédire ce genre d'expérience relativement rapidement et de permettre de screener de nouveaux candidats. Les résultats obtenus avec le V14 fixe démontrent qu'il présente une meilleure interaction que le V14 libre. Ce peptide fixe pourrait être l'un des premiers candidats à tester. Ainsi, nous pourrions envisager de fixer la structure du V14 en le cyclisant par deux cystéines reliées entre elles par un pont disulfure. Par conséquent, ce V14c-c pourrait présenter les mêmes caractéristiques intéressantes que ce que l'on a obtenu au cours de l'étude de l'interaction V14-Fixe-VGVAPG (fixé artificiellement).

Une autre approche intéressante serait de partir de la séquence du V14 et de trouver la séquence inhibitrice minimale en utilisant les outils de bio-informatiques. En effet, nous savons

que plus une séquence est petite moins elle sera sujette à la dégradation par les protéases et plus elle sera pénétrante au sein des tissus. Il est essentiel de tenir compte de ces caractéristiques dans le design de nouveaux agents thérapeutiques. Les données de la littérature ainsi que nos résultats démontrent que la séquence QDEA du peptide V14 joue un rôle central dans l'interaction du V14 au peptide VGVAPG. Nous pourrions envisager de réduire la séquence du V14 par bio-informatique acide aminé par acide aminé et d'évaluer les capacités de ces peptides à interagir avec le VGVAPG par des méthodes de docking moléculaire. Il faudrait par la suite confirmer ces interactions par des analyses de dynamique moléculaire. Dans ce sens, nous avons réalisé des études préliminaire *in vitro,* et nous démontrons qu'il est possible de réduire la séquence du V14 tout en conservant ses capacités à antagoniser les peptides d'élastine sur la prolifération des cellules de mélanome B16F1.

Nous montrons, que ce soit par l'inhibition de la sous-unité de l'EBP ou de la sous-unité Neu-1, que le ciblage thérapeutique du CRE limite la progression du mélanome murin *in vitro* et *in vivo.* Il serait tout aussi intéressant et pertinent, d'étudier cette stratégie sur le développement du mélanome humain, en utilisant des lignées de mélanome humaines telles que les cellules SK-MEL28 ou HT-144, couramment utilisées. Par ailleurs, cette approche pourrait être validée par des études de développement tumoral *in vitro,* mais également *in vivo* utilisant la méthode de xénogreffes sur souris *nude*. Ces travaux permettraient de confirmer les résultats obtenus sur modèle murin dans un modèle humain et ainsi d'extrapoler nos résultats à l'homme, ce qui pourrait être pertinent d'un point de vue clinique.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons démontré que le découplage du CRE avec l'âge implique la composante lipidique et une activité sialidase basale accrue de la neuraminidase-1. Il a été montré dans la littérature que non seulement la quantité du ganglioside GM_3 augmente avec l'âge mais également que son type change. En effet, Riboni et ses collaborateurs ont démontré que les espèces du ganglioside GM_3 contenant de courtes chaînes d'acide gras C16:C18 augmentent avec l'âge alors que celles à longues chaînes d'acide gras C22:C24 diminuent (Riboni et al., 1992). Par ailleurs, Sonnino et ses collaborateurs ont démontré que la bioactivité du LacCer produit issu de la conversion du ganglioside GM_3 est dépendante de la taille des chaînes d'acide gras que celui-ci contient. En effet, seul le LacCer provenant d'un ganglioside GM_3 à longues chaines d'acide gras C22:C24 démontre des propriétés biologiques *in vitro* (Sonnino et al., 2009). Sachant cela, nous pouvons ainsi supposer que non seulement la quantité de LacCer produit peut expliquer le découplage du CRE avec l'âge au travers une saturation de l'activité sialidase de Neu1, mais également le type de LacCer

produit. En effet, si l'on se réfère aux données de la littérature nous pourrions envisager que le LacCer produit chez des sujets âgés ne soit plus en mesure de transduire un message intracellulaire. Il serait donc intéressant de valider ces hypothèses en étudiant le type des gangliosides GM_3 présents au cours du vieillissement et de les corréler au type de LacCer produits en présence ou non de peptides d'élastine. Ce travail pourrait être réalisé en utilisant des outils analytiques tels que l'HPLC, la chromatographie en gazeuse et les chromatographie sur couche mince (Iwamori et al., 1985; Kadowaki and Grant, 1994; Kadowaki et al., 1984; Sonnino et al., 1984).

En conclusion, l'ensemble de ces travaux ont permis de démontrer que le ciblage thérapeutique du CRE permet de limiter la progression du mélanome et d'envisager de nouveaux traitements pour lutter contre le mélanome, qui, aujourd'hui encore, est un cancer pour lequel nous ne disposons pas d'un arsenal thérapeutique efficient.

Annexes

VI. Annexes

Annexe 1 :

Lot 2 d'avril 2014			
Acides aminés	**Concentration en µmol/L**		**Résidus/1000**
Acide cystéique			
Acide aspartique	231		5.8
Hydroxyproline	448		11.3
Thréonine	336		8.5
Sérine	305		7.7
Acide glutamique	588		14.9
Proline	**4641**		**117.4**
Glycine	**13314**		**336.9**
Alanine	**9261**		**234.3**
Valine	**5103**		**129.1**
Isoleucine	966		24.4
Leucine	2373		60.0
Tyrosine	280		7.1
Phénylalanine	1234		31.2
Hydroxylysine	0		0.0
Ornithine	23		0.6
Lysine	210		5.3
Histidine	21		0.5
Arginine	189		4.8
Total	39523		1000
Présence d'acide cystéique, desmosine et isodesmosine			
Lot 3 d'avril 2014			
Acides aminés	Concentration en µmol/L		Résidus/1000
Acide cystéique			
Acide aspartique	162		5.7
Hydroxyproline	324		11.5
Thréonine	229		8.1
Sérine	227		8.0
Acide glutamique	458		16.2
Proline	**3336**		**118.1**
Glycine	**9261**		**327.8**
Alanine	**6336**		**224.3**
Valine	**4096**		**145.0**
Isoleucine	759		26.9
Leucine	1617		57.2
Tyrosine	229		8.1
Phénylalanine	893		31.6
Hydroxylysine	0		0.0
Ornithine	16		0.6
Lysine	147		5.2
Histidine	13		0.5
Arginine	146		5.2
Total	28249		1000
Présence d'acide cystéique, desmosine et isodesmosine			

Communications

VII. Communications

❖ Communications orales :

▪ Nationales :

- XXIIIème réunion annuelle de la société Francaise de la Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMc) (mars 2015, Lyon, France) : **Molecular modelling and numerial simulations of extracellular matrix : what could be learned about the structure/function/dynamic relationship ?** Baud S., Belloy N., Jonquet J., Guillot A., Haschka T., Jeanne A., Lambert E., Scandolera A., Vasseur R., Verzeaux L., Martiny L., Dauchez M.

- Journée des Jeunes Chercheurs 2013 (Reims, Mars 2013) : **Etude de l'interaction peptides d'élastine – EBP (Elasting Binding Protein) et design d'antagonistes à visée pharmacologique**. Scandolera A1, Blanchevoye C., Floquet N., Baud S., Maurice P., Bocquet O., Blaise S., Ghoneim C., Cantarelli B., Delacoux F., Dauchez M., Efremov RG., Martiny L., Duca L., Debelle L.

▪ Internationales :

- 8 th European Elastin Meeting (Toulouse, September, 2014) : **A new therapeutic strategy based on matrix modulation in melanoma development**. Scandolera A., Devy J., Carlier A., Routhier J., Maurice P., Blaise S., Romier-Crouzet B., El Btaouri H., Martiny L., Debelle L. And Duca L.

- XXIX LIAC Meeting on Vascular Research (Italy, September 2013): **Elastin peptides and tumoral angiogenesis: impact of NEU-1 inhibition**. Scandolera A., Devy J., Carlier A., Routhier J., Martiny L., Debelle L. And Duca L.

❖ Communications écrites :

o Nationales :

- XXIIème réunion annuelle de la société Francaise de la Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMc) (mai 2014, Limoges, France). **Impact de**

l'inhibition de Neu-1 sur le développement tumoral et l'angiogenèse induits par les peptides d'élastine. Scandolera A., Devy J., Carlier A., Routhier J., Maurice P., Blaise S., Romier-Crouzet B., El Btaouri H., Martiny L., Debelle L. And Duca L.

- Prix de la meilleure communication affichée au cours du congrès de la SFBMc 2014

- Journée des jeunes chercheurs 2014 (mars 2014, Amiens, France. **Impact de l'inhibition de Neu-1 sur le développement tumoral et l'angiogenèse induits par les peptides d'élastine.** Scandolera A., Devy J., Carlier A., Routhier J., Maurice P., Blaise S., Romier-Crouzet B., El Btaouri H., Martiny L., Debelle L. And Duca L.

- 7ème Forum Cancéropole Grand Est (Strasbourg, novembre 2013) : **Elastin peptides and melanoma development : Impact of NEU-1 inhibition.** Scandolera A., Devy J., Carlier A., Routhier J., Martiny L., Debelle L. And Duca L.

❖ **Publications :**

o **Uncoupling of Elastin Complex Receptor during *in vitro* aging is related to modifications in its intrinsic Sialidase activity and The subsequent Lactosylceramide Production.** Scandolera A, Rabenoelina F, Maurice P, Blaise S, Romier-Crouzet B, El Btaouri H, Martiny L, Debelle L, Duca L. Soumis à PLOS ONE.

o **Calcium signaling pathway, cellular dynamics and extracellular matrix remodeling caused by elastin and microfibrills fragments in human endothelial cells**. Ghandour Z, Huber P, Gulino D, Scandolera A, Duca L, Debelle L, Weiss AS, Kielty CM, Baldock C, Godin-Ribuot D, Faury G. En cours de rédaction.

o En remerciement pour aide technique: **Fhit regulates EMT targets through an EGFR/Src/ERK/Slug signaling axis in human bronchial Cells**. (2014), 12(5):775-83, Mol Cancer Res

o **Interaction between the elastin peptide VGVAPG and Human Elastin Binding Protein**. C. Blanchevoye, N. Floquet, A. Scandolera, S. Baud, P. Maurice, O. Bocquet, S. Blaise, C. Ghoneim,B Cantarelli, F. Delaoux, M. Dauchez, RG. Efremov, L. Martiny, L. Duca and L. Debelle. The Journal of Biological Chemistry, 2013.

o **Elastin-derived peptides enhance melanoma growth in vivo by upregulating the activation of MCol-A (MMP-1) collagenase**. J. Devy, L. Duca, B. Cantarelli, D. Joseph-Pietras, A. Scandolera, A. Rusciani, L. Parent, J. Thevenard, S. Brassart Pasco, M. Tarpin L. Martiny and L. Debelle. British Journal of Cancer, 2010.

Références bibliographiques

VIII. Références bibliographiques

Adolphe M et Barlovatz-Meimon G (1988). Culture de fibroblastes. In Culture de Cellules Animales, Méthodologies et Applications, pp. 141–142.

Aikawa, E., Aikawa, M., Libby, P., Figueiredo, J.-L., Rusanescu, G., Iwamoto, Y., Fukuda, D., Kohler, R.H., Shi, G.-P., Jaffer, F.A., et al. (2009). Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease. Circulation *119*, 1785–1794.

Akhtar, N., Dickerson, E.B., and Auerbach, R. (2002a). The sponge/Matrigel angiogenesis assay. Angiogenesis *5*, 75–80.

Akhtar, N., Dickerson, E.B., and Auerbach, R. (2002b). The sponge/Matrigel angiogenesis assay. Angiogenesis *5*, 75–80.

Alghamdi, F., Guo, M., Abdulkhalek, S., Crawford, N., Amith, S.R., and Szewczuk, M.R. (2014). A novel insulin receptor-signaling platform and its link to insulin resistance and type 2 diabetes. Cell. Signal. *26*, 1355–1368.

Allende, M.L., and Proia, R.L. (2002). Lubricating cell signaling pathways with gangliosides. Curr. Opin. Struct. Biol. *12*, 587–592.

Allende, M.L., Li, J., Darling, D.S., Worth, C.A., and Young, W.W. (2000). Evidence supporting a late Golgi location for lactosylceramide to ganglioside GM3 conversion. Glycobiology *10*, 1025–1032.

Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., Eriksson, U., and Pietras, K. (2009). Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. Cancer Res. *69*, 369–378.

Andreassi, L., Flori, M.L., and Rubegni, P. (1999). Sun and skin. Role of phototype and skin colour. Adv. Exp. Med. Biol. *455*, 469–475.

Anisimov, V.N. (2007). Biology of aging and cancer. Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent. *14*, 23–31.

Antonicelli, F., Bellon, G., Debelle, L., and Hornebeck, W. (2007). Elastin-Elastases and Inflamm-Aging. Curr. Top. Dev. Biol. *79*, 99–155.

Antonicelli, F., Bellon, G., Lorimier, S., and Hornebeck, W. (2009). Role of the elastin receptor complex (S-Gal/Cath-A/Neu-1) in skin repair and regeneration. Wound Repair Regen. *17*, 631–638.

Argraves, W.S., Greene, L.M., Cooley, M.A., and Gallagher, W.M. (2003). Fibulins: physiological and disease perspectives. EMBO Rep. *4*, 1127–1131.

Argüeso, P., and Panjwani, N. (2011). Focus on molecules: galectin-3. Exp. Eye Res. *92*, 2–3.

Attia-Vigneau, J., Terryn, C., Lorimier, S., Sandre, J., Antonicelli, F., and Hornebeck, W. (2014). Regeneration of human dermis by a multi-headed peptide. J. Invest. Dermatol. *134*, 58–67.

Ben-Av, P., Crofford, L.J., Wilder, R.L., and Hla, T. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. FEBS Lett. *372*, 83–87.

Azevedo, R.A., Carvalho, H.F., and de Brito-Gitirana, L. (2007). Hyaluronan in the epidermal and the dermal extracellular matrix: its role in cutaneous hydric balance and integrity of anuran integument. Micron Oxf. Engl. 1993 *38*, 607–610.

Baccarani-Contri, M., Vincenzi, D., Cicchetti, F., Mori, G., and Pasquali-Ronchetti, I. (1990). Immunocytochemical localization of proteoglycans within normal elastin fibers. Eur. J. Cell Biol. *53*, 305–312.

Bala, K., Ambwani, K., and Gohil, N.K. (2011). Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: implication on use of higher passage cells. Tissue Cell *43*, 216–222.

Baranek, T., Debret, R., Antonicelli, F., Lamkhioued, B., Belaaouaj, A., Hornebeck, W., Bernard, P., Guenounou, M., and Le Naour, R. (2007). Elastin Receptor (Spliced Galactosidase) Occupancy by Elastin Peptides Counteracts Proinflammatory Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes through NF-κB Down-Regulation. J. Immunol. *179*, 6184–6192.

Bashir, M.M., Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Rosenbloom, J.C., Abrams, W., Fazio, M., Uitto, J., and Rosenbloom, J. (1989). Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. J. Biol. Chem. *264*, 8887–8891.

Bashline, L., and Gu, Y. (2015). Using the split-ubiquitin yeast two-hybrid system to test protein-protein interactions of transmembrane proteins. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1242*, 143–158.

Bax, D.V., Rodgers, U.R., Bilek, M.M.M., and Weiss, A.S. (2009). Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRK motif and integrin alphaVbeta3. J. Biol. Chem. *284*, 28616–28623.

Begley, L.A., Kasina, S., MacDonald, J., and Macoska, J.A. (2008). The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. Cytokine *43*, 194–199.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jougla, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. Rev. Dépidémiologie Santé Publique *56*, 159–175.

Benbow, U., Schoenermark, M.P., Mitchell, T.I., Rutter, J.L., Shimokawa, K., Nagase, H., and Brinckerhoff, C.E. (1999). A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. J. Biol. Chem. *274*, 25371–25378.

Berking, C., Takemoto, R., Schaider, H., Showe, L., Satyamoorthy, K., Robbins, P., and Herlyn, M. (2001). Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling. Cancer Res. *61*, 8306–8316.

Berneburg, M., and Krutmann, J. (1998). Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. J. Invest. Dermatol. *111*, 709–710.

Bhunia, A.K., Arai, T., Bulkley, G., and Chatterjee, S. (1998). Lactosylceramide mediates tumor necrosis factor-alpha-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and the adhesion of neutrophil in human umbilical vein endothelial cells. J. Biol. Chem. *273*, 34349–34357.

Blaise, S., Romier, B., Kawecki, C., Ghirardi, M., Rabenoelina, F., Baud, S., Duca, L., Maurice, P., Heinz, A., Schmelzer, C.E.H., et al. (2013). Elastin-derived peptides are new regulators of insulin resistance development in mice. Diabetes *62*, 3807–3816.

Blanchevoye, C., Floquet, N., Scandolera, A., Baud, S., Maurice, P., Bocquet, O., Blaise, S., Ghoneim, C., Cantarelli, B., Delacoux, F., et al. (2013). Interaction between the Elastin Peptide VGVAPG and Human Elastin Binding Protein. J. Biol. Chem. *288*, 1317–1328.

Blood, C.H., Sasse, J., Brodt, P., and Zetter, B.R. (1988). Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. J. Cell Biol. *107*, 1987–1993.

Bodey, B., Bodey, B., Siegel, S.E., and Kaiser, H.E. (2001). Matrix metalloproteinase expression in malignant melanomas: tumor-extracellular matrix interactions in invasion and metastasis. Vivo Athens Greece *15*, 57–64.

Bonten, E.J., Campos, Y., Zaitsev, V., Nourse, A., Waddell, B., Lewis, W., Taylor, G., and d' Azzo, A. (2009a). Heterodimerization of the sialidase NEU1 with the chaperone protective protein/cathepsin A prevents its premature oligomerization. J. Biol. Chem. *284*, 28430–28441.

.

Boonkitticharoen, V., Kulapaditharom, B., Leopairut, J., Kraiphibul, P., Larbcharoensub, N., Cheewaruangroj, W., Chintrakarn, C., and Pochanukul, L. (2008). Vascular endothelial growth factor a and proliferation marker in prediction of lymph node metastasis in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. *134*, 1305–1311.

Boudier, C., Holle, C., and Bieth, J.G. (1981). Stimulation of the elastolytic activity of leukocyte elastase by leukocyte cathepsin G. J. Biol. Chem. *256*, 10256–10258.

Boyd, C.D., Christiano, A.M., Pierce, R.A., Stolle, C.A., and Deak, S.B. (1991). Mammalian tropoelastin: multiple domains of the protein define an evolutionarily divergent amino acid sequence. Matrix Stuttg. Ger. *11*, 235–241.

Brassart, B., Fuchs, P., Huet, E., Alix, A.J.P., Wallach, J., Tamburro, A.M., Delacoux, F., Haye, B., Emonard, H., and Hornebeck, W. (2001). Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. J. Biol. Chem. *276*, 5222–5227.

Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K.C., Bhagavathula, N., Kang, S., Fisher, G.J., Varani, J., and Voorhees, J.J. (2003). Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme

responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. Photochem. Photobiol. *78*, 43–48.

Bressan, G.M., Daga-Gordini, D., Colombatti, A., Castellani, I., Marigo, V., and Volpin, D. (1993). Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. J. Cell Biol. *121*, 201–212.

Brilla, C.G., Maisch, B., and Weber, K.T. (1992). Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension. Eur. Heart J. *13 Suppl D*, 24–32.

Brown, P.L., Mecham, L., Tisdale, C., and Mecham, R.P. (1992). The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket. Biochem. Biophys. Res. Commun. *186*, 549–555.

Brown-Augsburger, P., Tisdale, C., Broekelmann, T., Sloan, C., and Mecham, R.P. (1995). Identification of an elastin cross-linking domain that joins three peptide chains. Possible role in nucleated assembly. J. Biol. Chem. *270*, 17778–17783.

Brown-Augsburger, P., Broekelmann, T., Rosenbloom, J., and Mecham, R.P. (1996). Functional domains on elastin and microfibril-associated glycoprotein involved in elastic fibre assembly. Biochem. J. *318 (Pt 1)*, 149–155.

Brychtova, S., Bezdekova, M., Brychta, T., and Tichy, M. (2008). The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. Neoplasma *55*, 273–279.

Byzova, T.V., Rabbani, R., D'Souza, S.E., and Plow, E.F. (1998). Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology. Thromb. Haemost. *80*, 726–734.

Callahan, J.W. (1999). Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure–function studies of lysosomal β-galactosidase and the non-lysosomal β-galactosidase-like protein. Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Basis Dis. *1455*, 85–103.

Cerniglia, G.J., Pore, N., Tsai, J.H., Schultz, S., Mick, R., Choe, R., Xing, X., Durduran, T., Yodh, A.G., Evans, S.M., et al. (2009). Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the microenvironment by vascular normalization to improve chemotherapy and radiotherapy efficacy. PloS One *4*, e6539.

Chang, C.-H., Jan, M.-L., Fan, K.-H., Wang, H.-E., Tsai, T.-H., Chen, C.-F., Fu, Y.-K., and Lee, T.-W. (2006). Longitudinal evaluation of tumor metastasis by an FDG-microPet/microCT dual-imaging modality in a lung carcinoma-bearing mouse model. Anticancer Res. *26*, 159–166.

Chatron-Colliet, A., Lalun, N., Terryn, C., Kurdykowski, S., Lorenzato, M., Rusciani, A., Ploton, D., Duca, L., and Bobichon, H. (2014). The elastin peptide (VGVAPG)3 induces the 3D reorganisation of PML-NBs and SC35 speckles architecture, and accelerates proliferation of fibroblasts and melanoma cells. Histochem. Cell Biol. 245-258

Chen, H., Li, Y., and Tollefsbol, T.O. (2013). Cell Senescence Culturing Methods. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1048, 1-10*.

Cheresh, D.A., and Mecham, R.P. (1994). Integrins : molecular and biological responses to the extracellular matrix (San Diego: Academic press).

Chimal-Ramírez, G.K., Espinoza-Sánchez, N.A., Utrera-Barillas, D., Benítez-Bribiesca, L., Velázquez, J.R., Arriaga-Pizano, L.A., Monroy-García, A., Reyes-Maldonado, E., Domínguez-López, M.L., Piña-Sánchez, P., et al. (2013). MMP1, MMP9, and COX2 expressions in promonocytes are induced by breast cancer cells and correlate with collagen degradation, transformation-like morphological changes in MCF-10A acini, and tumor aggressiveness. BioMed Res. Int. *2013*, 279505.

Choi, J., Bergdahl, A., Zheng, Q., Starcher, B., Yanagisawa, H., and Davis, E.C. (2009). Analysis of dermal elastic fibers in the absence of fibulin-5 reveals potential roles for fibulin-5 in elastic fiber assembly. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *28*, 211–220.

Chuaire-Noack, L., Rondón-Lagos, S., Sánchez-Corredor, M., Ibáñez-Pinilla, M., and Ramírez-Clavijo, S. (2010). [Beta-galactosidase activity as a marker of senescence in primary cultures of the ovarian surface epithelium]. Investig. Clínica *51*, 351–367.

Claffey, K.P., Brown, L.F., del Aguila, L.F., Tognazzi, K., Yeo, K.T., Manseau, E.J., and Dvorak, H.F. (1996). Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. Cancer Res. *56*, 172–181.

Clark, W.H., Ainsworth, A.M., Bernardino, E.A., Yang, C.H., Mihm, C.M., and Reed, R.J. (1975). The developmental biology of primary human malignant melanomas. Semin. Oncol. *2*, 83–103.

Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.N., Greene, M.H., and Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Hum. Pathol. *15*, 1147–1165.

Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., and Halpern, A.C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. J. Natl. Cancer Inst. *81*, 1893–1904.

Clarke, A.W., and Weiss, A.S. (2004). Microfibril-associated glycoprotein-1 binding to tropoelastin: multiple binding sites and the role of divalent cations. Eur. J. Biochem. FEBS *271*, 3085–3090.

Clarke, A.W., Arnspang, E.C., Mithieux, S.M., Korkmaz, E., Braet, F., and Weiss, A.S. (2006). Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. Biochemistry (Mosc.) *45*, 9989–9996.

Colombatti, A., Doliana, R., Bot, S., Canton, A., Mongiat, M., Mungiguerra, G., Paron-Cilli, S., and Spessotto, P. (2000). The EMILIN protein family. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *19*, 289–301.

Conn, K.J., Rich, C.B., Jensen, D.E., Fontanilla, M.R., Bashir, M.M., Rosenbloom, J., and Foster, J.A. (1996). Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene through a putative retinoblastoma control element. A role for Sp3 acting as a repressor of elastin gene transcription. J. Biol. Chem. *271*, 28853–28860.

Corson, G.M., Charbonneau, N.L., Keene, D.R., and Sakai, L.Y. (2004). Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. Genomics *83*, 461–472.

Cronjé, P. (2000). Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth, and Reproduction (CABI).

Culav, E.M., Clark, C.H., and Merrilees, M.J. (1999). Connective Tissues: Matrix Composition and Its Relevance to. Phys. Ther. *79*, 308–319.

D'Agrosa, R.M., and Callahan, J.W. (1988). In vitro activation of neuraminidase in the β-galactosidase-neuraminidase-protective protein complex by cathepsin C. Biochem. Biophys. Res. Commun. *157*, 770–775.

Dasgupta, J., Kar, S., Liu, R., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Remington, S.J., Chen, C., Melendez, J.A., Dasgupta, J., Kar, S., et al. (2010). Reactive oxygen species control senescence-associated matrix metalloproteinase-1 through c-Jun-N-terminal kinase, Reactive oxygen species control senescence-associated matrix metalloproteinase-1 through c-Jun-N-terminal kinase. J. Cell. Physiol. J. Cell. Physiol. *225*, *225*, 52, 52–62, 62.

Davis, M.R., and Summers, K.M. (2012). Structure and function of the mammalian fibrillin gene family: implications for human connective tissue diseases. Mol. Genet. Metab. *107*, 635–647.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-βgal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. Nat. Protoc. *4*, 1798–1806.

Debelle, L., and Alix, A.J. (1999). The structures of elastins and their function. Biochimie *81*, 981–994.

Debelle, L., and Tamburro, A.M. (1999). Elastin: molecular description and function. Int. J. Biochem. Cell Biol. *31*, 261–272.

Degterev, A., and Foster, J.A. (1999). The role of NF-1 factors in regulation of elastin gene transcription. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *18*, 295–307.

Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., and Berendsen, H.J.C. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. J. Comput. Chem. *26*, 1701–1718.

Devy, J., Duca, L., Cantarelli, B., Joseph-Pietras, D., Scandolera, A., Rusciani, A., Parent, L., Thevenard, J., Pasco, S.B., Tarpin, M., et al. (2010). Elastin-derived peptides enhance melanoma growth in vivo by upregulating the activation of Mcol-A (MMP-1) collagenase. Br. J. Cancer *103*, 1562–1570.

Dietz, H.C., and Pyeritz, R.E. (1995). Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. Hum. Mol. Genet. *4*, 1799–1809.

Doliana, R., Mongiat, M., Bucciotti, F., Giacomello, E., Deutzmann, R., Volpin, D., Bressan, G.M., and Colombatti, A. (1999). EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. J. Biol. Chem. *274*, 16773–16781.

Dong, J., Phelps, R.G., Qiao, R., Yao, S., Benard, O., Ronai, Z., and Aaronson, S.A. (2003). BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. Cancer Res. *63*, 3883–3885.

Dong, K.K., Damaghi, N., Picart, S.D., Markova, N.G., Obayashi, K., Okano, Y., Masaki, H., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Smiles, K.A., et al. (2008). UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin. Exp. Dermatol. *17*, 1037–1044.

Duca, L., Debelle, L., Debret, R., Antonicelli, F., Hornebeck, W., and Haye, B. (2002). The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. FEBS Lett. *524*, 193–198.

Duca, L., Floquet, N., Alix, A.J.P., Haye, B., and Debelle, L. (2004). Elastin as a matrikine. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *49*, 235–244.

Duca, L., Lambert, E., Debret, R., Rothhut, B., Blanchevoye, C., Delacoux, F., Hornebeck, W., Martiny, L., and Debelle, L. (2005). Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110γ/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. Mol. Pharmacol. *67*, 1315–1324.

Duca, L., Blanchevoye, C., Cantarelli, B., Ghoneim, C., Dedieu, S., Delacoux, F., Hornebeck, W., Hinek, A., Martiny, L., and Debelle, L. (2007). The Elastin Receptor Complex Transduces Signals through the Catalytic Activity of Its Neu-1 Subunit. J. Biol. Chem. *282*, 12484–12491.

Epstein, E.H., and Munderloh, N.H. (1978). Human skin collagen. Presence of type I and type III at all levels of the dermis. J. Biol. Chem. *253*, 1336–1337.

Erhard, H., Rietveld, F.J., van Altena, M.C., Bröcker, E.B., Ruiter, D.J., and de Waal, R.M. (1997). Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. Melanoma Res. *7 Suppl 2*, S19–S26.

Fahem, A., Robinet, A., Cauchard, J.H., Duca, L., Soula-Rothhut, M., Rothhut, B., Soria, C., Guenounou, M., Hornebeck, W., and Bellon, G. (2008). Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by nitric oxide in endothelial cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. *40*, 1581–1596.

Faury, G., Chabaud, A., Ristori, M.T., Robert, L., and Verdetti, J. (1997a). Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides. Mech. Ageing Dev. *95*, 31–42.

Faury, G., Usson, Y., Robert-Nicoud, M., Robert, L., and Verdetti, J. (1998). Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *95*, 2967–2972.

Fazio, M.J., Kähäri, V.M., Bashir, M.M., Saitta, B., Rosenbloom, J., and Uitto, J. (1990). Regulation of elastin gene expression: evidence for functional promoter activity in the 5'-flanking region of the human gene. J. Invest. Dermatol. *94*, 191–196.

Fazio, M.J., Mattei, M.G., Passage, E., Chu, M.L., Black, D., Solomon, E., Davidson, J.M., and Uitto, J. (1991). Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. Am. J. Hum. Genet. *48*, 696.

Feinmesser, M., Schachter, J.M., Tobar, A., Sulkes, J., Gutman, H., Kruk, N., and Okon, E. (2002). Relationship of tumorigenic malignant melanomas to dermal elastin: an expression of tumor/stromal interaction that may be related to prognosis. Am. J. Dermatopathol. *24*, 108–117.

Fensterle, J., Becker, J.C., Potapenko, T., Heimbach, V., Vetter, C.S., Brocker, E.B., and Rapp, U.R. (2004). B-Raf specific antibody responses in melanoma patients. BMC Cancer *4*, 62.

Fermin Lee, A., Chen, H.-Y., Wan, L., Wu, S.-Y., Yu, J.-S., Huang, A.C., Miaw, S.-C., Hsu, D.K., Wu-Hsieh, B.A., and Liu, F.-T. (2013). Galectin-3 modulates Th17 responses by regulating dendritic cell cytokines. Am. J. Pathol. *183*, 1209–1222.

Fisher, G.J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., and Voorhees, J.J. (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch. Dermatol. *138*, 1462–1470.

Fisher, G.J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Cho, M.K., He, T., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J.J. (2009). Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. Am. J. Pathol. *174*, 101–114.

Folkman, J., and Hanahan, D. (1991). Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. Princess Takamatsu Symp. *22*, 339–347.

Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C.H., Herlyn, M., and Westermark, B. (1993). Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 393–397.

Fortuna-Costa, A., Gomes, A.M., Kozlowski, E.O., Stelling, M.P., and Pavão, M.S.G. (2014). Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. Front. Oncol. *4*, 138.

Fülöp, T., Varga, Z., Csongor, J., Fóris, G., and Leövey, A. (1989). Age related impairment in phosphatidylinositol breakdown of polymorphonuclear granulocytes. FEBS Lett. *245*, 249–252.

Fülöp, T., Gagné, D., Goulet, A.C., Desgeorges, S., Lacombe, G., Arcand, M., and Dupuis, G. (1999). Age-related impairment of p56lck and ZAP-70 activities in human T lymphocytes activated through the TcR/CD3 complex. Exp. Gerontol. *34*, 197–216.

Fulop, T., Khalil, A., and Larbi, A. (2011). The role of elastin peptides in modulating the immune response in aging and age-related diseases. Pathol. Biol.

Fülöp, T., Jr, Jacob, M.P., Varga, Z., Foris, G., Leövey, A., and Robert, L. (1986). Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca2+ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun. *141*, 92–98.

Fulöp, T., Jr, Douziech, N., Jacob, M.P., Hauck, M., Wallach, J., and Robert, L. (2001). Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor. Pathol. Biol. (Paris) *49*, 339–348.

Gao, X., Balan, V., Tai, G., and Raz, A. (2014). Galectin-3 induces cell migration via a calcium-sensitive MAPK/ERK1/2 pathway. Oncotarget *5*, 2077–2084.

Garrington, T.P., and Johnson, G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 211–218.

Gayral, S., Garnotel, R., Castaing-Berthou, A., Blaise, S., Fougerat, A., Berge, E., Montheil, A., Malet, N., Wymann, M.P., Maurice, P., et al. (2014). Elastin-derived peptides potentiate atherosclerosis through the immune Neu1-PI3Kγ pathway. Cardiovasc. Res.

Ghuysen-Itard, A.F., Robert, L., and Jacob, M.P. (1992). [Effect of elastin peptides on cell proliferation]. Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie *315*, 473–478.

Giavazzi, R., Sennino, B., Coltrini, D., Garofalo, A., Dossi, R., Ronca, R., Tosatti, M.P.M., and Presta, M. (2003). Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis. Am. J. Pathol. *162*, 1913–1926.

Gibson, M.A., Finnis, M.L., Kumaratilake, J.S., and Cleary, E.G. (1998). Microfibril-associated glycoprotein-2 (MAGP-2) is specifically associated with fibrillin-containing microfibrils but exhibits more restricted patterns of tissue localization and developmental expression than its structural relative MAGP-1. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *46*, 871–886.

Gibson, M.A., Leavesley, D.I., and Ashman, L.K. (1999). Microfibril-associated glycoprotein-2 specifically interacts with a range of bovine and human cell types via alphaVbeta3 integrin. J. Biol. Chem. *274*, 13060–13065.

Gilchrest, B.A., Eller, M.S., Geller, A.C., and Yaar, M. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. N. Engl. J. Med. *340*, 1341–1348.

Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. Physiol. Rev. *91*, 1071–1121.

Goel, S., Wong, A.H.-K., and Jain, R.K. (2012). Vascular Normalization as a Therapeutic Strategy for Malignant and Nonmalignant Disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *2*.

Gonzales-Castañeda, C., Rivera, V., Chirinos, A.L., Evelson, P., and Gonzales, G.F. (2011). Photoprotection against the UVB-induced oxidative stress and epidermal damage in mice using leaves of three different varieties of Lepidium meyenii (maca). Int. J. Dermatol. *50*, 928–938.

Goodsell, D.S., and Olson, A.J. (1990). Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. Proteins *8*, 195–202.

Goodson, A.G., and Grossman, D. (2009). Strategies for early melanoma detection: approaches to the patient with nevi. J. Am. Acad. Dermatol. *60*, 719–738.

Gordon, M.K., and Hahn, R.A. (2010). Collagens. Cell Tissue Res. *339*, 247–257.

Grosso, L.E., and Mecham, R.P. (1988). In vitro processing of tropoelastin: investigation of a possible transport function associated with the carboxy-terminal domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. *153*, 545–551.

Halper, J., and Kjaer, M. (2014). Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. Adv. Exp. Med. Biol. *802*, 31–47.

Hämäläinen, E.R., Kemppainen, R., Pihlajaniemi, T., and Kivirikko, K.I. (1993). Structure of the human lysyl oxidase gene. Genomics *17*, 544–548.

Hamsa, T., and Kuttan, G. (2011). Studies on anti-metastatic and anti-invasive effects of harmine using highly metastatic murine B16F-10 melanoma cells. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. Off. Organ Int. Soc. Environ. Toxicol. Cancer *30*, 123–137.

Hata, K., Koseki, K., Yamaguchi, K., Moriya, S., Suzuki, Y., Yingsakmongkon, S., Hirai, G., Sodeoka, M., von Itzstein, M., and Miyagi, T. (2008). Limited inhibitory effects of oseltamivir and zanamivir on human sialidases. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 3484–3491.

Hegde, U.P., Chakraborty, N., Kerr, P., and Grant-Kels, J.M. (2009). Melanoma in the elderly patient: relevance of the aging immune system. Clin. Dermatol. *27*, 537–544.

Heinig, M., and Frishman, D. (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. Nucleic Acids Res. *32*, W500–W502.

Heinz, A., Jung, M.C., Duca, L., Sippl, W., Taddese, S., Ihling, C., Rusciani, A., Jahreis, G., Weiss, A.S., Neubert, R.H.H., et al. (2010). Degradation of tropoelastin by matrix metalloproteinases--cleavage site specificities and release of matrikines. FEBS J. *277*, 1939–1956.

Heinz, A., Jung, M.C., Jahreis, G., Rusciani, A., Duca, L., Debelle, L., Weiss, A.S., Neubert, R.H.H., and Schmelzer, C.E.H. (2012). The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. Biochimie *94*, 192–202.

Helfrich, I., Scheffrahn, I., Bartling, S., Weis, J., von Felbert, V., Middleton, M., Kato, M., Ergün, S., Augustin, H.G., and Schadendorf, D. (2010). Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. J. Exp. Med. *207*, 491–503.

Hellberg, C., Ostman, A., and Heldin, C.-H. (2010). PDGF and vessel maturation. Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Prog. Dans Rech. Sur Cancer *180*, 103–114.

Henderson, M., Polewski, R., Fanning, J.C., and Gibson, M.A. (1996). Microfibril-associated glycoprotein-1 (MAGP-1) is specifically located on the beads of the beaded-filament structure for fibrillin-containing microfibrils as visualized by the rotary shadowing technique. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *44*, 1389–1397.

Herlyn, M., Clark, W.H., Rodeck, U., Mancianti, M.L., Jambrosic, J., and Koprowski, H. (1987). Biology of tumor progression in human melanocytes. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *56*, 461–474.

Hinek, A. (1994). Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. Cell Adhes. Commun. *2*, 185–193.

Hinek, A. (1995). The 67 kDa spliced variant of beta-galactosidase serves as a reusable protective chaperone for tropoelastin. Ciba Found. Symp. *192*, 185–191; discussion 191–196.

Hinek, A., and Rabinovitch, M. (1994). 67-kD elastin-binding protein is a protective" companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. J. Cell Biol. *126*, 563–574.

Hinek, A., Wrenn, D.S., Mecham, R.P., and Barondes, S.H. (1988). The elastin receptor: a galactoside-binding protein. Science *239*, 1539–1541.

Hinek, A., Rabinovitch, M., Keeley, F., Okamura-Oho, Y., and Callahan, J. (1993). The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. J. Clin. Invest. *91*, 1198.

Hinek, A., Keeley, F.W., and Callahans, J. (1995). Recycling of the 67-kDa Elastin Binding Protein in Arterial Myocytes Is Imperative for Secretion of Tropoelastin. Exp. Cell Res. *220*, 312–324.

Hinek, A., Pshezhetsky, A.V., Von Itzstein, M., and Starcher, B. (2006). Lysosomal Sialidase (Neuraminidase-1) Is Targeted to the Cell Surface in a Multiprotein Complex That Facilitates Elastic Fiber Assembly. J. Biol. Chem. *281*, 3698–3710.

Hinek, A., Bodnaruk, T.D., Bunda, S., Wang, Y., and Liu, K. (2008). Neuraminidase-1, a subunit of the cell surface elastin receptor, desialylates and functionally inactivates adjacent receptors interacting with the mitogenic growth factors PDGF-BB and IGF-2. Am. J. Pathol. *173*, 1042–1056.

Hirabayashi, Y., and Taniguchi, M. (1989). [GM3 ganglioside as melanoma specific antigen and its biological function]. Hum. Cell *2*, 63–69.

Hiraiwa, M. (1999). Cathepsin A/protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *56*, 894–907.

Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Van Muijen, G.N., and Ruiter, D.J. (2000). Matrix metalloproteinases in human melanoma. J. Invest. Dermatol. *115*, 337–344.

Hofmann, U.B., Eggert, A.A.O., Blass, K., Bröcker, E.-B., and Becker, J.C. (2003). Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. Cancer Res. *63*, 8221–8225.

Hoogeveen, A.T., Verheijen, F.W., and Galjaard, H. (1983). The relation between human lysosomal beta-galactosidase and its protective protein. J. Biol. Chem. *258*, 12143–12146.

Hornebeck, W., Emonard, H., Monboisse, J.C., and Bellon, G. (2002). Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. In Seminars in Cancer Biology, pp. 231–241.

Hornebeck, W., Robinet, A., Duca, L., Antonicelli, F., Wallach, J., and bellon, G. (2005). The elastin connection and melanoma progression. Anticancer Res. *25*, 2617–2625.

Housaindokht, M.R., Bozorgmehr, M.R., and Bahrololoom, M. (2008). Analysis of ligand binding to proteins using molecular dynamics simulations. J. Theor. Biol. *254*, 294–300.

Huang, C., Zhang, D., Li, J., Tong, Q., and Stoner, G.D. (2007). Differential inhibition of UV-induced activation of NF kappa B and AP-1 by extracts from black raspberries, strawberries, and blueberries. Nutr. Cancer *58*, 205–212.

Huber, M.A., Kraut, N., Park, J.E., Schubert, R.D., Rettig, W.J., Peter, R.U., and Garin-Chesa, P. (2003). Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors. J. Invest. Dermatol. *120*, 182–188.

Huet, E., Brassart, B., Cauchard, J.-H., Debelle, L., Birembaut, P., Wallach, J., Emonard, H., Polette, M., and Hornebeck, W. (2002). Cumulative influence of elastin peptides and plasminogen on matrix metalloproteinase activation and type I collagen invasion by HT-1080 fibrosarcoma cells. Clin. Exp. Metastasis *19*, 107–117.

Hwang, Y.P., Kim, H.G., Choi, J.H., Han, E.H., Kwon, K.-I., Lee, Y.C., Choi, J.M., Chung, Y.C., Jeong, T.C., and Jeong, H.G. (2011). Saponins from the roots of Platycodon grandiflorum suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and NF-κB/AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc. *49*, 3374–3382.

Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K., and Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. Toxicology *189*, 21–39.

Ićurup, Z., and Vucković, N. (1994). [Specific inflammatory processes in collagenosis, degenerative and malignant diseases of the skin of the face and neck during aging]. Med. Pregl. *47*, 160–163.

Iida, J., and McCarthy, J.B. (2007a). Expression of collagenase-1 (MMP-1) promotes melanoma growth through the generation of active transforming growth factor-beta. Melanoma Res. *17*, 205–213.

Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Sheppard, P., Anderson, N., Rosenbloom, J.C., Peltonen, L., and Rosenbloom, J. (1987). Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *84*, 5680–5684.

Iozzo, R.V. (1998). MATRIX PROTEOGLYCANS: From Molecular Design to Cellular Function. Annu. Rev. Biochem. *67*, 609–652.

Iwamori, M., Harpin, M.L., Lachapelle, F., and Baumann, N. (1985). Brain gangliosides of quaking and shiverer mutants: qualitative and quantitative changes of monosialogangliosides in the quaking brain. J. Neurochem. *45*, 73–78.

Jacob, M.P. (2003). Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. Biomed. Pharmacother. *57*, 195–202.

Jacob, M.-P. (2006). Matrice extracellulaire et vieillissement vasculaire. Médecine/sciences *22*, 273–278.

Jacob, M.P., Fülöp, T., Foris, G., and Robert, L. (1987). Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *84*, 995–999.

Jacob MP and Hornebeck W (1985). Isolation and characterization of insoluble and kappa-elastins. 92–129.

Jensen, S.A., Reinhardt, D.P., Gibson, M.A., and Weiss, A.S. (2001). Protein interaction studies of MAGP-1 with tropoelastin and fibrillin-1. J. Biol. Chem. *276*, 39661–39666.

Johnson, D.J., Robson, P., Hew, Y., and Keeley, F.W. (1995). Decreased Elastin Synthesis in Normal Development and in Long-term Aortic Organ and Cell Cultures Is Related to Rapid and Selective Destabilization of mRNA for Elastin. Circ. Res. *77*, 1107–1113.

Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., and Klein, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. J. Chem. Phys. *79*, 926–935.

Jovanovic, J., Takagi, J., Choulier, L., Abrescia, N.G.A., Stuart, D.I., van der Merwe, P.A., Mardon, H.J., and Handford, P.A. (2007). alphaVbeta6 is a novel receptor for human fibrillin-1. Comparative studies of molecular determinants underlying integrin-rgd affinity and specificity. J. Biol. Chem. *282*, 6743–6751.

Kabsch, W., and Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers *22*, 2577–2637.

Kadowaki, H., and Grant, M.A. (1994). Preparation of defined molecular species of lactosylceramide by chemical deacylation and reacylation with N-succinimidyl fatty acid esters. Lipids *29*, 721–725.

Kadowaki, H., Evans, J.E., and McCluer, R.H. (1984). Separation of brain monosialoganglioside molecular species by high-performance liquid chromatography. J. Lipid Res. *25*, 1132–1139.

Kagan, H.M., and Cai, P. (1995). Isolation of active site peptides of lysyl oxidase. Methods Enzymol. *258*, 122–132.

Kagan, H.M., and Sullivan, K.A. (1982). Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. Methods Enzymol. *82 Pt A*, 637–650.

Kähäri, V.M., Olsen, D.R., Rhudy, R.W., Carrillo, P., Chen, Y.Q., and Uitto, J. (1992). Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *66*, 580–588.

Kaitila, I., Jokinen, E., and Kokkonen, J. (2012). [Marfan syndrome]. Duodecim Lääketieteellinen Aikakauskirja *128*, 503–513.

Kalamajski, S., and Oldberg, A. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *29*, 248–253.

Keller, K.L., Fenske, N.A., and Glass, L.F. (1997). Cancer of the skin in the older patient. Clin. Geriatr. Med. *13*, 339–361.

Kielty, C.M., Whittaker, S.P., and Shuttleworth, C.A. (1996). Fibrillin: evidence that chondroitin sulphate proteoglycans are components of microfibrils and associate with newly synthesised monomers. FEBS Lett. *386*, 169–173.

Kielty, C.M., Sherratt, M.J., and Shuttleworth, C.A. (2002). Elastic fibres. J. Cell Sci. *115*, 2817–2828.

Kim, E., Rebecca, V., Fedorenko, I.V., Messina, J.L., Mathew, R., Maria-Engler, S.S., Basanta, D., Smalley, K.S.M., and Anderson, A.R.A. (2013). Senescent fibroblasts in melanoma initiation and progression: an integrated theoretical, experimental, and clinical approach. Cancer Res. *73*, 6874–6885.

Kim, K.C., Kang, S.S., Lee, J., Park, D., and Hyun, J.W. (2012). Baicalein Attenuates Oxidative Stress-Induced Expression of Matrix Metalloproteinase-1 by Regulating the ERK/JNK/AP-1 Pathway in Human Keratinocytes. Biomol. Ther. *20*, 57–61.

Klotz, L.O., Holbrook, N.J., and Sies, H. (2001). UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. Curr. Probl. Dermatol. *29*, 95–113.

Knott, V., Downing, A.K., Cardy, C.M., and Handford, P. (1996). Calcium binding properties of an epidermal growth factor-like domain pair from human fibrillin-1. J. Mol. Biol. *255*, 22–27.

Kobayashi, H., Ishii, M., Chanoki, M., Fukai, K., Hamada, T., Muragaki, Y., and Ooshima, A. (1989). The subbasement membrane distribution of type IV collagen in normal human skin. J. Dermatol. *16*, 458–463.

Kobayashi, N., Kostka, G., Garbe, J.H.O., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Hanisch, F.-G., Markova, D., Tsuda, T., Timpl, R., Chu, M.-L., et al. (2007). A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. J. Biol. Chem. *282*, 11805–11816.

Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M., and Szeimies, R.M. (2011). Skin ageing. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. *25*, 873–884.

Kolácná, L., Bakesová, J., Varga, F., Kostáková, E., Plánka, L., Necas, A., Lukás, D., Amler, E., and Pelouch, V. (2007). Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov. *56 Suppl 1*, S51–S60.

Kosmadaki, M.G., and Gilchrest, B.A. (2004). The role of telomeres in skin aging/photoaging. Micron Oxf. Engl. 1993 *35*, 155–159.

Kostka, G., Giltay, R., Bloch, W., Addicks, K., Timpl, R., Fässler, R., and Chu, M.L. (2001). Perinatal lethality and endothelial cell abnormalities in several vessel compartments of fibulin-1-deficient mice. Mol. Cell. Biol. *21*, 7025–7034.

Kozel, B.A., Wachi, H., Davis, E.C., and Mecham, R.P. (2003). Domains in Tropoelastin That Mediate Elastin Deposition in Vitro and in Vivo. J. Biol. Chem. *278*, 18491–18498.

Kubota, Y. (2012). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. Keio J. Med. *61*, 47–56.

Kurschat, P., Wickenhauser, C., Groth, W., Krieg, T., and Mauch, C. (2002). Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. J. Pathol. *197*, 179–187.

Labrousse, A.-L., Ntayi, C., Hornebeck, W., and Bernard, P. (2004). Stromal reaction in cutaneous melanoma. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *49*, 269–275.

Laga, A.C., and Murphy, G.F. (2010). Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma. Arch. Pathol. Lab. Med. *134*, 1750–1757.

Lanza, P., Felding-Habermann, B., Ruggeri, Z.M., Zanetti, M., and Billetta, R. (1997). Selective interaction of a conformationally-constrained Arg-Gly-Asp (RGD) motif with the integrin receptor alphavbeta3 expressed on human tumor cells. Blood Cells. Mol. Dis. *23*, 230–241.

Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., and Falus, A. (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. Cytokine *12*, 547–554.

Lee, C., Liu, A., Miranda-Ribera, A., Hyun, S.W., Lillehoj, E.P., Cross, A.S., Passaniti, A., Grimm, P.R., Kim, B.-Y., Welling, P.A., et al. (2014a). NEU1 sialidase regulates the sialylation state of CD31 and disrupts CD31-driven capillary-like tube formation in human lung microvascular endothelia. J. Biol. Chem. jbc.M114.555888.

Lee, P., Bax, D.V., Bilek, M.M.M., and Weiss, A.S. (2014b). A novel cell adhesion region in tropoelastin mediates attachment to integrin αVβ5. J. Biol. Chem. *289*, 1467–1477.

Lee, S., Barbe, M.F., Scalia, R., and Goldfinger, L.E. (2014c). Three-dimensional reconstruction of neovasculature in solid tumors and basement membrane matrix using ex vivo X-ray microcomputed tomography. Microcirc. N. Y. N 1994 *21*, 159–170.

Lemaire, R., Bayle, J., Mecham, R.P., and Lafyatis, R. (2007). Microfibril-associated MAGP-2 Stimulates Elastic Fiber Assembly. J. Biol. Chem. *282*, 800–808.

Li, X., Pereira, L., Zhang, H., Sanguineti, C., Ramirez, F., Bonadio, J., and Francke, U. (1993). Fibrillin genes map to regions of conserved mouse/human synteny on mouse chromosomes 2 and 18. Genomics *18*, 667–672.

Lin, G., Tiedemann, K., Vollbrandt, T., Peters, H., Batge, B., Brinckmann, J., and Reinhardt, D.P. (2002). Homo- and heterotypic fibrillin-1 and -2 interactions constitute the basis for the assembly of microfibrils. J. Biol. Chem. *277*, 50795–50804.

Lisanti, M.P., Martinez-Outschoorn, U.E., Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Pestell, R.G., Howell, A., and Sotgia, F. (2011). Accelerated aging in the tumor microenvironment: connecting aging, inflammation and cancer metabolism with personalized medicine. Cell Cycle Georget. Tex *10*, 2059–2063.

Lombard, C., Bouchu, D., Wallach, J., and Saulnier, J. (2005). Proteinase 3 hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. Amino Acids *28*, 403–408.

Lombard, C., Arzel, L., Bouchu, D., Wallach, J., and Saulnier, J. (2006). Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. Biochimie *88*, 1915–1921.

Long, M.M., King, V.J., Prasad, K.U., and Urry, D.W. (1988). Chemotaxis of fibroblasts toward nonapeptide of elastin. Biochim. Biophys. Acta *968*, 300–311.

Machado, C.M.L., Andrade, L.N.S., Teixeira, V.R., Costa, F.F., Melo, C.M., dos Santos, S.N., Nonogaki, S., Liu, F.-T., Bernardes, E.S., Camargo, A.A., et al. (2014). Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGFβ1-induced macrophages. Cancer Med. *3*, 201–214.

Mack, T. (1999). The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. N. Engl. J. Med. *341*, 766; author reply 766–767.

Maddox, B.K., Sakai, L.Y., Keene, D.R., and Glanville, R.W. (1989). Connective tissue microfibrils. Isolation and characterization of three large pepsin-resistant domains of fibrillin. J. Biol. Chem. *264*, 21381–21385.

Magenis, R.E., Maslen, C.L., Smith, L., Allen, L., and Sakai, L.Y. (1991). Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. Genomics *11*, 346–351.

Maquart, F.-X., Pasco, S., Ramont, L., Hornebeck, W., and Monboisse, J.-C. (2004). An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity. Implication in tumor invasion. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *49*, 199–202.

Mariencheck, M.C., Davis, E.C., Zhang, H., Ramirez, F., Rosenbloom, J., Gibson, M.A., Parks, W.C., and Mecham, R.P. (1995). Fibrillin-1 and fibrillin-2 show temporal and tissue-specific regulation of expression in developing elastic tissues. Connect. Tissue Res. *31*, 87–97.

Matsumoto, M., Komiyama, K., Okaue, M., Shimoyama, Y., Iwakami, K., Namaki, S., Tanaka, H., Moro, I., and Sato, H. (1999). Predicting tumor metastasis in patients with oral cancer by means of the proliferation marker Ki67. J. Oral Sci. *41*, 53–56.

Mauviel, A., Chen, Y.Q., Kähäri, V.M., Ledo, I., Wu, M., Rudnicka, L., and Uitto, J. (1993). Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo. J. Biol. Chem. *268*, 6520–6524.

Mazzone, M., Dettori, D., Leite de Oliveira, R., Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., Tian, Y.-M., Lanahan, A.A., Pollard, P., Ruiz de Almodovar, C., et al. (2009). Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. Cell *136*, 839–851.

McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. (2001). Tumor progression: defining the soil round the tumor seed. Curr. Biol. CB *11*, R25–R27.

McLaughlin, P.J., Chen, Q., Horiguchi, M., Starcher, B.C., Stanton, J.B., Broekelmann, T.J., Marmorstein, A.D., McKay, B., Mecham, R., Nakamura, T., et al. (2006). Targeted disruption of fibulin-4 abolishes elastogenesis and causes perinatal lethality in mice. Mol. Cell. Biol. *26*, 1700–1709.

Mecham, R.P. (2011). The Extracellular matrix : an overview (Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Springer e-books).

Mecham, R.P., Hinek, A., Griffin, G.L., Senior, R.M., and Liotta, L.A. (1989). The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. J. Biol. Chem. *264*, 16652–16657.

Mecham, R.P., Whitehouse, L., Hay, M., Hinek, A., and Sheetz, M.P. (1991). Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. J. Cell Biol. *113*, 187–194.

Meijden Van Der, W.A.G., van Bruchem-Visser, R.L., Thio, H.B., and van der Cammen, T.J.M. (2010). [Melanomas more serious in the elderly]. Ned. Tijdschr. Geneeskd. *154*, A1535.

Mithieux, S.M., and Weiss, A.S. (2005). Elastin. In Advances in Protein Chemistry, and J.M.S. David A. D. Parry, ed. (Academic Press), pp. 437–461.

Miyagi, T., Wada, T., Yamaguchi, K., Hata, K., and Shiozaki, K. (2008). Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling. J. Biochem. (Tokyo) *144*, 279–285.

M.J. Lipta, and , M.D. Bolney, R.P. Mecham, J. Rosenbloom,J.D. Cooper, L.R. Kaiser, (1991). The detection of a unique iso- form of elastin in human hypertensive pulmonary arteries. Surg. Forum 42 287±289.

Mochizuki, S., Brassart, B., and Hinek, A. (2002). Signaling Pathways Transduced through the Elastin Receptor Facilitate Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells. J. Biol. Chem. *277*, 44854–44863.

Monti, E., Bonten, E., D'Azzo, A., Bresciani, R., Venerando, B., Borsani, G., Schauer, R., and Tettamanti, G. (2010). Sialidases in Vertebrates: A Family Of Enzymes Tailored For Several Cell Functions*. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. *64*, 403–479.

Moroy, G., Alix, A.J.P., and Héry-Huynh, S. (2005). Structural characterization of human elastin derived peptides containing the GXXP sequence. Biopolymers *78*, 206–220.

Moroy, G., Ostuni, A., Pepe, A., Tamburro, A.M., Alix, A.J.P., and Héry-Huynh, S. (2009). A proposed interaction mechanism between elastin-derived peptides and the elastin/laminin receptor-binding domain. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. *76*, 461–476.

Morreau, H., Galjart, N.J., Willemsen, R., Gillemans, N., Zhou, X.Y., and d' Azzo, A. (1992). Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. *267*, 17949–17956.

Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., and Olson, A.J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comput. Chem. *19*, 1639–1662.

Moses, M. a., Marikovsky, M., Harper, J. w., Vogt, P., Eriksson, E., Klagsbrun, M., and Langer, R. (1996). Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. J. Cell. Biochem. *60*, 379–386.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. Biotechnol. Read. Mass *24*, 17–27.

Murphy, G., Cockett, M.I., Ward, R.V., and Docherty, A.J. (1991). 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.

Nagase, T., Nakayama, M., Nakajima, D., Kikuno, R., and Ohara, O. (2001). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes *8*, 85–95.

Nakamura, T., Lozano, P.R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C.-F., Kobuke, K., Dalton, N., Takada, Y., et al. (2002). Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. Nature *415*, 171–175.

Naylor, E.C., Watson, R.E.B., and Sherratt, M.J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. Maturitas *69*, 249–256.

Newton-Bishop, J.A., Chang, Y.-M., Iles, M.M., Taylor, J.C., Bakker, B., Chan, M., Leake, S., Karpavicius, B., Haynes, S., Fitzgibbon, E., et al. (2010). Melanocytic nevi, nevus genes and melanoma risk in a large case-control study in the United Kingdom. Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol. *19*, 2043–2054.

Nivison-Smith, L., and Weiss, A. (2011). Elastin Based Constructs. In Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials, D. Eberli, ed. (InTech),.

Noblesse, E., Cenizo, V., Bouez, C., Borel, A., Gleyzal, C., Peyrol, S., Jacob, M.-P., Sommer, P., and Damour, O. (2004). Lysyl oxidase-like and lysyl oxidase are present in the dermis and epidermis of a skin equivalent and in human skin and are associated to elastic fibers. J. Invest. Dermatol. *122*, 621–630.

Norrby, K. (2006). In vivo models of angiogenesis. J. Cell. Mol. Med. *10*, 588–612.

Ntayi, C., Labrousse, A.L., Debret, R., Birembaut, P., Bellon, G., Antonicelli, F., Hornebeck, W., and Bernard, P. (2004). Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-ediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. J. Invest. Dermatol. *122*, 256–265.

Nusgens, B.-V. (2010). [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. Ann. Dermatol. Vénéréologie *137 Suppl 1*, S3–S8.

Ochieng, J., Furtak, V., and Lukyanov, P. (2004). Extracellular functions of galectin-3. Glycoconj. J. *19*, 527–535.

Oitate, M., Hirota, T., Takahashi, M., Murai, T., Miura, S., Senoo, A., Hosokawa, T., Oonishi, T., and Ikeda, T. (2007). Mechanism for Covalent Binding of Rofecoxib to Elastin of Rat Aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. *320*, 1195–1203.

Van den Oord, J.J., Paemen, L., Opdenakker, G., and de Wolf-Peeters, C. (1997). Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. Am. J. Pathol. *151*, 665–670.

O'Shea, L.K., Abdulkhalek, S., Allison, S., Neufeld, R.J., and Szewczuk, M.R. (2014). Therapeutic targeting of Neu1 sialidase with oseltamivir phosphate (Tamiflu(R)) disables

cancer cell survival in human pancreatic cancer with acquired chemoresistance. OncoTargets Ther. *7*, 117–134.

Ozola, A., Azarjana, K., Doniņa, S., Proboka, G., Mandrika, I., Petrovska, R., Cēma, I., Heisele, O., Eņģele, L., Streinerte, B., et al. (2013). Melanoma risk associated with MC1R gene variants in Latvia and the functional analysis of rare variants. Cancer Genet. *206*, 81–91.

Pacifico, A., Goldberg, L.H., Peris, K., Chimenti, S., Leone, G., and Ananthaswamy, H.N. (2008). Loss of CDKN2A and p14ARF expression occurs frequently in human nonmelanoma skin cancers. Br. J. Dermatol. *158*, 291–297.

Page-McCaw, A., Ewald, A.J., and Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 221–233.

Pardo, A., and Selman, M. (1999). Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: the role of metalloproteinases in lung damage. Histol. Histopathol. *14*, 227–233.

Park, J.E., Lenter, M.C., Zimmermann, R.N., Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1999). Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. J. Biol. Chem. *274*, 36505–36512.

Park, M., Han, J., Lee, C.S., Soo, B.H., Lim, K.-M., and Ha, H. (2013). Carnosic acid, a phenolic diterpene from rosemary, prevents UV-induced expression of matrix metalloproteinases in human skin fibroblasts and keratinocytes. Exp. Dermatol. *22*, 336–341.

Parks, W.C., and Deak, S.B. (1990). Tropoelastin heterogeneity: implications for protein function and disease. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. *2*, 399–406.

Partridge, S.M., Davis, H.F., and Adair, G.S. (1955). The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. Biochem. J. *61*, 11–21.

Partridge, S.M., Elsden, D.F., Thomas, J., Dorfman, A., Telser, A., and Ho, P.L. (1964). Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. Biochem. J. *93*, 30C – 33C.

Pasquali-Ronchetti, I., and Baccarani-Contri, M. (1997). Elastic fiber during development and aging. Microsc. Res. Tech. *38*, 428–435.

Patel, D., Vandromme, S.E., Reid, M.E., and Taite, L.J. (2012). Synergistic activity of αvβ3 integrins and the elastin binding protein enhance cell-matrix interactions on bioactive hydrogel surfaces. Biomacromolecules *13*, 1420–1428.

Pereira, L., Andrikopoulos, K., Tian, J., Lee, S.Y., Keene, D.R., Ono, R., Reinhardt, D.P., Sakai, L.Y., Biery, N.J., Bunton, T., et al. (1997). Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. Nat. Genet. *17*, 218–222.

Perrin, S., and Foster, J.A. (1997). Developmental regulation of elastin gene expression. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. *7*, 1–10.

Petersen, E., Wågberg, F., and Ängquist, K.-A. (2002). Serum Concentrations of Elastin-derived Peptides in Patients with Specific Manifestations of Atherosclerotic Disease. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. *24*, 440–444.

Pettan-Brewer, C., Morton, J., Coil, R., Hopkins, H., Fatemie, S., and Ladiges, W. (2012). B16 melanoma tumor growth is delayed in mice in an age-dependent manner. Pathobiol. Aging Age Relat. Dis. *2*.

Pietras, K., and Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. Exp. Cell Res. *316*, 1324–1331.

Piontkivska, H., Zhang, Y., Green, E.D., NISC Comparative Sequencing Program, and Elnitski, L. (2004). Multi-species sequence comparison reveals dynamic evolution of the elastin gene that has involved purifying selection and lineage-specific insertions/deletions. BMC Genomics *5*, 31.

Pitiyage, G.N., Lim, K.P., Gemenitzidis, E., Teh, M.-T., Waseem, A., Prime, S.S., Tilakaratne, W.M., Fortune, F., and Parkinson, E.K. (2012). Increased secretion of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 (TIMPs -1 and -2) in fibroblasts are early indicators of oral sub-mucous fibrosis and ageing. J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol. *41*, 454–462.

Pocza, P., Süli-Vargha, H., Darvas, Z., and Falus, A. (2007). Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. Int. J. Cancer *122*, 1972–1980.

Poggi, M.M., Klein, M.B., Chapo, G.A., and Cuono, C.B. (1999). Effects of cryopreservation and deconstruction on the dermal glycosaminoglycan content of human skin. J. Burn Care Rehabil. *20*, 201–206.

Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. Cell *146*, 873–887.

Privitera, S., Prody, C.A., Callahan, J.W., and Hinek, A. (1998). The 67-kDa Enzymatically Inactive Alternatively Spliced Variant of beta -Galactosidase Is Identical to the Elastin/Laminin-binding Protein. J Biol Chem *273*, 6319–6326.

Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M.R., Smith, J.C., Kasson, P.M., van der Spoel, D., et al. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. Bioinforma. Oxf. Engl. *29*, 845–854.

Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J.J., and Fisher, G.J. (2009). Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res. *14*, 20–24.

Quondamatteo, F., Reinhardt, D.P., Charbonneau, N.L., Pophal, G., Sakai, L.Y., and Herken, R. (2002). Fibrillin-1 and fibrillin-2 in human embryonic and early fetal development. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *21*, 637–646.

Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T., and Iacobelli, S. (2002). Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Trends Immunol. *23*, 313–320.

Rapaka, R.S., and Urry, D.W. (1978). Coacervation of sequential polypeptide models of tropoelastin. Synthesis of H-(Val-Ala-Pro-Gly)n-Val-OMe and H-(Val-Pro-Gly-Gly)n-Val-OMe. Int. J. Pept. Protein Res. *11*, 97–108.

Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi, C.R., and Alaibac, M. (2014). Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. Vivo Athens Greece *28*, 1005–1011.

Reiser, K., McCormick, R.J., and Rucker, R.B. (1992). Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *6*, 2439–2449.

Reitamo, S., Remitz, A., Tamai, K., Ledo, I., and Uitto, J. (1994). Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. Biochem. J. *302 (Pt 2)*, 331–333.

Remontet, L., Estève, J., Bouvier, A.-M., Grosclaude, P., Launoy, G., Menegoz, F., Exbrayat, C., Tretare, B., Carli, P.-M., Guizard, A.-V., et al. (2003). Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. Rev. Dépidémiologie Santé Publique *51*, 3–30.

Riboni, L., Acquotti, D., Casellato, R., Ghidoni, R., Montagnolo, G., Benevento, A., Zecca, L., Rubino, F., and Sonnino, S. (1992). Changes of the human liver GM3 ganglioside molecular species during aging. Eur. J. Biochem. *203*, 107–113.

Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *3*.1-19

Ricard-Blum, S., and Ruggiero, F. (2005). The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. Pathol. Biol. (Paris) *53*, 430–442.

Rittié, L., and Fisher, G.J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. Ageing Res. Rev. *1*, 705–720.

Ritty, T.M., Broekelmann, T.J., Werneck, C.C., and Mecham, R.P. (2003). Fibrillin-1 and -2 contain heparin-binding sites important for matrix deposition and that support cell attachment. Biochem. J. *375*, 425–432.

Robert, L. (1996). Aging of the vascular wall and atherogenesis: role of the elastin-laminin receptor. Atherosclerosis *123*, 169–179.

Robert, L. (1997). [Relation between genetic and epigenetic mechanisms in aging]. Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil. *191*, 593–602.

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.

Robinet, A., Millart, H., Oszust, F., Hornebeck, W., and Bellon, G. (2007). Binding of elastin peptides to S-Gal protects the heart against ischemia/reperfusion injury by triggering the RISK pathway. FASEB J. *21*, 1968–1978.

Robinson, P.N., and Godfrey, M. (2000). The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrillopathies. J. Med. Genet. *37*, 9–25.

Rock, M.J., Cain, S.A., Freeman, L.J., Morgan, A., Mellody, K., Marson, A., Shuttleworth, C.A., Weiss, A.S., and Kielty, C.M. (2004). Molecular Basis of Elastic Fiber Formation critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. J. Biol. Chem. *279*, 23748–23758.

Rodgers, U.R., and Weiss, A.S. (2004). Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. Biochimie *86*, 173–178.

Rosenbloom, J., Bashir, M., Yeh, H., Rosenbloom, J., Ornstein-Goldstein, N., Fazio, M., Kahari, V.M., and Uitto, J. (1991). Regulation of elastin gene expression. Ann. N. Y. Acad. Sci. *624*, 116–136.

Rosenbloom, J., Abrams, W.R., and Mecham, R. (1993). Extracellular matrix 4: the elastic fiber. FASEB J. *7*, 1208–1218.

Roth, G.S. (1995). Changes in tissue responsiveness to hormones and neurotransmitters during aging. Exp. Gerontol. *30*, 361–368.

Rubin, H. (1997). Cell aging in vivo and in vitro. Mech. Ageing Dev. *98*, 1–35.

Ruiter, D.J., and Herlyn, M. (2003). [Melanoma-stroma interactions and melanoma progression]. J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG *1*, 773–776.

Ruiter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., and Herlyn, M. (2002). Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. Lancet Oncol. *3*, 35–43.

Rusciani, A., Duca, L., Sartelet, H., Chatron-Colliet, A., Bobichon, H., Ploton, D., Le Naour, R., Blaise, S., Martiny, L., and Debelle, L. (2010). Elastin peptides signaling relies on neuraminidase-1-dependent lactosylceramide generation. PloS One *5*, e14010.

Sabatier, L., Miosge, N., Hubmacher, D., Lin, G., Davis, E.C., and Reinhardt, D.P. (2011). Fibrillin-3 expression in human development. Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol. *30*, 43–52.

Saha, S., and Mohanty, K.C. (2003). Correlation of gangliosides GM2 and GM3 with metastatic potential to lungs of mouse B16 melanoma. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *22*, 125–134.

Saito, M., Tanaka, Y., Tang, C.P., Yu, R.K., and Ando, S. (1995). Characterization of sialidase activity in mouse synaptic plasma membranes and its age-related changes. J. Neurosci. Res. *40*, 401–406.

Sakai, L.Y., Keene, D.R., and Engvall, E. (1986). Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. J. Cell Biol. *103*, 2499–2509.

Sakamoto, H., Broekelmann, T., Cheresh, D.A., Ramirez, F., Rosenbloom, J., and Mecham, R.P. (1996). Cell-type Specific Recognition of RGD- and Non-RGD-containing Cell Binding Domains in Fibrillin-1. J. Biol. Chem. *271*, 4916–4922.

Sasaki, T., Göhring, W., Miosge, N., Abrams, W.R., Rosenbloom, J., and Timpl, R. (1999). Tropoelastin binding to fibulins, nidogen-2 and other extracellular matrix proteins. FEBS Lett. *460*, 280–284.

Scharffetter–Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., and Wlaschek, M. (2000). Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. Exp. Gerontol. *35*, 307–316.

Schmelzer, C.E.H., Jung, M.C., Wohlrab, J., Neubert, R.H.H., and Heinz, A. (2012). Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? FEBS J. *279*, 4191–4200.

Segade, F., Trask, B.C., Broekelmann, T.J., Pierce, R.A., and Mecham, R.P. (2002). Identification of a matrix-binding domain in MAGP1 and MAGP2 and intracellular localization of alternative splice forms. J. Biol. Chem. *277*, 11050–11057.

Senger, D.R., Claffey, K.P., Benes, J.E., Perruzzi, C.A., Sergiou, A.P., and Detmar, M. (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 13612–13617.

Senior, R.M., Griffin, G.L., Mecham, R.P., Wrenn, D.S., Prasad, K.U., and Urry, D.W. (1984). Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. J. Cell Biol. *99*, 870–874.

Shan, W., Yang, G., and Liu, J. (2009). The inflammatory network: bridging senescent stroma and epithelial tumorigenesis. Front. Biosci. Landmark Ed. *14*, 4044–4057.

Shapiro, S.D., Endicott, S.K., Province, M.A., Pierce, J.A., and Campbell, E.J. (1991). Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. J. Clin. Invest. *87*, 1828–1834.

Sherratt, M.J. (2009). Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. Age *31*, 305–325.

Sherratt, M.J., Bayley, C.P., Reilly, S.M., Gibbs, N.K., Griffiths, C.E.M., and Watson, R.E.B. (2010). Low-dose ultraviolet radiation selectively degrades chromophore-rich extracellular matrix components. J. Pathol. *222*, 32–40.

Shikada, Y., Yonemitsu, Y., Koga, T., Onimaru, M., Nakano, T., Okano, S., Sata, S., Nakagawa, K., Yoshino, I., Maehara, Y., et al. (2005). Platelet-derived growth factor-AA is an essential and autocrine regulator of vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung carcinomas. Cancer Res. *65*, 7241–7248.

Shoulders, M.D., and Raines, R.T. (2009). Collagen structure and stability. Annu. Rev. Biochem. *78*, 929–958.

Sicot, F.-X., Tsuda, T., Markova, D., Klement, J.F., Arita, M., Zhang, R.-Z., Pan, T.-C., Mecham, R.P., Birk, D.E., and Chu, M.-L. (2008). Fibulin-2 is dispensable for mouse development and elastic fiber formation. Mol. Cell. Biol. *28*, 1061–1067.

Siemianowicz, K., Gminski, J., Goss, M., Francuz, T., Likus, W., Jurczak, T., and Garczorz, W. (2010). Influence of elastin-derived peptides on metalloprotease production in endothelial cells. Exp. Ther. Med. *1*, 1057–1060.

Simonetti, O., Lucarini, G., Brancorsini, D., Nita, P., Bernardini, M.L., Biagini, G., and Offidani, A. (2002). Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. Cancer *95*, 1963–1970.

Simpson, C.L., Patel, D.M., and Green, K.J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *12*, 565–580.

Siveen, K.S., and Kuttan, G. (2013). Inhibition of B16F-10 melanoma-induced lung metastasis in C57BL/6 mice by Aerva lanata via induction of apoptosis. Integr. Cancer Ther. *12*, 81–92.

Sjerobabski-Masnec, I., and Situm, M. (2010). Skin aging. Acta Clin. Croat. *49*, 515–518.

Smolle, J., Woltsche, I., Hofmann-Wellenhof, R., Haas, J., and Kerl, H. (1995). Pathology of tumor-stroma interaction in melanoma metastatic to the skin. Hum. Pathol. *26*, 856–861.

SOLI, F.J., and Wets, R.J.B. (1981). Minimization By Random Search Techniques. Math. Oper. Res. 19–30.

Sonnino, S., Ghidoni, R., Gazzotti, G., Kirschner, G., Galli, G., and Tettamanti, G. (1984). High performance liquid chromatography preparation of the molecular species of GM1 and GD1a gangliosides with homogeneous long chain base composition. J. Lipid Res. *25*, 620–629.

Sonnino, S., Prinetti, A., Nakayama, H., Yangida, M., Ogawa, H., and Iwabuchi, K. (2009). Role of very long fatty acid-containing glycosphingolipids in membrane organization and cell signaling: the model of lactosylceramide in neutrophils. Glycoconj. J. *26*, 615–621.

Sriramarao, P., Steffner, P., and Gehlsen, K.R. (1993). Biochemical evidence for a homophilic interaction of the alpha 3 beta 1 integrin. J. Biol. Chem. *268*, 22036–22041.

Starcher, B., d' Azzo, A., Keller, P.W., Rao, G.K., Nadarajah, D., and Hinek, A. (2008). Neuraminidase-1 is required for the normal assembly of elastic fibers. Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol. *295*, L637–L647.

Swee, M.H., Parks, W.C., and Pierce, R.A. (1995). Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels. J. Biol. Chem. *270*, 14899–14906.

Syrigos, K.N., Tzannou, I., Katirtzoglou, N., and Georgiou, E. (2005). Skin cancer in the elderly. Vivo Athens Greece *19*, 643–652.

Szabó, Z., Levi-Minzi, S.A., Christiano, A.M., Struminger, C., Stoneking, M., Batzer, M.A., and Boyd, C.D. (1999). Sequential loss of two neighboring exons of the tropoelastin gene during primate evolution. J. Mol. Evol. *49*, 664–671.

Taipale, J., Saharinen, J., Hedman, K., and Keski-Oja, J. (1996). Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *44*, 875–889.

Tajima, S., Wachi, H., Uemura, Y., and Okamoto, K. (1997). Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. Arch. Dermatol. Res. *289*, 489–492.

Tanzer, M.L. (2006). Current concepts of extracellular matrix. J. Orthop. Sci. *11*, 326–331.

Taraboletti, G., and Giavazzi, R. (2004). Modelling approaches for angiogenesis. Eur. J. Cancer *40*, 881–889.

Tatano, Y., Takeuchi, N., Kuwahara, J., Sakuraba, H., Takahashi, T., Takada, G., and Itoh, K. (2006). Elastogenesis in cultured dermal fibroblasts from patients with lysosomal beta-galactosidase, protective protein/cathepsin A and neuraminidase-1 deficiencies. J. Med. Investig. JMI *53*, 103–112.

Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G., and Chu, M.-L. (2003). Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *4*, 479–489.

Tinker, D., Romero-Chapman, N., Reiser, K., Hyde, D., and Rucker, R. (1990). Elastin metabolism during recovery from impaired crosslink formation. Arch. Biochem. Biophys. *278*, 326–332.

Todorova, N., Yeung, L., Hung, A., and Yarovsky, I. (2013). "Janus" Cyclic Peptides: A New Approach to Amyloid Fibril Inhibition? PLoS ONE *8*, e57437.

Tortora, G.J., and Derrickson, B.H. (2008). Principles of Anatomy and Physiology (John Wiley & Sons).

Toupance, S., Brassart, B., Rabenoelina, F., Ghoneim, C., Vallar, L., Polette, M., Debelle, L., and Birembaut, P. (2012). Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. Clin. Exp. Metastasis *29*, 511–522.

Tringali, C., Lupo, B., Silvestri, I., Papini, N., Anastasia, L., Tettamanti, G., and Venerando, B. (2012). The plasma membrane sialidase NEU3 regulates the malignancy of renal carcinoma cells by controlling β1 integrin internalization and recycling. J. Biol. Chem. *287*, 42835–42845.

Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. Genes Dev. *26*, 1131–1155.

Tsunoda, S., Nakamura, T., Sakurai, H., and Saiki, I. (2007). Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization. Cancer Sci. *98*, 541–548.

Tunçbilek, E., and Alanay, Y. (2006). Congenital contractural arachnodactyly (Beals syndrome). Orphanet J. Rare Dis. *1*, 20.

Udayakumar, D., Mahato, B., Gabree, M., and Tsao, H. (2010). Genetic Determinants of Cutaneous Melanoma Predisposition. Semin. Cutan. Med. Surg. *29*, 190–195.

Uitto, J., Christiano, A.M., Kähäri, V.M., Bashir, M.M., and Rosenbloom, J. (1991). Molecular biology and pathology of human elastin. Biochem. Soc. Trans. *19*, 824–829.

Umeda, H., Kawamorita, K., and Suyama, K. (2001). High-performance liquid chromatographic quantification of allysine as bis-p-cresol derivative in elastin. Amino Acids *20*, 187–199.

Urbanek, M., Sam, S., Legro, R.S., and Dunaif, A. (2007). Identification of a polycystic ovary syndrome susceptibility variant in fibrillin-3 and association with a metabolic phenotype. J. Clin. Endocrinol. Metab. *92*, 4191–4198.

Vacca, A., Ria, R., Presta, M., Ribatti, D., Iurlaro, M., Merchionne, F., Tanghetti, E., and Dammacco, F. (2001). alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. Exp. Hematol. *29*, 993–1003.

Varga, Z., Jacob, M.P., Csongor, J., Robert, L., Leövey, A., and Fülöp, T., Jr (1990). Altered phosphatidylinositol breakdown after K-elastin stimulation in PMNLs of elderly. Mech. Ageing Dev. *52*, 61–70.

Varga, Z., Jacob, M.P., Robert, L., Csongor, J., and Fulop, T., Jr (1997). Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis. Exp. Gerontol. *32*, 653–662.

Veinalde, R., Ozola, A., Azarjana, K., Molven, A., Akslen, L.A., Doniņa, S., Proboka, G., Cēma, I., Baginskis, A., and Pjanova, D. (2013). Analysis of Latvian familial melanoma patients shows novel variants in the noncoding regions of CDKN2A and that the CDK4 mutation R24H is a founder mutation. Melanoma Res. *23*, 221–226.

Veness, M.J., Quinn, D.I., Ong, C.S., Keogh, A.M., Macdonald, P.S., Cooper, S.G., and Morgan, G.W. (1999). Aggressive cutaneous malignancies following cardiothoracic transplantation: the Australian experience. Cancer *85*, 1758–1764.

Verheijen, F.W., Palmeri, S., Hoogeveen, A.T., And Galjaard, H. (1985). Human placental neuraminidase. Eur. J. Biochem. *149*, 315–322.

Vigneron, A., and Vousden, K.H. (2010). p53, ROS and senescence in the control of aging. Aging *2*, 471.

Vrhovski, B., and Weiss, A.S. (1998). Biochemistry of tropoelastin. Eur. J. Biochem. FEBS *258*, 1–18.

Vrhovski, B., Jensen, S., and Weiss, A.S. (1997). Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin. Eur. J. Biochem. FEBS *250*, 92–98.

Wachi, H., Seyama, Y., Yamashita, S., Suganami, H., Uemura, Y., Okamoto, K., Yamada, H., and Tajima, S. (1995). Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells. FEBS Lett. *368*, 215–219.

Wagenseil, J.E., and Mecham, R.P. (2007). New insights into elastic fiber assembly. Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev. *81*, 229–240.

Walker, R.A., and Woolley, D.E. (1999). Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 and -3 in human melanoma. Virchows Arch. Int. J. Pathol. *435*, 574–579.

Waller, J.M., and Maibach, H.I. (2006). Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin ISBS Int. Soc. Digit. Imaging Skin ISDIS Int. Soc. Skin Imaging ISSI *12*, 145–154.

Wandel, E., Grasshoff, A., Mittag, M., Haustein, U.F., and Saalbach, A. (2000). Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro. Exp. Dermatol. *9*, 34–41.

Wandel, E., Raschke, A., Hildebrandt, G., Eberle, J., Dummer, R., Anderegg, U., and Saalbach, A. (2002). Fibroblasts enhance the invasive capacity of melanoma cells in vitro. Arch. Dermatol. Res. *293*, 601–608.

Wang, A.-X., and Qi, X.-Y. (2013). Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. IUBMB Life *65*, 748–758.

Wang, D., Zaitsev, S., Taylor, G., d' Azzo, A., and Bonten, E. (2009). Protective protein/cathepsin A rescues N-glycosylation defects in neuraminidase-1. Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj. *1790*, 275–282.

Wäster, P., Rosdahl, I., Gilmore, B.F., and Seifert, O. (2011). Ultraviolet exposure of melanoma cells induces fibroblast activation protein-α in fibroblasts: Implications for melanoma invasion. Int. J. Oncol. *39*, 193–202.

Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. Nature *437*, 497–504.

Willenberg, A., Saalbach, A., Simon, J.C., and Anderegg, U. (2012). Melanoma cells control HA synthesis in peritumoral fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC: impact on melanoma cell proliferation. J. Invest. Dermatol. *132*, 385–393.

Wolfe, B.L., Rich, C.B., Goud, H.D., Terpstra, A.J., Bashir, M., Rosenbloom, J., Sonenshein, G.E., and Foster, J.A. (1993). Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene. J. Biol. Chem. *268*, 12418–12426.

Wrenn, D.S., Hinek, A., and Mecham, R.P. (1988). Kinetics of receptor-mediated binding of tropoelastin to ligament fibroblasts. J. Biol. Chem. *263*, 2280–2284.

Yamakawa, S., Asai, T., Uchida, T., Matsukawa, M., Akizawa, T., and Oku, N. (2004). (-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis. Cancer Lett. *210*, 47–55.

Yanagisawa, H., Davis, E.C., Starcher, B.C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (2002). Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. Nature *415*, 168–171.

Yeh, H., Chow, M., Abrams, W.R., Fan, J., Foster, J., Mitchell, H., Muenke, M., and Rosenbloom, J. (1994). Structure of the human gene encoding the associated microfibrillar protein (MFAP1) and localization to chromosome 15q15-q21. Genomics *23*, 443–449.

Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., and Kuwano, M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. Mol. Cell. Biol. *17*, 4015–4023.

Zanetti, M., Braghetta, P., Sabatelli, P., Mura, I., Doliana, R., Colombatti, A., Volpin, D., Bonaldo, P., and Bressan, G.M. (2004). EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. Mol. Cell. Biol. *24*, 638–650.

Zapico, S.C., and Ubelaker, D.H. (2013). mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. Aging Dis. *4*, 364–380.

Zheng, D., Hu, Z., He, F., Gao, C., Xu, L., Zou, H., Wu, Z., Jiang, X., and Wang, J. (2014). Downregulation of galectin-3 causes a decrease in uPAR levels and inhibits the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. Oncol. Rep. *32*, 411–418.

Zigrino, P., Kuhn, I., Bäuerle, T., Zamek, J., Fox, J.W., Neumann, S., Licht, A., Schorpp-Kistner, M., Angel, P., and Mauch, C. (2009). Stromal expression of MMP-13 is required for melanoma invasion and metastasis. J. Invest. Dermatol. *129*, 2686–2693.

Zimmermann, D.R., Dours-Zimmermann, M.T., Schubert, M., and Bruckner-Tuderman, L. (1994). Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. J. Cell Biol. *124*, 817–825.

Zimrin, A.B., Villeponteau, B., and Maciag, T. (1995). Models of in vitro angiogenesis: endothelial cell differentiation on fibrin but not matrigel is transcriptionally dependent. Biochem. Biophys. Res. Commun. *213*, 630–638.

RESUME

L'élastine est la protéine de la matrice extracellulaire responsable de l'élasticité des tissus. Elle est synthétisée en abondance dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques tels que la peau, les poumons, et les artères. Ce biopolymère présente une demi-vie longue de 70 ans et est par conséquent sujet aux altérations liées à l'âge. De plus, l'élastine est dégradée lors de la progression tumorale, notamment celle du mélanome. Sa dégradation entraîne la libération de peptides dérivés de l'élastine (EDP) dotés d'activités biologiques propres et pouvant être impliqués dans l'invasion tumorale (prolifération, angiogenèse, sécrétion de protéases, invasion, survie). Nous avons été les premiers à démontrer que les EDP sont capables de fortement promouvoir le développement de mélanome *in vivo* dans un modèle murin au travers de l'augmentation de la prolifération et de l'invasion des cellules tumorales impliquant la collagènase-1 ou MMP-1. Ces données suggèrent ainsi que le récepteur de ces peptides, le complexe récepteur de l'élastine (CRE), pourrait constituer une cible thérapeutique innovante afin de lutter contre ce cancer pour lequel un manque flagrant de thérapies efficientes prévaut à l'heure actuelle. Dans le cadre de cette étude, nous avons développé différentes stratégies thérapeutiques basées sur le ciblage du récepteur CRE. Nous démontrons pour la première fois que le ciblage thérapeutique du CRE permet de limiter de manière efficace la progression du mélanome *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin. De plus, le vieillissement étant un des facteurs de risque majeur du mélanome, nous avons évalué l'impact de l'âge du stroma sur les effets des EDP et le développement tumoral associé.

Mots clés : mélanome, CRE, peptides d'élastine, stroma tumoral, vieillissement

---

ABSTRACT

Elastin is the extracellular matrix protein responsible for tissue elasticity. It is abundant in tissues experiencing important mechanical constraints such as skin, lungs and arteries. This biopolymer possesses a half-life of 70 years and, consequently, it is subjected to age-related alterations. Moreover, elastin is degraded during tumor progression, notably that of melanoma. Its degradation results in the release of elastin-derived peptides (EDP) which possess their own biological activities that can be linked to tumor invasion (proliferation, angiogenesis, proteases secretion, invasion, survival). We have been the first to show that EDP can promote melanoma development in an *in vivo* mouse model by raising the proliferation and invasion of tumor cells through collagenase-1 (MMP-1) up-regulation. These data thus suggest that the receptor for these peptides, the elastin receptor complex, could constitute a novel therapeutic target to fight against this type of cancer for which no therapies are efficient now. In this study, we have developed therapeutic strategies targeting the ERC complex. We show for the first time that the therapeutic targeting of the ERC could efficiently limit melanoma progression in an *in vitro* and *in vivo* murine model. Additionally, as aging is one of melanoma major risk factors, we have evaluated the impact of stromal age on EDP effects and the associated tumor development.

Keywords: melanoma, ERC, elastin peptides, tumor stroma, aging

Unité Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire (MEDyC) – UMR URCA/CNRS 7369
Laboratoire Signalisation et Récepteurs Matriciels (SiRMa) Université de Reims Champagne Ardenne
UFR Sciences Exactes et Naturelles
Campus du Moulin de la Housse
BP 1039
51687 Reims cedex 2, France