



**HAL**  
open science

## Migration de cellules tumorales mammaire sur réseau en 3 Dimension et Mécanismes physiques de la protéolyse matricielle.

Noémie Ein-Eli

► **To cite this version:**

Noémie Ein-Eli. Migration de cellules tumorales mammaire sur réseau en 3 Dimension et Mécanismes physiques de la protéolyse matricielle.. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Cergy Pontoise, 2014. Français. NNT : 2014CERG0688 . tel-01296483

**HAL Id: tel-01296483**

**<https://theses.hal.science/tel-01296483>**

Submitted on 1 Apr 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

Spécialité  
Biochimie et Biologie Moléculaire

Ecole Doctorale **Sciences et Ingénierie (SI)**

Présentée par  
Noémie Ein-Eli

En vue de l'obtention du grade de  
DOCTEUR de l'UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

**Migration de cellules tumorales mammaires sur réseau en 3  
Dimensions  
Et  
Mécanismes physiques de la protéolyse matricielle.**

Soutenance prévue le 4 mars 2014 devant le jury composé de :

Juan Pelta	Directeur de thèse
Loïc Auvray	Rapporteur
Karim Boumediene	Rapporteur
Noureddine Lomri	Président du jury
Bénédicte Thiébot	Examinatrice
François Lallemand	Examineur



# Remerciement

Tout d'abord un grand merci au Professeur Juan Pelta, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir accueilli au laboratoire LAMBE, de ton implication, de ta patience, surtout dans l'explication de concept de biophysique (au vue de mes faibles connaissances du domaine). Merci de tes références filmographiques durant la correction de ce manuscrit, je ne ferais plus jamais de remake de Mars Attaque et je promets de faire attention au côté obscur de la force.

Je tiens particulièrement à remercier Madame le docteur Bénédicte Thiébot (alias dark suricate), on aura mis du temps à se trouver, mais depuis ça n'a été que grandes réflexions, travail acharné et surtout d'improbable fou rire (je sais que tu aimes me voir danser et chanter). Cette thèse a été un marathon et je n'aurai pas pu rêver meilleure encadrante. Gourou dark suricate, (oui, tu viens de gagner un échelon) je te remercie pour ta passion, tes conseils et pour ta patience. Faire une thèse à tes côtés était un grand plaisir et un honneur.

Au docteur Manuela Pastoriza Gallego, merci pour tout petit ours. Sans toi, les cookies, les fous rires (une espagnole qui tente l'accent allemand c'est inoubliable et magnifique), les coups de gueules et ton expertise en biologie moléculaire (il faut bien parler travail quand même) ma thèse aurait été incomplète et je n'aurais jamais été aussi bien dans le laboratoire.

Mes remerciements vont également au docteur Marie-France Breton pour toutes nos discussions qui m'ont énormément aidées à ne pas m'égarer dans des hypothèses improbables et merci d'être d'un calme olympien qui a toujours réussi à me détendre dans les moments de grand stress.

Merci au docteur Ghani Oukhaled, qui m'a été d'un grand secours dans les moments de solitude calculatoire. Egaleme nt merci d'être ce que tu es, un chercheur brillant et la personne la plus inventive que je connaisse.

Je souhaite remercier chacune des personnes du département biologie de l'université de Cergy-Pontoise. Merci Bruno Théophile alias Daddy de m'avoir toujours écoutée même si je parle beaucoup trop, merci Karine David et Caroline Ladurée de votre soutien et de l'aide que vous m'avez apportées.

Je souhaite également remercier les membres du Jury de thèse qui m'ont fait l'honneur de consacrer du temps à lire et juger ce travail.



Parce qu'une thèse ne se résume pas au travail mais également à énormément d'amitié, je tiens à remercier mes amies. Ounissa Nait Lhadj qui m'a supportée de jour comme de nuit, Perla El Hage qui a été mon soleil durant mon stage de master et une amie extraordinaire depuis le premier jour de notre rencontre. Merci à Pauline Tan d'être ma meilleure amie, une amie en or (120 carats au moins) et de m'écouter me plaindre inlassablement. Merci à Diane Nsotah, tu es une belle personne et ton courage à toute épreuve me font relativiser mes soucis. Tu as le cœur sur la main. Merci à Sonia, Delphine, Cécile et tous les autres.

Je ne saurais finir sans remercier ma famille en particulier mes sœurs. Merci du soutien et de la patience, même si je n'ai pas été très présente je vous porte dans mon cœur.

Un immense merci à tous ceux que j'ai cités et ceux que j'ai oubliés, sans vous je ne serais pas parvenu à réaliser cette thèse. Je vous dois, à tous, un peu de ce que je suis.



# Table des Matières

Introduction générale	1
<b>Chapitre I : La Matrice Extracellulaire (MEC)</b>	5
<b>I. Les grands types de MEC</b>	5
1. La MEC conjonctive	5
a. Organisation et composition	5
b. Modèle de matrice conjonctive <i>in vitro</i>	7
2. La lame basale	8
a. Organisation et composition	8
b. Modèle de lame basale <i>in vitro</i>	10
3. Modification moléculaire et physique des MEC dans le cancer	12
<b>II. Remodelage de la matrice extracellulaire par protéolyse</b>	14
1. De nombreuses classes d'enzymes interviennent dans le remodelage matriciel	14
2. Les Matrices Métallo-Protéases (MMPs)	16
a. Description/structure	16
b. Fonctions générales	17
c. Fonctions spécifiques des MMPS	19
d. Les MMPs, rôle promoteur ou inhibiteur de cancer ?	20
<b>Chapitre II : La cancérogénèse mammaire et le processus métastatique</b>	22
<b>I. La cancérogénèse</b>	22
<b>II. Les carcinomes mammaires</b>	23
1. Morphogénèse mammaire et remodelage matriciel	24
a. Morphogénèse, développement mammaire et histologie du sein	24
b. Remodelage matriciel physiologique	26
2. Cancérogénèse mammaire	28
a. Épidémiologie	28





<b>b. Outils/ critères de caractérisation des tumeurs mammaires utilisés en clinique</b>	28
1. Classification anatomo-pathologique	29
2. Stades et grades histologiques	30
3. Classement par analyse en immunohistochimie de biopsies	30
4. Les marqueurs sériques	32
<b>c. Outils développés en recherche</b>	33
1. Les Micro arrays à l'origine d'une nouvelle classification à partir de biopsies	33
2. Les Marqueurs protéiques en immunohistochimie sur biopsies	34
3. Les Micro-ARNs, marqueurs de diagnostic prometteurs sur biopsies ou liquides corporels	35
4. MMPs, en tant que marqueurs de diagnostic et/ou pronostic ?	38
<b>III. Modèles d'études du cancer</b>	42
1. Modèle d'étude <i>in vivo</i> , la xénogreffe sur modèle de souris	43
2. <i>In vitro</i> 2D 3D (lignées tumorales)	43
3. Modèles d'études développés au laboratoire pour classer les lignées tumorales	46
<b>Chapitre III : Biophysique de la migration cellulaire</b>	48
<b>I. Mouvements cellulaires</b>	48
1. Mouvement améboïde	48
2. Mouvement mésenchymateux	49
<b>II. Contraintes mécaniques et réponse tumorale</b>	52
<b>III. Dégradation enzymatique de gels de protéine.</b>	55
Matériel et Méthodes	62



## Résultats

<b>Première partie : Dégradation enzymatique de gels de protéine</b>	71
<b>I. Etude de l'<math>\alpha</math>-chymotrypsine</b>	72
1. Confirmation pour la dégradation enzymatique de gels de gélatine d'un mécanisme de diffusion anormale	73
2. Changement du mécanisme de diffusion de l'enzyme en fonction de la fraction volumique de gel	73
3. Cinétique limitée par la réaction ou la diffusion	75
4. Des interactions entre l'enzyme et le gel régissent-elles le changement de comportement diffusif de l'enzyme ?	77
<b>II. Etude de la papaïne</b>	79
1. Confirmation d'une diffusion Brownienne	79
2. Influence de la fraction volumique de gel sur le mode de diffusion de la papaïne	79
3. Cinétique limitée par la réaction	80
4. Interactions entre l'enzyme et le gel	81
<b>III. Etude de la protéinase K</b>	82
1. Un mécanisme de dégradation de la gélatine similaire à la chymotrypsine	82
2. Sensibilité de la protéinase K au milieu	83
<b>IV. Existe-t-il des interactions stériques ou électrostatiques responsables de ces mécanismes de dégradation ?</b>	84
<b>DISCUSSION</b>	86



<b>Deuxième partie : Migration de lignées issues de cancer du sein et caractérisation des MMPs majoritaires.</b>	94
<b>I. Migration des cellules sur et dans un gel 3D de Matrigel</b>	94
<b>II. Caractérisation des MMPs produites sur et dans des gels 3D par zymmographie</b>	96
<b>III. Expression des MMPs produites sur et dans des gels 3D par RT-PCRq</b>	97
DISCUSSION	100
Conclusion et perspectives	106
Références bibliographiques	111



# Introduction Générale

La matrice extracellulaire est assimilable à un gel et maintient la cohésion des tissus. Cette barrière physique constitue un obstacle à la migration cellulaire. Elle assure également le maintien de l'homéostasie en séquestrant et libérant si besoin des facteurs de croissance (VEGF, TGF- $\beta$ ...) et en interagissant avec les cellules.

*In vivo* il existe deux types de matrices extracellulaire (MEC) de composition différente : la matrice conjonctive qui entoure la majorité des cellules de l'organisme et se compose d'un réseau de protéines fibrillaires dont le collagène de type I, de molécules d'adhérence et de protéoglycane ; et la lame basale, qui est une matrice spécialisée, constituée principalement d'un réseau de collagène de type IV et de laminine. Les cellules épithéliales et endothéliales reposent sur cette lame basale, qui les sépare du tissu conjonctif sous-jacent hautement vascularisé.

Dans les cas de carcinomes, qui représentent 80% des cancers, la croissance tumorale et le processus métastatique nécessitent un remaniement des matrices conjonctives et des lames basales, facilitant l'invasion du tissu d'origine, l'entrée et la sortie du système vasculaire, ainsi que la colonisation d'un nouveau tissu. Ces processus sont complexes et impliquent une compréhension globale des interactions entre la matrice et les cellules. Les cellules cancéreuses et non cancéreuses, lorsqu'elles doivent migrer, maintiennent un équilibre entre une dégradation spécifique et restreinte de la matrice et des interactions avec les composants matriciels permettant l'adhérence et les mouvements de traction. Les enzymes majoritaires de ce processus sont les métalloprotéases matricielles (MMPs) ; d'autres protéases telles que des sérines protéases, des cystéines protéases interviennent également. Dans le processus de la formation d'une tumeur, un remaniement matriciel important a lieu, dû à la fois à la production de différentes protéases en quantité accrue, ainsi qu'à une modification de la synthèse des composants matriciels ; ces modifications sont à l'origine de la mise en place du stroma tumoral.

Afin de comprendre les principes de la migration cellulaire, de nombreuses études ont été effectuées sur support plastique (2D) parfois recouvert d'une fine couche de protéines matricielles.





Cependant, les comportements migratoires des cellules sur ces modèles sont différents de ceux observés *in vivo*. Pour cela des modèles 3D ont été mis en place pour se rapprocher d'un système physiologique tenant compte des contraintes exercées par la matrice sur les cellules et de la réponse cellulaire adaptée.

Les interactions cellulaires avec la MEC via l'application de forces mécaniques permettent la migration cellulaire par déformation de la cellule et du tissu environnant. Il existe deux types de mouvements pour la cellule : le mouvement améboïde, correspondant à un déplacement au travers des pores du réseau matriciel, permis par la plasticité cellulaire, et indépendant des protéases ; et le mouvement mésenchymateux, lié à la contraction des fibres de tension d'actine, qui est dépendant de l'activité protéolytique. L'utilisation différentielle de l'un ou l'autre des modes de déplacement dépend directement de la taille des pores formés par le réseau matriciel et de sa rigidité.

Depuis quelques années, des approches de biophysique cellulaire sont développées à la fois pour étudier le comportement mécanique d'une tumeur modèle, comme les sphéroïdes, ou d'une cellule unique (par AFM, aspiration avec micro-pipette, plots) et pour comprendre le lien entre la mécanique et le caractère tumoral. Par exemple, les cellules tumorales invasives, avec un cytosquelette moins organisé que les cellules normales, sont également moins rigides que ces dernières. Cependant, le processus physique par lequel les enzymes dégradent les matrices est très peu étudié au niveau expérimental. Il a été montré que la dégradation enzymatique de gels de protéines matricielles est une transition de phase gel-sol. Les gels de gélatine ont été utilisés pour les études suivantes. Ils sont formés à partir de collagène de type I dénaturé et miment la matrice conjonctive. Différentes endopeptidases modèles ont été testées, présentant des spécificités de coupure propres à chacune, et appartenant à différentes classes d'enzymes (métalloprotéinases, sérines protéases et cystéines protéases). Deux types de mécanismes ont été montrés à 1% de gélatine : un groupe d'enzyme modèles (thermolysine, protéinase K, trypsine,  $\alpha$ -chymotrypsine) dont la diffusion est ralentie et la cinétique limitée par la diffusion ; une enzyme, la papaïne, dont la diffusion est normale et la cinétique limitée par la réaction. A la suite de ces travaux de nouvelles questions sont apparues.

Quelle est l'influence du nombre de sites de coupure dans le processus de dégradation enzymatique ?

En fin de compte, existe-il un mécanisme universel ou un nombre restreint de mécanismes de solubilisation enzymatique des matrices extracellulaires ?



L'objectif premier de ce travail de thèse a donc été d'étudier le mécanisme de dégradation de gels de gélatine par différentes enzymes : l' $\alpha$ -chymotrypsine, la papaine et la protéinase K, et pour différentes fractions volumiques de gels de protéine. Le nombre de sites de coupure sur la gélatine est différent selon les protéases utilisées et nous permet de tester l'implication de ce paramètre dans le mécanisme qui régit la dégradation de gels de protéine. Pour chacune des enzymes et pour différentes concentrations en substrat gélifié, nous avons changé la viscosité du milieu réactionnel afin d'observer si la cinétique est limitée par la réaction ou la diffusion. De plus nous avons également tenté de connaître la nature des interactions qui régissent les mécanismes de diffusion de ces enzymes en changeant la force ionique, et donc les interactions électrostatiques de la solution, et en évaluant la charge de surface et le diamètre des enzymes utilisées.

L'étude que nous menons sur la compréhension des mécanismes physiques du remaniement matriciel est réalisée dans un système extrêmement simplifié qui s'affranchit de la complexité cellulaire. Pour complexifier le système, un test de migration cellulaire sur gel de Matrigel, rapide, fiable et discriminant vis-à-vis des capacités de migration des cellules tumorales appartenant à différents types de cancers, a été développé au laboratoire LAMBE. Un brevet est en cours d'étude. L'utilisation de Matrigel a été choisie pour mimer la lame basale, et reproduit l'environnement matriciel des cellules épithéliales normales et des cellules tumorales issues de carcinomes. Ce test, contrairement à celui classiquement utilisé par les laboratoires (les chambres de Boyden), permet de sonder la capacité migratoire de l'ensemble de la population cellulaire, d'une lignée tumorale ou même d'un mélange de cellules plus ou moins invasives. Dix pourcent seulement de cellules très invasives mélangées avec 90% cellules peu invasives peuvent être détectées. Nous envisageons de l'utiliser au laboratoire pour classer des lignées cancéreuses, et en clinique à partir, par exemple de biopsies, afin d'établir un pronostic de dangerosité de la population hétérogène testée.

Nous avons donc centré notre étude sur les carcinomes, et plus particulièrement dans le cadre de cette thèse, sur le cancer du sein. Il est la première cause de mortalité par cancer chez la femme ; il représente 33% des cancers féminins et 15% des cancers tout sexe confondu. Sa détection est facilitée par la systématisation de la mammographie mais la classification des cancers du sein reste difficile. Il existe plusieurs méthodes de classement utilisées en clinique. Tout d'abord, au stade de l'examen macroscopique et histologique, il existe le classement par stades et par grades. Au niveau immunohistochimique, la présence ou l'absence de récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone et à l'EGF-2 permet d'orienter la thérapeutique de la



patiente. Enfin, un classement sur la base du profil génétique de la tumeur primaire existe et commence à se développer au stade clinique. A l'heure actuelle, la caractérisation des tumeurs mammaires apparaît encore insuffisante et de nombreuses études sont en cours pour identifier de nouveaux outils de diagnostic et pronostic, et de nouvelles cibles thérapeutiques. Il s'avère de plus en plus nécessaire de caractériser les tumeurs avec précision afin de pouvoir adapter les traitements à chaque patiente.

Le second objectif de cette thèse a donc été de déterminer si le test développé par le laboratoire permettait d'identifier de nouveaux marqueurs du cancer mammaire. Les cellules sont, soit déposées sur une couche de Matrigel, soit emprisonnées entre deux couches de gels, en présence ou en absence de facteurs sériques. Six lignées cellulaires dérivant de carcinomes mammaires et une lignée présentant des caractéristiques de cellules épithéliales normales ont été choisies. Dans la littérature, des études ont montré que lorsque les cellules sont piégées dans un réseau 3D de Matrigel, la taille des cellules est inférieure à celle des pores formés par le Matrigel. Elles doivent migrer selon un mouvement de type mésenchymateux à l'aide de protéases solubles sécrétées ou associées à la surface cellulaire incluant les MMPs et les sérines protéases. Or, compte tenu de travaux antérieurs réalisés au laboratoire, il a été démontré que la migration des cellules dans notre système s'est avérée majoritairement MMPs dépendante. Nous avons donc testé la présence et le taux d'expression d'un ensemble de MMPs au niveau ARNm dans le but de dégager des marqueurs dont l'expression serait corrélée au caractère invasif des cellules tumorales.

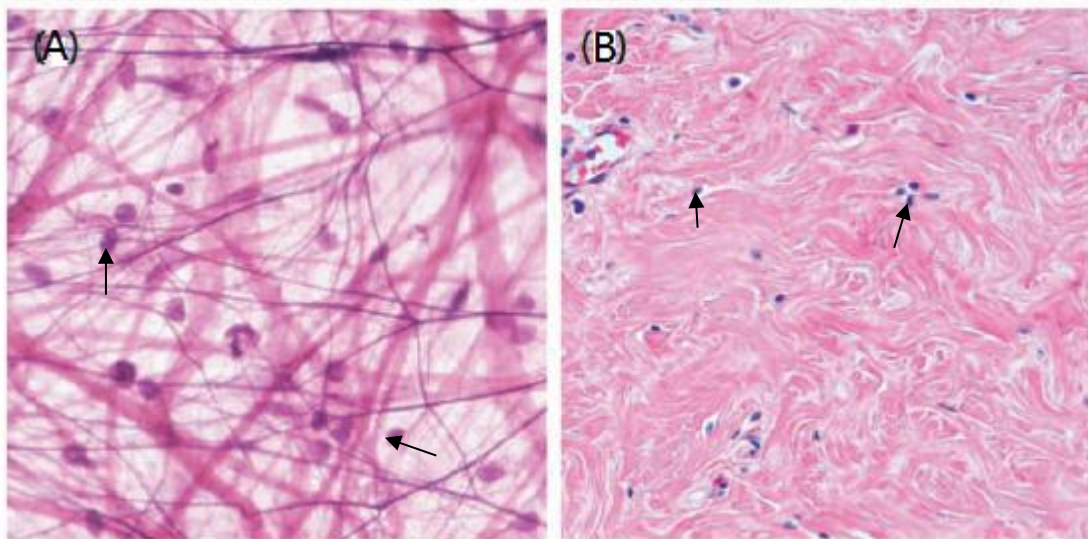


Figure 1: Architecture de la MEC conjonctive *in vivo*. (A) Tissu conjonctif aréolaire lâche, de mésentère (hématoxyline, éosine, argent et chlorure d'or, x40), montrant des fibres de collagène (bandes larges rose clair), des fibres élastiques (fines bandes rose foncé) et les fibroblastes (flèches). Notez l'orientation irrégulière des fibres et les grands espaces qui les séparent. (B) Tissu conjonctif dense irrégulier de la peau du mamelon (hématoxyline et éosine, x20). Les fibres de collagène sont orientées de façon irrégulière mais sont denses (Even-Rram et Yamada 2005).

# **Chapitre I : La Matrice Extracellulaire (MEC)**

La MEC est apparue durant l'évolution conjointement au développement des organismes multicellulaires. Elle se compose alors déjà d'une grande variété de protéines comme les collagènes, la laminine, l'élastine, les protéoglycanes. Ces molécules ont un rôle physique, en formant un réseau gelifié permettant la cohésion tissulaire de l'organisme et le développement des tissus. Mais elles ont aussi un rôle biologique, dans la régulation du phénotype cellulaire (forme, motilité...) (Tanzer, 2006).

La MEC est une structure dynamique en constante modification, laquelle est essentielle dans des processus tels que le remodelage de l'os adulte, de la glande mammaire, dans le développement embryonnaire incluant la migration des cellules de la crête neurale, dans l'angiogenèse... Ce concept de dynamique de la MEC est particulièrement important dans des processus rapides où des comportements cellulaires ont besoin d'être modifiés promptement et de façon transitoire, et dans lesquels les interactions cellule-cellule et cellule-matrice doivent constamment changer (Lu et al, 2011).

Puisqu'elle a un rôle régulateur sur les cellules composant les différents tissus, la MEC est spécialisée. C'est sa composition, et ses propriétés physiques qui vont déterminer le comportement cellulaire. Il existe deux grands types de MEC, la matrice conjonctive et la lame basale, étant elles-mêmes subdivisées en fonction des tissus qu'elles maintiennent.

## **I. Les grands types de MEC**

### **1. La MEC conjonctive**

#### **a. Organisation et composition**

La matrice conjonctive, également nommée matrice interstitielle, constitue la plus grande partie de la MEC corporelle. Elle est retrouvée dans les tissus conjonctifs de soutien ou spécialisés (tissus osseux, cartilagineux, adipeux, sanguin), composant les 2/3 de la masse corporelle chez l'Homme.

Les propriétés des tissus conjonctifs de soutien sont définies par le taux, le type et l'arrangement dans l'espace des molécules fibrillaires qui composent leur matrice (Culav et al, 1999), permettant ainsi de définir des sous types tissulaires : le tissu conjonctif lâche, majoritaire, et le tissu conjonctif dense ou fibreux, qui constitue les tendons et les ligaments (Figure 1) (Langevin, 2006).



Type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Tissue distribution
<i>Fibril-forming collagens</i>			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	bone, dermis, tendon, ligaments, cornea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	cartilage, vitreous body, nucleus pulposus
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
V	$\alpha 1(V),\alpha 2(V),\alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2–q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	cartilage, vitreous body
<i>Basement membrane collagens</i>			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36–q37) COL4A4 (2q36–q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	basement membranes
<i>Microfibrillar collagen</i>			
VI	$\alpha 1(VI),\alpha 2(VI),\alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
<i>Anchoring fibrils</i>			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	skin, dermal–epidermal junctions; oral mucosa, cervix,
<i>Hexagonal network-forming collagens</i>			
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_2\alpha 2(VIII)$	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	endothelial cells, Descemet's membrane
X	$[\alpha 3(X)]_3$	COL10A1 (6q21–q22.3)	hypertrophic cartilage
<i>FACIT collagens</i>			
IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	cartilage, vitreous humor, cornea
XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	COL12A1 (6q12–q13)	perichondrium, ligaments, tendon
XIV	$[\alpha 1(XIV)]_3$	COL9A1 (8q23)	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lungs, liver
XIX	$[\alpha 1(XIX)]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	human rhabdomyosarcoma
XX	$[\alpha 1(XX)]_3$		corneal epithelium, embryonic skin, sternal cartilage, tendon
XXI	$[\alpha 1(XXI)]_3$	COL21A1 (6p12.3–11.2)	blood vessel wall
<i>Transmembrane collagens</i>			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	COL13A1 (10q22)	epidermis, hair follicle, endomysium, intestine, chondrocytes, lungs, liver
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	COL17A1 (10q24.3)	dermal–epidermal junctions
<i>Multiplexins</i>			
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	COL15A1 (9q21–q22)	fibroblasts, smooth muscle cells, kidney, pancreas,
XVI	$[\alpha 1(XVI)]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	COL18A1 (21q22.3)	lungs, liver

Given are the molecular composition, the genomic localization of the different chains as well as the basic tissue distribution.

Figure 2 : Différents types de collagènes classés selon leur organisation moléculaire ou supramoléculaire (Gelse et al, 2003).

Les protéines qui s'organisent en fibres, sont les collagènes de type I, de type III (ou réticuline), et l'élastine. D'autres molécules, telles que fibronectine, tenascine et protéoglycanes, réticulent la matrice pour maintenir son intégrité et /ou se lient aux récepteurs cellulaires afin de favoriser l'ancrage cellule-matrice.

Les collagènes fibrillaires appartiennent à la superfamille des collagènes qui contient au moins 19 protéines formellement identifiées comme des collagènes et 10 protéines contenant des domaines assimilés à cette famille. Les collagènes sont les plus abondantes protéines de la MEC et tendent à avoir une structure unique et complexe (Tanzer 2006). En effet, la présence d'un ou plusieurs domaines de triple hélice.

Cette superfamille peut se diviser en classes liées à leur organisation ou à leur structure polymérisée (Figure 2). On distingue les collagènes fibrillaires, les collagènes en réseau, les collagènes associés aux fibrilles et les collagènes transmembranaires. Les collagènes se composent de trois sous-unités  $\alpha$  enroulées entre elles sous forme de torsade et stabilisées par la présence de glycine tous les 3 résidus (Prockop 1995). La chaîne  $\alpha$  possède de 662 ( $\alpha 1$  humain) à 3152 acides aminés ( $\alpha 3$  humain). Elle est disposée en une hélice tournée vers la gauche avec trois acides aminés par tour (Ricard-Blum 2011). Une chaîne  $\alpha$  est composée d'une série de triplets d'acides aminés Gly-X-Y, dans lesquels X et Y peuvent être n'importe quel acide aminé, bien que X soit pour 30% de la proline et Y pour 30% de l'hydroxyproline (Canty et Kadler 2005, Van der Rest et al 1991). L'emplacement du résidu 3-hydroxyproline, participant à la formation d'assemblages supramoléculaires en fibres, a été identifié dans le collagène I, II, III et V/XI (Ricard-Blum 2011).

Parmi les collagènes fibrillaires présents dans les tissus de soutien, le collagène de type I est prédominant. Par ailleurs, il représente 90% des collagènes présents dans tout l'organisme. Composé de deux sous unités  $\alpha 1$  et d'une sous-unité d' $\alpha 2$ , il est à 96 % structuré en hélice. Après avoir été sécrétées dans l'espace extracellulaire, les molécules de procollagène vont subir un clivage protéolytique aux extrémités N et C terminales, leur permettant de s'assembler en fibrilles, allant de 15 à 500 nm de diamètre, voir plus selon les tissus (Figure 3) (Ricard-Blum 2011). Il forme des micro-fibrilles de 5 molécules en supertour interagissant avec les micro-fibrilles voisines pour former des faisceaux plus larges de types câbles, de plusieurs micromètres de diamètre (Ricard-Blum 2011).

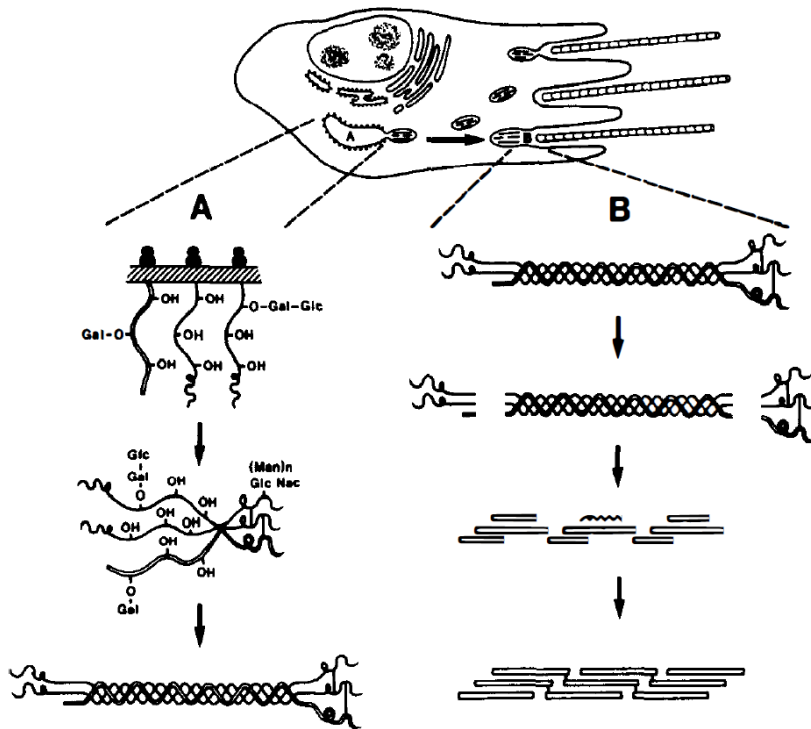


Figure 3 : Schéma de la biosynthèse des collagènes fibrillaires. (A) Evènements intracellulaires incluant hydroxylation et glycosylation post-traductionnelle, association des chaînes polypeptidiques et formation de la triple hélice. (B) Evènements extracellulaires : clivage des pro-peptides N et C-terminaux, auto-assemblage des molécules de collagène en fibrille, et cross-linking pour leur stabilisation (Prockop 1995).

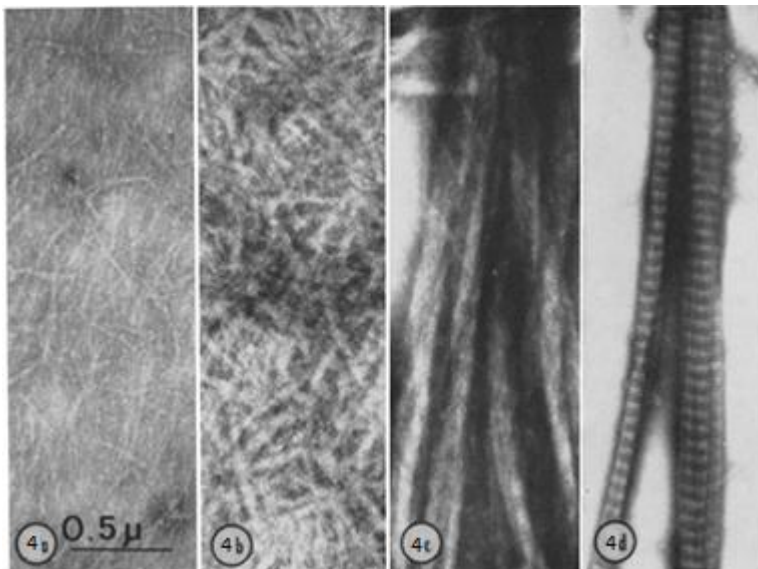


Figure 4 : Assemblage *in vitro* de molécules de collagène de type I à partir d'une solution initiale à 1mg/mL en condition acide au cours du temps. 2a : stade initial t=15 minutes, 2b et c : croissance des fibrilles à t=30 et 90 minutes respectivement, 2d faisceau de collagène de type I au temps 24 heures (Elsdale et Bard 1972).

Dans les tissus animaux, les organisations tridimensionnelles des fibrilles de collagène dans les matrices extracellulaires aboutissent à des motifs réguliers biréfringents à l'intérieur des coupes de tissus observés par lumière polarisée en microscopie. Certaines géométries présentent une torsion cholestérique périodique entre les fibrilles dans des phases cristallines liquides et ayant des diamètres de 100 nm ou plus (Giraud-Guille et al 2008).

#### **b. Modèle de matrice conjonctive *in vitro***

Le collagène de type I étant le composant majoritaire des tissus conjonctifs, il est utilisé comme modèle de matrice simplifiée, notamment dans les tests de migration cellulaire, pour former un gel 3D « *in vivo*-like ». Des solutions de collagène de 0,6 à 3,5 mg/ml polymérisent *in vitro* pour former des fibres lisses de 50-300nm de diamètre qui multimérisent en faisceaux de fibres de 100-1000nm de diamètre. Le degré de polymérisation dépend de la concentration en collagène utilisé (Friedl et Brocker 2000). A partir d'une solution de collagène I à 1 mg/ml, les chaînes de collagène libres en solution (Figure 4a) s'assemblent progressivement en triple hélice (Figure 4b) qui s'orientent et s'organisent pour former des fibrilles de 80 à 90 nm (Figure 4c) et par rapprochement de ces fibrilles forment une longue structure lisse de 350nm de diamètre (Figure 4d).

Quelques exemples illustrent l'utilisation de gels de collagène I comme modèle de matrice conjonctive. Historiquement, les premiers tests de migration cellulaire ont utilisé un système de matrice de collagène de type I polymérisé *in vitro* pour former un réseau tridimensionnel dans lequel ont été placés des fibroblastes. Ce gel induit des changements morphologiques cellulaires mimant le tissu conjonctif *in vivo* (Elsdale et Bard 1972), et valide son utilisation comme modèle simplifié de matrice reconstituée.

Une étude ultérieure montre que des fibroblastes inclus dans une matrice 3D de collagène induisent l'expression de la MMP-13 activant des récepteurs de types intégrines ( $\alpha1\beta1$  et  $\alpha2\beta1$ ). L'intégrine  $\alpha1\beta1$  est impliquée dans la régulation de la contraction du gel et la migration fibroblastique. L'état du gel (contracté ou relaxé c'est à dire sans attache à la plaque sous-jacente) induit des états de tension cellulaire différents et des réponses cellulaires variables. Par exemple, si le gel est tendu, un signal de prolifération est perceptible. A l'inverse, lorsque les fibroblastes sont inclus dans un gel lâche, les cellules entrent en apoptose (Cukierman et al 2002). Les propriétés physiques du gel influent sur le comportement de cellules piégées dans le réseau 3D.

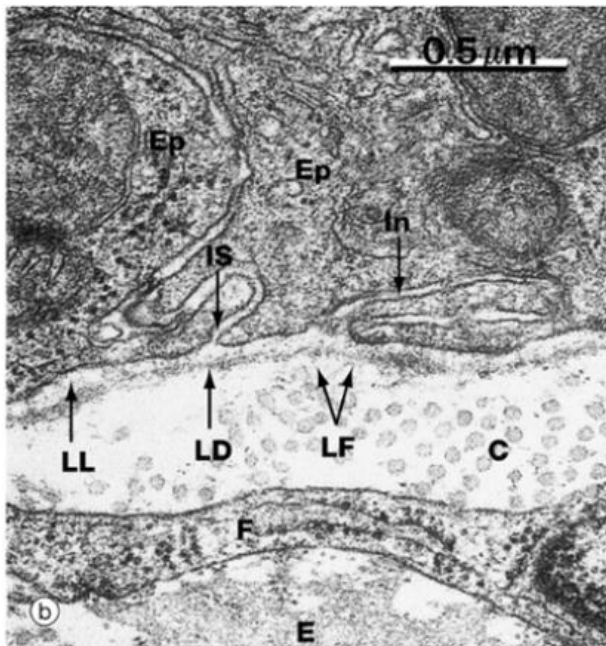


Figure 5 : Les trois feuillets de la membrane basale de l'épithélium de la trachée de souris. La lamina lucida (LL) est en contact avec la membrane des cellules épithéliales basales (Ep). La couche intermédiaire est dense aux électrons et représente la lamina densa (LD). Au-delà de la lamina densa, la lamina fibroreticularis (LF), relativement permmissive aux électrons, ne présente pas de limite distincte avec la matrice conjonctive sous-jacente. Dans cette dernière, se trouvent des fibrilles de collagène (C), des fibroblastes (F) et de l'élastine (E)

(<https://www.inkling.com/read/wheaters-functional-histology-atlas-young-5th/chapter-4/basement-membranes>).

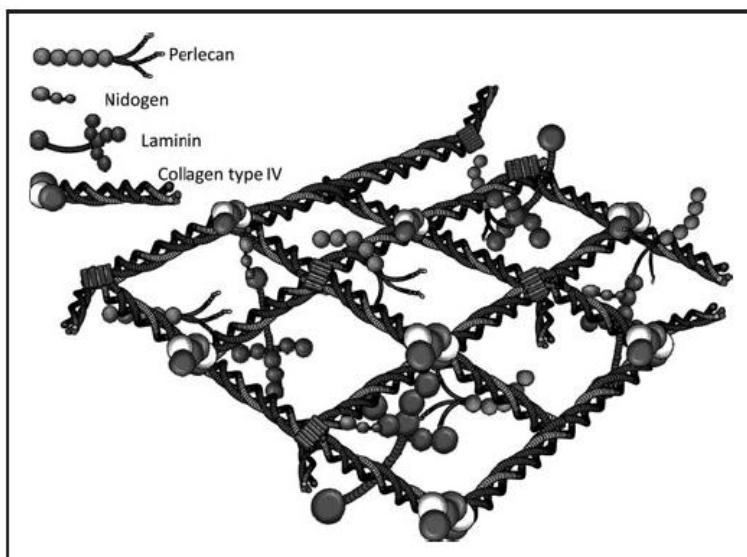


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire de la lame basale (lamina densa) (Karsdal et al 2013).

Concernant les tests sur lignées cellulaires cancéreuses, des observations en microscopie optique de cellules cultivées sur un gel de collagène 3D sur une période de 30h ont permis de révéler des cinétiques de comportement migratoire en fonction du potentiel invasif des lignées tumorales. Il a été observé la disparition des cellules de la surface du gel. Les lignées MDA-MB-231 et MCF-7 sont des lignées issues de carcinome mammaire et les LS180 et HT29 sont des lignées de cancer du côlon. Les MDA-MB-231 disparaissent plus rapidement de la surface du gel que les MCF-7 suggérant un potentiel invasif plus important. De même, les cellules LS180 semblent plus invasives sur ce modèle que les cellules HT29 (Sakai et al 2011).

## 2. La lame basale

### a. Organisation et composition

Les lames basales sont de fins feuillets de MEC entourant quelques types cellulaires (cellules musculaires, adipocytes, cellules de Schwann) ou se trouvant du côté basal de tous les épithéliums de revêtement et glandulaires. D'après la microscopie électronique à transmission, la taille des lames basales varie de 100nm, en moyenne, à 10 $\mu$ m pour la plus épaisse (située au niveau de l'œil) (Halfter et al 2013). Elles sont principalement composées de collagène de type IV, laminine, entactine (nidogène) et perlecane (un protéoglycane) (Timpl 1996, Tanzer 2006) et forment trois feuillets (Figure 5). La lamina lucida (10 à 50nm) est constituée de glycosaminoglycanes en contact avec les cellules épithéliales. La lamina densa (20 à 300nm, le plus souvent 50nm) est un feutrage de collagène IV et de glycoprotéines (Inoué et al 1983). Ces molécules assurent l'ancrage des cellules à la lame basale. La lamina fibro-reticularis (de 200 à 500nm) fusionne avec le tissu de soutien (<https://www.inkling.com/read/wheaters-functional-histology-atlas-young-5th/chapter-4/basement-membranes>).

L'une des caractéristiques architecturales majeures des lames basales (plus particulièrement le feuillet lamina densa) est qu'elles sont constituées de deux réseaux moléculaires, l'un formé de collagène de type IV et l'autre de laminine (Figure 6). Le réseau de collagène est très réticulé et maintient la stabilité mécanique de ce feuillet ; le réseau de laminine permet l'ancrage aux cellules épithéliales (ou aux cellules adipeuses, musculaires..) via l'interaction avec des récepteurs de type intégrine (Halfter et al 2013).

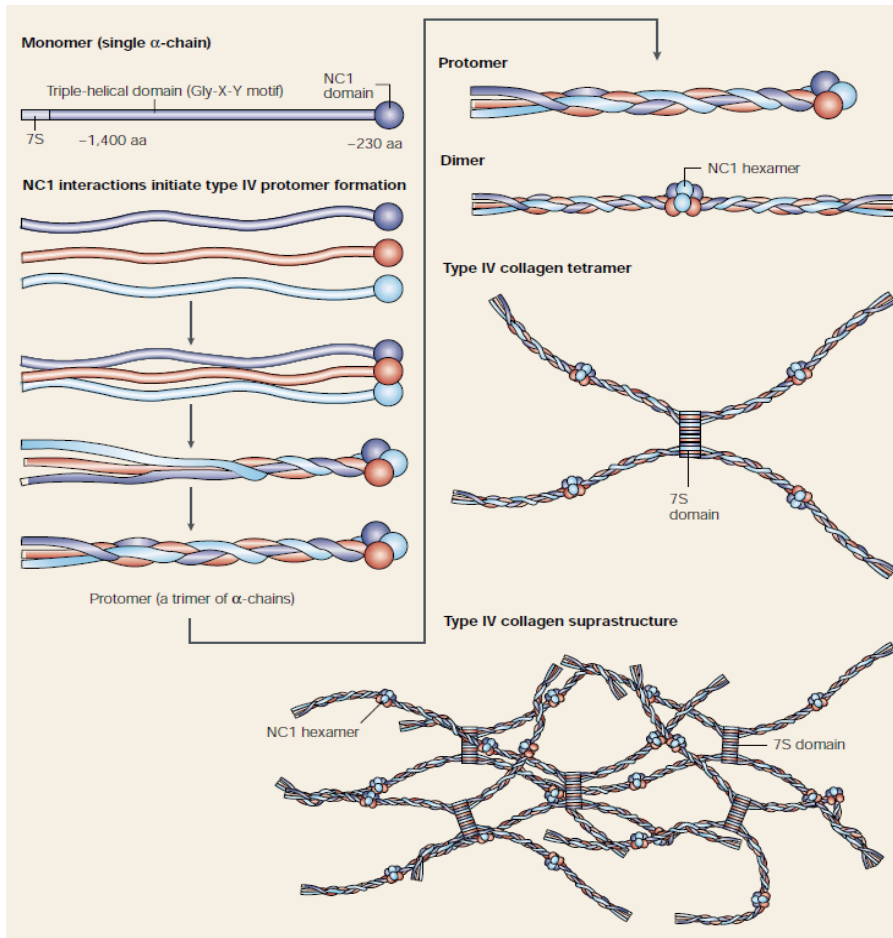


Figure 7 : Formation du réseau de collagène de type IV. Toutes les chaînes ont une structure en 3 domaines : 7S, en triple hélice et NC1. La formation d'une structure trimérique commence par l'interaction des domaines NC1 pour former un protomère. A l'extérieur de la cellule, les protomères de collagène IV se dimérisent par l'interaction de leur domaine NC1 et se tétramérisent par l'interaction de leur domaine 7S. L'ensemble évolue vers une suprastructure (Kalluri 2003).

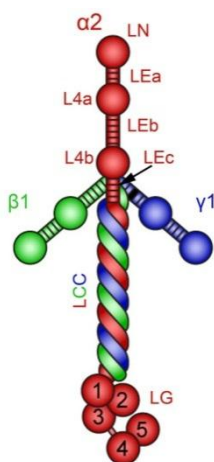


Figure 8 : Représentation schématique de la laminine-111 de structure hétérodimérique. La chaîne  $\alpha 2$  est en rouge, la  $\beta 1$  en vert et la  $\gamma 1$  en bleu (Gawlik et Durbeej 2011).

Le collagène de type IV est la protéine majoritaire des lames basales. Il est codé par 6 gènes différents (COL4A1-COL4A6) dont les sous-unités  $\alpha$  produites peuvent former 3 hétérodimères différents. Chaque chaîne possède trois domaines structurellement distincts. Un domaine amino-terminal riche en cystéine et lysine, un domaine majeur collagénique de 1400 résidus, composé de répétition Gly-X-Y, et un long domaine carboxy-terminal non collagénique. Une caractéristique propre au collagène IV est la présence de 21 à 26 interruptions dans la répétition Gly-X-Y dans le domaine collagénique permettant la formation de triples hélices imparfaites nécessaires à la flexibilité du réseau, mais également à l'adhérence cellulaire et aux liaisons interchaînes (Khoshnoodi et al 2008). Il ne s'assemble pas en fibre comme le collagène de type I mais forme un réseau entrelacé (Figure 7) qui se superpose en plusieurs couches pour former un feuillet. Cette structure est résistante aux collagénases et ne sera pas modifiée après assemblage. Pour la formation du réseau de collagène IV (Figure 7), quatre molécules s'assemblent via leur domaine 7S amino-terminal pour former des tétramères. Deux molécules peuvent interagir également via les domaines NC1 (Non Collagenous). Cet assemblage produit ainsi des hexamères stabilisés par une réticulation via des liaisons covalentes, se liant entre eux à d'autres hexamères (Ricard-Blum 2011).

Le deuxième type de composant majeur, spécifique des lames basales, est représenté par les laminines. Elles regroupent une large famille de protéines hétérotrimériques constituées de l'assemblage de 3 chaînes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Elles se présentent sous la forme d'une protéine en croix (400-800kDa) avec des ponts disulfures reliant des chaînes de 100 à 400 kDa entre elles (Figure 8). Il existe 5 formes de chaînes  $\alpha$ , 3 formes de chaînes  $\beta$  et 3 formes de chaînes  $\gamma$ , qui en s'assemblant peuvent constituer 16 isoformes de laminine (en incluant la laminine-111 issue de sarcome) (Figure 9) (Patarroyo et al 2002, Hohenester et Yurchenco 2013).



Component	Composition	Major Site(s) of Expression
Laminin 1	$\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$	Developing epithelia
Laminin 2	$\alpha 2 \beta 1 \gamma 1$	All myogenic tissues, peripheral nerves
Laminin 3	$\alpha 1 \beta 2 \gamma 1$	Myotendinous junction
Laminin 4	$\alpha 2 \beta 2 \gamma 1$	Neuromuscular junction, mesangial matrix of glomerulus
Laminin 5	$\alpha 3 \beta 3 \gamma 2$	Epidermis
Laminin 6	$\alpha 3 \beta 1 \gamma 1$	Epidermis
Laminin 7	$\alpha 3 \beta 2 \gamma 1$	Epidermis
Laminin 8	$\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$	Endothelium, smooth muscle, adipose tissue, peripheral nerves
Laminin 9	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 1$	Endothelium, smooth muscle, neuromuscular junction, mesangial matrix of glomerulus
Laminin 10	$\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$	Mature epithelium, mature endothelium, smooth muscle
Laminin 11	$\alpha 5 \beta 2 \gamma 1$	Mature epithelium, mature endothelium, smooth muscle, neuromuscular junction, glomerular basement membrane
Laminin 12*	$\alpha 2 \beta 1 \gamma 3$	Surface of ciliated epithelia
Laminin 13	$\alpha 3 \beta 2 \gamma 3$	Central nervous system/ retina
Laminin 14	$\alpha 4 \beta 2 \gamma 3$	Central nervous system/ retina
Laminin 15	$\alpha 5 \beta 2 \gamma 3$	Central nervous system/ retina

Figure 9 : Description de la composition des principales laminines des lames basales et leurs localisations tissulaires (Hallmann et al 2005).

Classification	Description
Abundant components	Laminin
	Collagen Type IV
	Perlecan (heparan sulfate proteoglycan)
	Entactin/nidogen
Growth factors	FGF
	EGF
	TGF-beta
	PDGF
	IGF
Proteases and other components	MMP-2 (72 kDa)
	MMP-9 (92 kDa)
	Urokinase
	TPA (tissue type plasminogen activator)
	Transferrin
	Clusterin

Figure 10 : Composition du Matrigel (Benton et al 2011).

Les laminines sont majoritairement responsables de l'ancrage des cellules épithéliales à la lame basale en se liant aux intégrines, mais également à d'autres récepteurs membranaires tel que l' $\alpha$ -dystroglycane (Barresi et Campbell 2006). Le domaine d'interaction aux intégrines est présent dans les chaînes  $\alpha$ , et plusieurs types d'intégrines (majoritairement  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha6\beta1$ ,  $\alpha7\beta1$  et  $\alpha6\beta4$ ) sont capables de reconnaître les différentes isoformes de laminine (Patarroyo et al 2002 Hohenester et Yurchenco 2013).

Les mutations touchant les intégrines ou l' $\alpha$ -dystroglycane ont des conséquences proches ou identiques à des mutations clés des composants de la lame basale. L'importance des lames basales est telle que les mutations la touchant sont soit létales dès le stade fœtal, soit résultent en de graves maladies (dystrophie musculaire, cécité, anomalies cardio-vasculaires) (Halfter et al 2013, Timpl 1996, Tanzer 2006, Ricard-Blum 2011, Kalluri 2003).

La lame basale, à l'interface épithélium/mésenchyme est synthétisée en coopération entre les cellules épithéliales et celles du tissu conjonctif sous-jacent. Son importance dans le maintien de la cohésion de ces tissus est primordiale. En étant située à l'interface entre des tissus non-vascularisés (épithéliums) et ceux vascularisés (tissus conjonctifs), la lame basale contrôle les échanges entre les vaisseaux sanguins et l'épithélium (Kalluri 2003). Elle joue ainsi un rôle de filtre moléculaire majoritairement grâce à la présence des protéoglycanes (Aumailley et Verrando 1993). L'endothélium vasculaire repose également sur une lame basale. Les cellules endothéliales sont quiescentes lorsqu'elles sont liées à la lame basale capillaire, indiquant que le signal primaire provenant de celle-ci inhibe la prolifération et favorise les interactions cellules-cellules (Carmeliet et Jain 2000).

### **b. Modèle de lame basale *in vitro***

Dans le but d'étudier divers phénomènes physiologiques et pathologiques (angiogénèse, tumorigénèse...) un modèle d'étude de lame basale a été mis au point à partir d'une tumeur murine à MEC très abondante, originellement identifiée comme un chondrosarcome faiblement différencié (tumeur EHS). Les analyses de cette matrice ont montré qu'elle était distincte de la matrice cartilagineuse d'où était extraite la tumeur et s'apparentait à une lame basale. En effet, les constituants identifiés ont été des laminines, du perlécane, du collagène de type IV (Figure 10).

Examples of how basement membrane promotes differentiation in vitro

Cells/explant	Response
<b>Cell lines</b>	
Prostate <sup>a</sup>	Acinar formation, glands
Salivary <sup>a</sup>	Acinar formation, amylase production
Mammary epithelial <sup>a</sup>	Duct and lumina formation, increased casein
MDCK <sup>a</sup>	Polarized cyst
Pancreas <sup>a</sup>	Acinar differentiation
Schwann cells <sup>a</sup>	Differentiation
Intestinal cells <sup>a</sup>	Differentiation
Bone cells	Canaliculi formation
<b>Primary cells</b>	
Sertoli	Columnar epithelium
Hepatocytes <sup>a</sup>	Morphology maintained, albumen production
Chondrocytes	Cartilage formation
Endothelial cells <sup>a</sup>	Capillary tubes with lumen
Endometrial cells	Columnar epithelium, glands
Oviduct epithelium	Tubes with ciliated cells
<b>Tissue explants</b>	
Neural crest	Outgrowth
Dorsal root ganglia	Outgrowth with myelin production
Immature follicles	Hair growth
Aortic rings	Vessel outgrowth
Ookinetes (zygote)	Sporogonic development of malaria parasite

<sup>a</sup> Denotes activity with both primary cells and cell lines.

Figure 11 : Exemples montrant comment la lame basale favorise la différenciation cellulaire *in vitro* (Kleinman et Martin 2005).

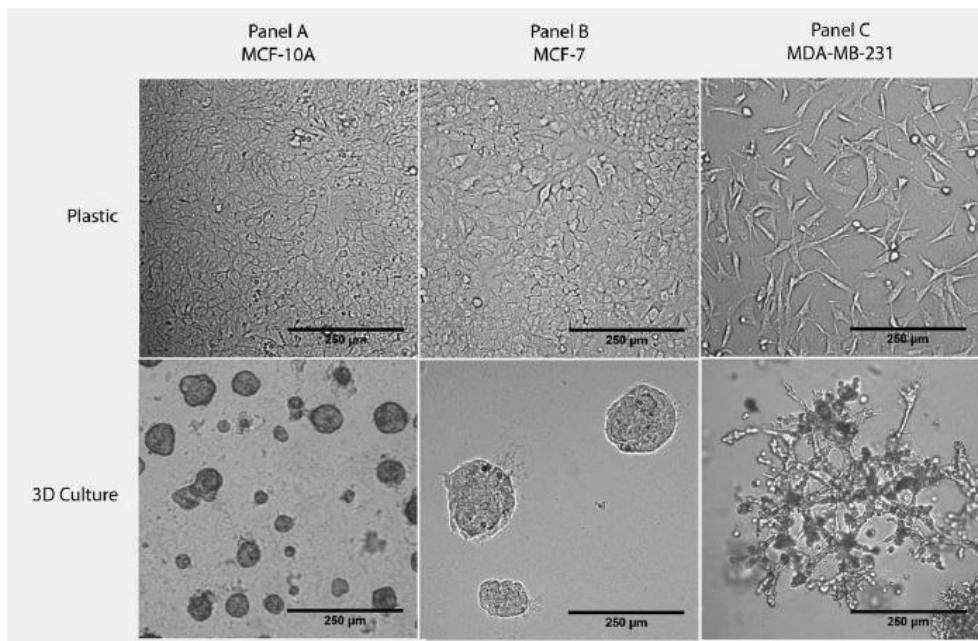


Figure 12 : Apparence de cellules épithéliales mammaires « normales » et cancéreuses sur plastique ou Matrigel. Panel A : lignée épithéliale normale (MCF-10A), Panel B : lignée cancéreuse mammaire (MCF-7), Panel C : lignée de cancer du sein métastatique (MDA-MB-231) (Benton et al 2011).

Cette matrice sert actuellement de base à la préparation du Matrigel, gel commercialisé le plus utilisé pour étudier la migration, l'adhérence et la différenciation de divers types cellulaires. On note la présence de facteurs de croissance et de protéases dans cette préparation (Figure 10). Ce gel reste liquide à 4°C pour gélifier en condition physiologique (24-37°C).

Lorsque des cellules endothéliales ou épithéliales sont cultivées sur ce gel 3D, une forte différenciation cellulaire et une prolifération réduite ont pu être observées. A titre d'exemple, les cellules endothéliales forment rapidement des structures ressemblant à des capillaires. De même, des cellules épithéliales mammaires s'organisent en structures proches d'acini produisant des protéines du lait (Figure 11) (Kleinman et Martin 2005).

Cette lame basale reconstituée a également été utilisée avec des cellules cancéreuses mammaires, pour mettre en place un test de caractérisation de potentiel invasif. Contrairement à ce qui est observé sur plastique de culture, où les cellules présentent une croissance et une morphologie non corrélées à leur potentiel invasif, lorsqu'elles sont cultivées sur gel 3D de Matrigel, les cellules à fort potentiel invasif forment des structures larges et branchées là où les cellules les moins invasives forment des petits amas (Figure 12) (Benton et al 2011).

Puisque les compositions moléculaires (et les propriétés physiques) des gels 3D de Matrigel et ceux formés par le collagène I sont différentes, les mécanismes cellulaires et moléculaires gouvernant la migration sont différents. Des intégrines spécifiques sont engagées, mobilisant leurs voies de signalisation. De même, les protéases impliquées seront différentes, en fonction de leurs spécificités de dégradation (Friedl et Bröcker 2000). Ces deux types de matrice 3D reconstituées constituent des modèles simplifiés pour étudier *in vitro* des réponses cellulaires qui impliquent soit des matrices conjonctives, soit des lames basales. Dans le cas des cancers, les MEC sont modifiées sous l'influence directe des cellules tumorales, ou sous celle des cellules du stroma tumoral.



### 3. Modification moléculaire et physique des MEC dans le cancer

La MEC constitue une véritable barrière à franchir et représente un obstacle à la migration des cellules cancéreuses. La lame basale est une structure dense favorisant l'adhésion épithéliale, permettant le maintien des cellules épithéliales et stromales dans leur environnement respectif, de part et d'autre de cette dernière. La membrane basale est modifiée tout au long de la progression tumorale, tant dans sa structure que dans sa composition. Par exemple, le collagène de type VII n'est plus sécrété dans les cas de carcinomes mammaires et de mélanomes, alors qu'il favorise l'ancrage de la lame basale au tissu de soutien (Wetzels et al 1991). Certaines études ont montré la présence atypique de chaînes  $\alpha 3$  du collagène de type IV autour de cellules néoplasiques tumorales dans le cas de cancer broncho-pulmonaire. L'organisation des chaînes  $\alpha 1$  de ce même collagène devient anarchique en périphérie des tumeurs (Polette et al 1994). De même, dans les cancers gastriques, pancréatiques et hépatiques, les laminines sont majoritairement exprimées au pôle invasif tumoral mettant en avant la laminine 5 comme marqueur de l'invasion (Tani et al 1997).

Des modifications importantes vont également avoir lieu dans le tissu conjonctif, avant et après rupture de la lame basale par les cellules épithéliales tumorales. En effet, dans le stade précoce de développement des carcinomes, la tumeur reste séparée du tissu conjonctif par le maintien de la lame basale, on parle de carcinome *in situ*. Cependant, les cellules tumorales influencent, par des facteurs diffusibles, le remaniement du stroma, qui se traduit par l'activation des fibroblastes dont le nombre augmente, par le recrutement de cellules inflammatoires, par le développement de nouveaux vaisseaux sanguins et par des modifications de la matrice conjonctive. On parle alors de stroma réactif (Kalluri et Zeisberg 2006). Dans les carcinomes invasifs, les cellules épithéliales cancéreuses franchissent la lame basale, et envahissent le stroma réactif du tissu conjonctif sous-jacent qui devient alors le stroma tumoral.

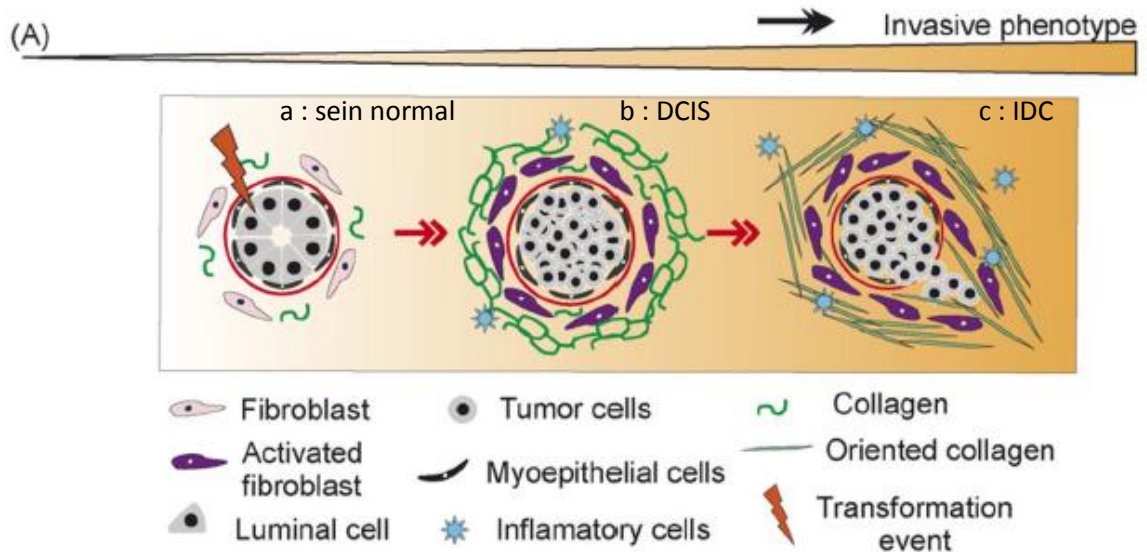


Figure 13: Représentation schématique de la transformation du stroma conjonctif, en réponse aux altérations des cellules épithéliales mammaires dans le cas d'un carcinome canalaire. Cette réponse du stroma se caractérise par l'activation des fibroblastes, l'infiltration des cellules du système immunitaire, la sécrétion accrue de facteurs de croissance et cytokines, et l'augmentation de la synthèse et du remodelage de la matrice qui se manifeste par une augmentation de sa rigidité.

a : dans le sein normal, l'épithélium canalaire et le myoépithélium sous-jacent sont séparés du tissu conjonctif par une lame basale. b : lors d'un DCIS (ductal carcinoma in situ), les cellules de carcinome prolifèrent dans la lumière du canal. La lame basale est altérée par endroit mais maintient l'étanchéité tissulaire, et la matrice conjonctive est modifiée. c : Lorsque le carcinome canalaire devient invasif (IDC), la lame basale est rompue (Kass et al 2007).

Tissue or Material	Elastic Modulus (Pa)
Normal Mammary Gland	167 ± 31
Average Tumor (Ras, Myc, Her2/Neu)	4049 ± 938 **
Stroma Attached to Tumor (Ras, Her2/Neu)	918 ± 269 **

Figure 14 : Module élastique d'une glande mammaire de souris normale, et d'une tumeur issue de souris transgénique MMTV-Her2/neu, Myc et Ras (Paszek et al 2005).

La Figure 13 illustre ce processus dans le cas du cancer du sein de type canalaire. Le stroma adjacent à la tumeur au stade carcinome canalaire *in situ* (DCIS) est modifié, montrant une augmentation du nombre des fibroblastes, et de vaisseaux sanguins, ainsi qu'une densification de la MEC par production accrue de fibronectine et de fibres de collagène de type I (Figure 13b). Plutôt que de s'organiser en fibrilles non orientées et relâchées, ces fibrilles de collagène I vont progressivement s'orienter soit parallèlement à l'épithélium, ou soit sont projetées perpendiculairement dans le tissu (Lu et al 2011). Lors de la rupture de la lame basale, marquant la transition vers un carcinome canalaire invasif (IDC) (Figure 13c), les cellules tumorales envahissent le stroma réactif et utilisent les fibres de collagènes de type I pour orienter leur migration (Kalluri et Zeisberg 2006). Wolf et al (2007) ont identifié deux modes de collagénolyse péricellulaire avec des résultats distincts : d'une part, des cellules isolées transforment le réseau fibrillaire de collagène de type I organisé de façon aléatoire et provoquent une réorientation des fibres. Le deuxième mode, est une dégradation uniforme à plus grande échelle, réalisée par un groupe de cellules qui maintiennent des interactions cellules-cellules entre-elles. Les deux modes d'invasion protéolytiques sont interdépendants et exigent l'intervention de la MT1-MMP : le premier type génère un micro-modelage matriciel et facilite le mouvement de cellules uniques, alors que le deuxième type permet un agrandissement des lacunes pré-existantes dans le tissu et favorisant le mouvement d'une masse tumorale. (Wolf et al 2007).

Le remaniment matriciel associé au développement de la tumeur s'accompagne d'une augmentation de la rigidité tissulaire. En effet, des mesures de module élastique, ont été réalisées afin de comparer la rigidité d'un tissu normal ou tumoral, et celle du stroma associé aux tumeurs mammaires. Elles montrent que la cancérogénèse est associée à une augmentation de la rigidité tissulaire globale qui est majoritairement due à une rigidification de la MEC tant au niveau tumoral qu'à celui du stroma péri-tumoral (Figure 14) (Larsen et al 2006).



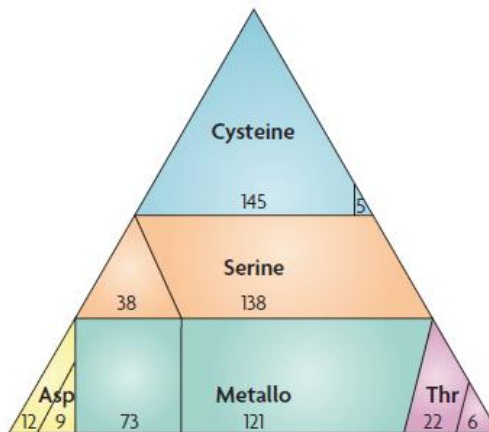


Figure 15 : Classification des protéases humaines. Il en existe 5 catégories : les métalloprotéases, les sérines protéases, les cystéines protéases, les thréonines protéases et les aspartates protéases. Pour chaque catégorie, les chiffres à gauche indiquent les enzymes intracellulaires ou membranaires, et ceux à droite les enzymes péri- ou extracellulaires (López-Otín et Matrisian 2007).

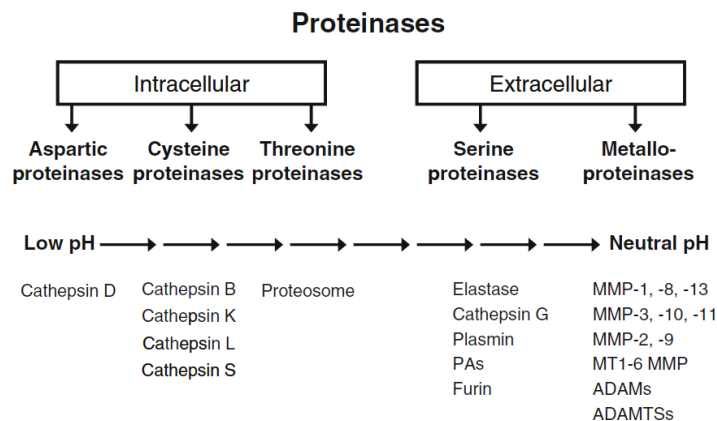


Figure 16 : cinq classes de protéases, trois dont l'action est principalement intracellulaire (aspartate, cystéine, thréonine) et deux à action prédominante extracellulaire. Quelques protéases sont citées à titre d'exemple (Cawston et Young 2010).

Protease family	Protease	Protease function	Protease inhibitors
Aspartyl protease	Cathepsin D	Degradation of ECM components Conversion of cysteine procathepsins into cathepsins	
Cysteine proteases	Cathepsins B, L, H, K	Degradation of ECM components Conversion of pro-MMPs into MMPs	Cystatins, stefins, kininogen
Serine proteases	Plasmin	Degradation of ECM components Activation of uPA Conversion of inactive elastase into elastase	$\alpha_2$ -antiplasmin, $\alpha_2$ -macroglobulin
	Urokinase-type plasminogen activator (uPA)	Conversion of plasminogen into plasmin	PAI-1, 2, 3
	Tissue-type plasminogen activator (tPA)	Conversion of plasminogen into plasmin	
Neutrophil serine proteases	Elastase	Degradation of ECM components	$\alpha_2$ -antiplasmin
	Cathepsin G		$\alpha_2$ -macroglobulin secretory leukoprotease inhibitor

Figure 17 : Protéases intervenant dans la dégradation de protéines matricielles (Skrzydłowska et al 2005).

## **II. Remodelage de la matrice extracellulaire par protéolyse**

La dégradation, régulée dans le temps, de la MEC est une caractéristique importante du développement, de la morphogénèse, de la réparation et du remodelage constant des matrices. En conditions physiologiques, le contrôle homéostatique de l'environnement extracellulaire matriciel et non matriciel est assuré par un équilibre entre le taux de protéases actives présentes et celui d'inhibiteurs de protéases. Différents moyens de contrôle existent tels que le contrôle de la synthèse au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, de la dégradation, et de l'activité des protéases sécrétées. Les enzymes majoritaires de ce processus sont les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Nagase et al 2006). Une rupture du contrôle de cet équilibre aboutit à la mise en place de pathologies.

### **1. De nombreuses classes d'enzymes interviennent dans le remodelage matriciel**

Le dégradome (toutes les protéases produites par les cellules) humain consiste en au moins 569 protéases et homologues distribuées en 5 classes : 194 métalloprotéases, des protéases dont le site catalytique implique une sérine (176), une cystéine (150), une thréonine (28) et un aspartate (21) (Figure 15, López-Otín et Matrisian 2007). Parmi celles-ci, un certain nombre peut être impliqué dans la dégradation physiologique et/ou pathologique de la MEC. Elles présentent trois possibilités de localisation extracellulaire (Figure 16) : dans l'espace extracellulaire (MMPs, cathepsines, plasmine, kallikréines), ancrées dans la membrane plasmique (ADAMs, MT-MMPs) ou associées à des récepteurs de surface (MMPs, ADAMTSs). D'autres enzymes à localisation intracellulaire peuvent, dans certaines circonstances, se retrouver en situation extracellulaire et dégrader les composants de la MEC. Les principales protéases, ayant un rôle dans ce remaniement, physiologique et pathologique sont présentées dans la Figure 17.

La plasmine synthétisée sous forme de zymogène inactif est activée par l'uPA ou le tPA et dégrade la fibrine, la fibronectine et les laminines contribuant ainsi au remodelage matriciel (Lu et al 2011). L'uPA est un acteur clé dans l'invasion tumorale et le processus métastatique (Skrzydłowska et al 2005).

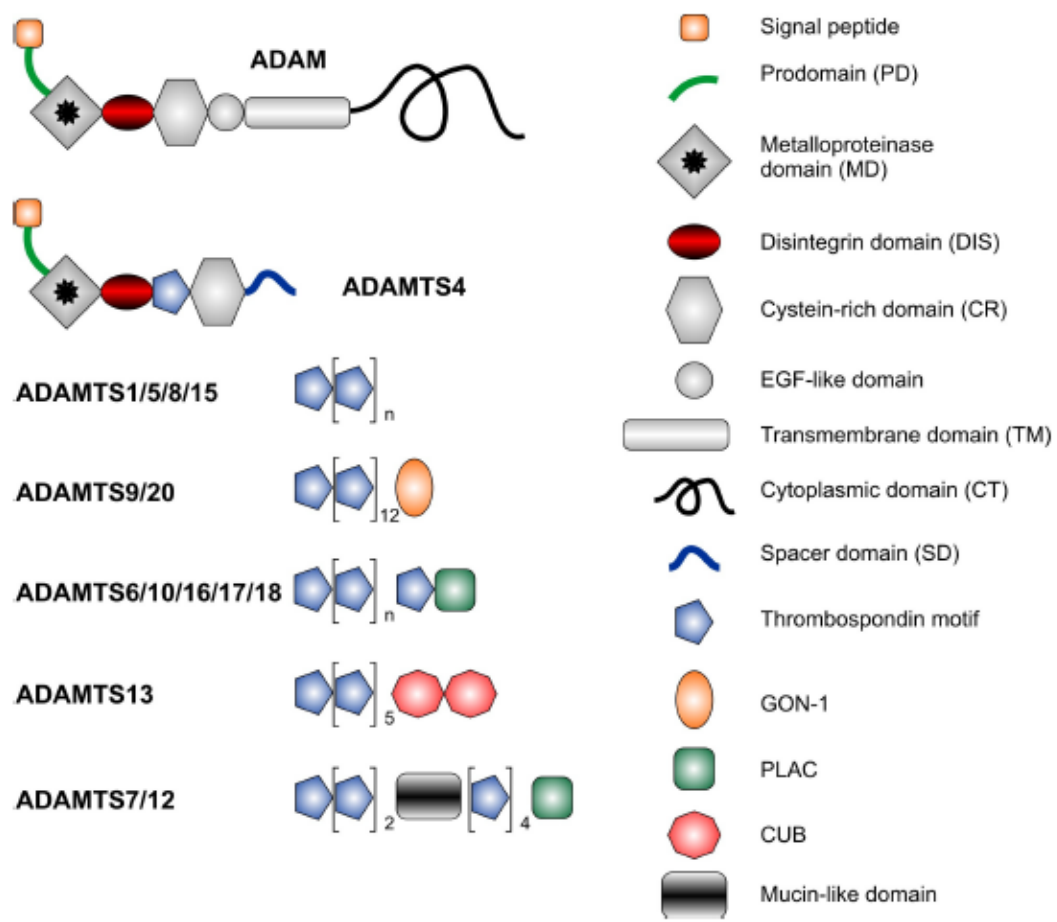


Figure 18 : Structure schématique des protéines des familles ADAMs et ADAMTSs (Przemyslaw et al 2013).

La cathépsine G, tout comme l'élastase, est contenue dans des granules intracellulaires de neutrophiles (Cawston et Young 2010) et participe à créer un environnement favorable à la tumorigénèse (Skrzydłowska et al 2005).

Par opposition, les protéases à cystéines (cathépsine B, K, L, S), aspartates (cathépsine D) et thréonines (protéasome) ont une activité maximale à pH acide et digèrent principalement des protéines intracellulaires en condition physiologique (Lu et al 2011). L'acidification du microenvironnement tumoral augmente l'invasivité tumorale et la formation de métastases (Rothberg et al 2013). Certaines cystéines protéases, telles que la cathépsine B, L et D (Skrzydłowska et al 2005) peuvent être sécrétées à l'extérieur de la cellule et digérer des composants de la MEC (Lu et al 2011).

Dans certains carcinomes, plusieurs kallikréines se trouvent surexprimées. Par exemple, les kallikréines 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13 et 14 sont des biomarqueurs associés à des cancers de l'ovaire, du sein, de la prostate et du testicule. Des études récentes suggèrent, en outre, que les kallikréines sont directement impliquées dans le développement de cancers en participant à la dégradation de la matrice extracellulaire et au processus métastatique (Shih et al 2007). Toutes les kallikréines sont sécrétées, et certaines sont détectées dans les fluides corporels, ce qui suggère leur utilisation dans le diagnostic du cancer (Batra et al 2012).

Les ADAMTSs se composent d'un prodomaine, d'un domaine distinctégrine se liant aux intégrines (Figure 18) et empêchant les liaisons cellule-cellule, et un domaine MMP (Lu et al 2011). ADAMTS-1 inhibe l'angiogenèse et réduit la croissance tumorale, notamment en libérant des peptides anti-angiogéniques issus de la dégradation de la thrombospondine (López-Otín et Matrisian 2007). Les ADAMTS-1, -4, -5, -8, -9, -15, -16, et -18, sont considérées comme des protéoglycanases.

Les ADAMs (a-disintergin and metalloproteinase) font partie de la même famille que les ADAMTSs (Figure 18). Elles comptent 21 membres dont la plupart sont des protéines transmembranaires contrairement aux ADAMTSs. Il a été montré que les mutations de la protéine ADAM-29 conduisent à une diminution de l'adhésion cellulaire au collagène, augmentant la fréquence et la rapidité des métastases. ADAM-10 est surexprimée dans les cas de cancer colorectal à des stades avancés en corrélation avec l'invasion des ganglions lymphatiques. ADAM-17 est corrélée à l'apparition de métastases hépatiques (Przemyslaw et al 2013).

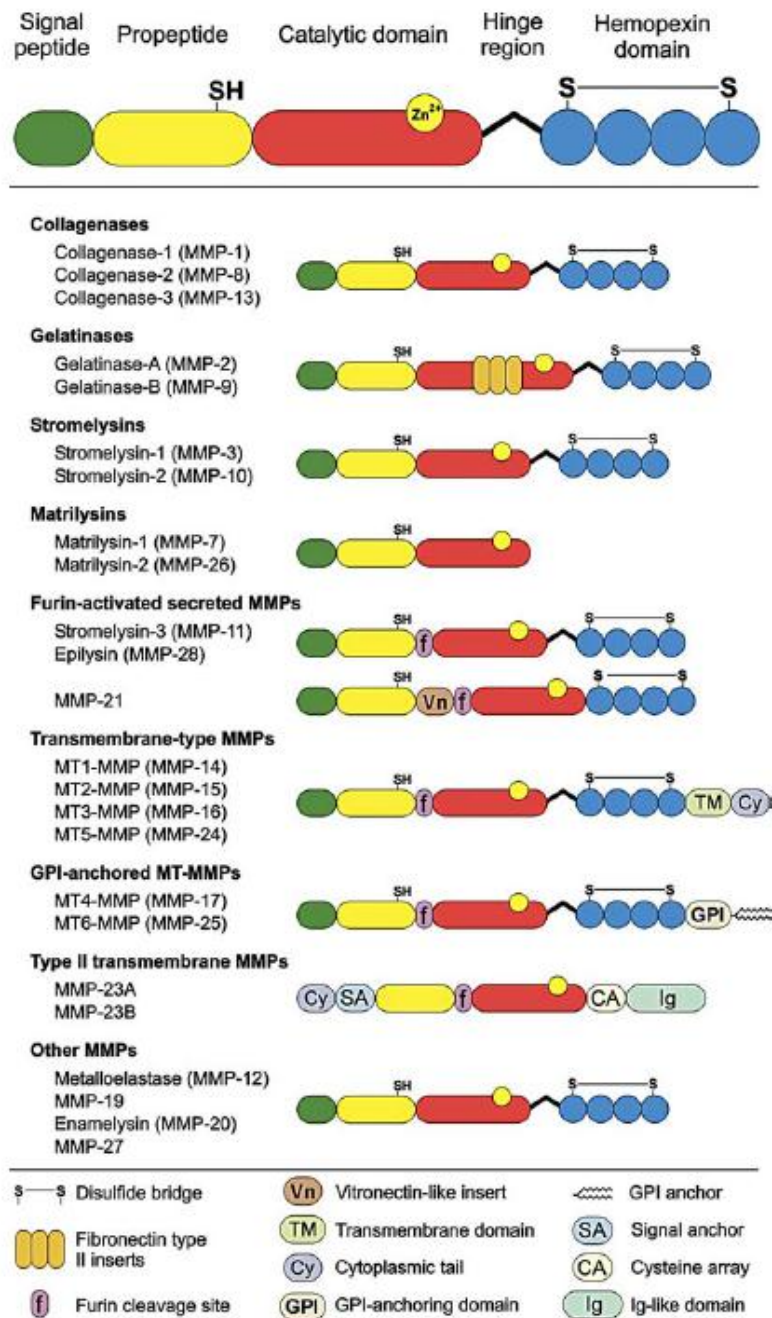


Fig. 2. The domain structures of human MMPs. MMPs are classified into subgroups on the basis of their domain structures and substrate specificities.

Figure 19 : Classement des MMPs sur la base de leurs domaines de structure et de leurs spécificités de substrats (Ala-aho et Kähäri 2005).

L'agressivité tumorale est liée à une surexpression globale de protéases matricielles parmi lesquelles les plus étudiées et reconnues comme impliquées dans la cancérogénèse sont les métalloprotéases matricielles (MMPs).

## **2. Les Matrices Métallo-Protéases (MMPs)**

Les MMPs sont une famille d'endopeptidases zinc-dépendante, capables de cliver les composants de la MEC. Cette capacité de dégradation est notamment essentielle dans le renouvellement homéostatique de la MEC et pour créer un environnement favorable à la prolifération, différenciation ou migration cellulaire (Jones et al 2003). Les MMPs possèdent également un spectre plus large de substrats, qui n'est pas limité aux protéines de la MEC. Il existe 23 MMPs distinctes chez l'être humain subdivisées en classes selon leurs spécificités de substrat et leurs domaines de structure (Figure 19) (Klein et Bischoff 2011).

### **a. Description/structure**

Les MMPs sont des matrixines classées dans la sous-famille des métallo-protéases à zinc. Ce sont des protéases dont l'activité est principalement extracellulaire. La structure typique des MMPs consiste en un pro-peptide de 80 acides aminés (aa), un site catalytique à zinc de 170 aa, un peptide de liaison de taille variable et un domaine hémapexine d'environ 200aa. La MMP-23, au même titre que les matrylisines, ne possède pas de peptide de liaison et de domaine hémapexine, mais elle se distingue de toutes les autres MMPs par la présence d'un domaine riche en cystéine et d'un domaine immunoglobuline-like (Figure 19).

Le pro-peptide contient le motif nommé « cystein switch », qui correspond à la séquence consensus Pro-Arg-Cys-Gly-(Val/Asn)-Pro-Asp, et établit une liaison, via le résidu thiol de la cystéine, avec l'atome de zinc du site actif. Cette liaison maintient la MMP sous forme zymogène donc inactive (proMMP). Le motif de liaison au zinc et le motif « cystein switch » sont structurellement identiques dans toutes les MMPs (Nagase et al 2006). L'interruption du lien cystéine-Zn<sup>2+</sup> ou le retrait du pro-peptide expose et active le domaine catalytique. La majorité des MMPs sont sécrétées sous forme zymogène, tandis que les MMPs membranaires et quelques MMPs sécrétées (-11, -28 et -21) sont activées à l'intérieur de la cellule, du fait de la présence d'un domaine de liaison à la furine, une enzyme intracellulaire spécialisée dans la conversion de protéases inactives en protéases actives. Le domaine hémapexine, de composition variable, a un rôle dans la liaison au substrat (Jones et al 2003).

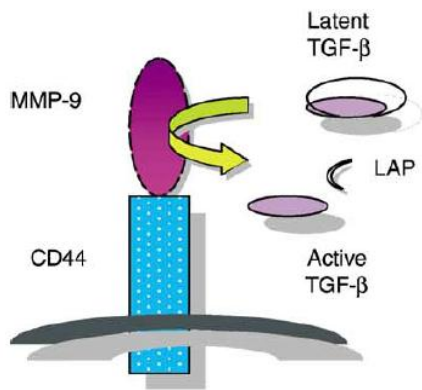


Figure 20 : Activation du TGFβ par la MMP9 liée au CD44. LAP est une protéine qui séquestre le TGFβ et bloque son activité (Fowlkes et Winkler 2002).

## **b. Fonctions générales**

Les fonctions associées aux MMPs sont multiples.

\* La MEC joue un rôle de réservoir de facteurs de croissance et cytokines. Elle les piège et donc inhibe leur action cellulaire. Le remaniement matriciel rend ces facteurs disponibles pour réguler les cellules environnantes. De telles associations ont été démontrées via l'interaction des chaînes d'héparane sulfate de protéoglycanes, avec le FGF (fibroblast growth factor), le TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta), l'EGF (epidermal growth factor) ou leur axe protéique tel que l'interaction décorine-TGF- $\beta$ . Deux mécanismes dépendant des MMPs ont été démontrés pour réguler la libération et/ou l'activation du TGF- $\beta$ . La décorine, un protéoglycane servant de réservoir au TGF- $\beta$ , peut le libérer par sa sensibilité à la dégradation par les MMP-2,-3,-7. Par ailleurs, le CD44 (un récepteur cellulaire de surface de type protéoglycane) lie la MMP-9 activée qui peut alors cliver et activer le TGF- $\beta$  latent séquestré par LAP (latency-associated peptide), une protéine matricielle (Figure 20) (Fowlkes et Winkler2002).

\* La dégradation de protéines matricielles peut générer des fragments qui présentent des propriétés nouvelles, différentes de la protéine d'origine. On parle de fragments cryptiques. A titre d'exemple, ceux générés par la dégradation de la région c-terminale de protéines matricielles de la lame basale telles que le collagène XVIII, le collagène IV ou le perlécan (un protéoglycane), donnent naissance respectivement à l'endostatine, le tumstatine ou l'endorepelline, ayant des activités anti-angiogéniques propres. L'inhibition de la mise en place des nouveaux vaisseaux est associée à leur capacité à interagir respectivement avec les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$  ou  $\alpha 2\beta 1$  des cellules endothéliales et à en moduler l'activité. L'endostatine et l'endorepelline agissent sur le cytosquelette des cellules endothéliales empêchant leur migration pour former des structures de types capillaire. L'endostatine et le tumastatine inhibent la synthèse protéique, la prolifération et la survie des cellules endothéliales (Bix et Iozzo 2005).

\* Les MMPs sont impliquées dans le clivage de protéines transmembranaires inactives telles que FasL, HB-EGF, TNF- $\alpha$ . FasL (ligand) peut être libéré sous une forme soluble par la MMP-7 et ainsi s'associer au récepteur Fas, le complexe déclenchera alors l'apoptose cellulaire (Powell et al 1999). La MMP-3 est capable de cliver l'HB-EGF (heparin-binding-



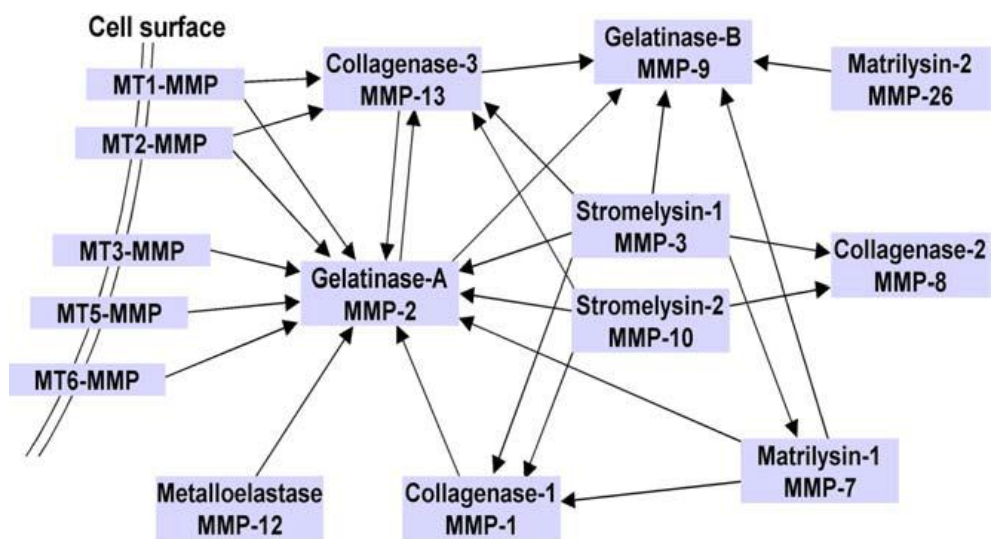


Figure 21: Cascade protéolytique faisant intervenir des MMPs actives pour réguler l'activité d'autres MMPs majoritairement sécrétées sous leur forme pro-MMP inactive (Ala-alo et Kähäri, 2005).

EGF) de la surface cellulaire, la forme soluble mature ayant ainsi une fonction pro-mitogénique (Fowlkes et Winkler 2002).

Les MMPs peuvent également cliver des récepteurs membranaires tels que le récepteur du FGF de type I (Fibroblast growth factor-receptor 1). La MMP-2 libère un fragment soluble pouvant encore lier le FGF, lequel entre en compétition avec le récepteur membranaire (Lévi et al 1996). De même, la MT1-MMP clive le récepteur CD44 libérant un fragment de 70kDa stimulant la migration cellulaire (Kajita et al 2001).

\* Une étape clé de la régulation des MMPs est leur conversion de la forme zymogène en forme active, réalisée à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Différentes protéases sont impliquées dans ce mécanisme, dont la plasmine, la furine mais également des MMPs actives. MT1-MMP (ou MMP-14), a été la première enzyme membranaire identifiée de la famille des MT-MMPs, qui est importante dans l'activation extracellulaire d'autres MMPs telles que la pro-MMP-2, pro-MMP-13 et de pro-MMP-8 (Al-Raawi et al 2011). La Figure 21 résume les différentes possibilités d'activation extracellulaire en cascade des MMPs entre elles.

Les MMPs par leurs actions de dégradation des composants de la MEC et d'autres substrats non matriciels, peuvent moduler positivement ou négativement les comportements cellulaires. Chacune d'entre elles a des substrats propres, mais non uniques. Seul un ensemble de MMPs est exprimé dans un tissu donné. En revanche, on peut noter une redondance dans les spécificités de substrats dégradés entre les MMPs présentes au sein d'un même tissu. Une modification, non contrôlée, quantitative ou qualitative des MMPs (et/ou de leurs inhibiteurs) dans un tissu conduit à créer un environnement favorable au développement de pathologies, tel que le cancer.

Quelles sont donc les fonctions spécifiques, physiologiques ou associées au cancer, des MMPs ?



### c. Fonctions spécifiques des MMPS

Les MMPs se divisent en sous-familles en fonction de leurs spécificités de substrats. Chaque MMP a des fonctions spécifiques associées à sa structure, sa classe, sa localisation et à un équilibre dans sa production (Figure 22).

Familles	spécificité	MMPs	Description
Collagénases	collagène fibrillaire I, II, III, Coupe collagène en premier= gélatine pour action des autres enzymes	MMP1	Produite par les fibroblastes, enzyme sécrétée contenant un domaine hemopexine-like nécessaire à la dégradation de la triple hélice de collagène. Capable de dégrader de nombreux substrats dont l'aggrécane, le versican, le perlécane, le nidogène, les serpines et la Tenascine-C.
		MMP8	Collagénase des neutrophiles, très similaire en structure et en fonction à la MMP-1. Cependant clive plus spécifiquement le collagène de type I. N'est pas sécrétée immédiatement après sa synthèse mais est stockée dans des granules et libérée suite à une stimulation.
		MMP13	Spécifique du collagène de type II. Rôle majeur dans les cascades d'activation des MMPs et l'inactivation des TIMPs. Profil d'expression spécifique et restreint au tissu squelettique pour son rôle dans le développement et le remodelage osseux.
Gélatinases	collagènes dénaturés =gélatines. Possèdent 3 répétitions du domaine de type II de la Fn dans le domaines	MMP2	Exprimée de façon constitutive. Dégrade la gélatine, les collagènes de type I, IV et V, l'élastine et la vitronectine. Forme mature activée conduit à l'apoptose des cellules endothéliales et inhibe la néoangiogenèse alors qu'une forme semi-activée complexée à la MMP 14 promeut l'angiogenèse et la survie cellulaire. Facilite l'infiltration des cellules du système immunitaire par dégradation de la lame basale lors de processus inflammatoires
		MMP9	Libération du VEGF séquestrer par la MEC, l'impliquant dans la néo angiogenèse bien qu'elle soit incapable de dégrader le collagène de type I. N'est exprimée de façon constitutive que par les neutrophiles et, dans d'autres cellules, elle est stockée en granules pour être libérée sous stimulation ; sa production est inducible.
Stromélysines	MMP3 plus active que la MMP10	MMP3	Vaste spectre de substrats: la fibronectine, la gélatine, les laminines et les protéoglycans. Dégrader le collagène sous sa forme triple hélice (sauf col I) et le collagène de type IV. Importante dans l'activation en cascade d'autres MMPs. L'un des substrats de la MMP-3 est le plasminogène activateur inhibiteur 1 (PAI-1). En formant un complexe avec les activateurs du plasminogène membranaire (PAR), la proMMP-3 augmente l'activité du t-PA régulant ainsi l'activité fibrinolytique.
		MMP10	Homologue à la MMP-3 à 82% et les mêmes spécificités de substrat produite par les keratinocytes et a un rôle dans la réparation tissulaire et la migration cellulaire.
		MMP11	Souvent catégorisée en stromélysine. Produite majoritairement par les fibroblastes, elle est impliquée dans le développement embryonnaire, la réparation tissulaire et le cycle reproductif féminin. Elle présente un effet anti-apoptique ses spécificités de substrat sont peu connues.
Matrylsines	Absence de domaine hemopexine	MMP7	Digère la gélatine, la fibronectine, les laminines et l'élastine et active les MMP-2 et -9. Rôle physiologique majoritaire sa fonction d'amplificateur de l'immunité innée des muqueuses épithéliales.
		MMP26	Identifiée dans les tumeurs endométriales. C'est la seule des MMPs à ne pas avoir un système de commutation entre forme pro et active. Elle possède peu de substrat et son rôle physiologique n'est pas encore déterminé avec certitude.

Membranaires	2 sous-types : -transmembranaire -lié à la membrane cellulaire par son domaine glycophosphatidyl- inositol (GPI)	MMP14 MMP15 MMP16 MMP24 MMP17 MMP25	Type transmembranaire
		Structure proche des MMPs solubles. Dégrade les collagènes de type I, II et III et joue un rôle de collagénase interstitielle. Principaux substrats : les collagènes, la fibronectine, la vitronectine, la laminine-5, la tenascin, le nidogène, l'aggrécane, la fibrine et le fibrinogène. Son accumulation intracellulaire aiderait au développement d'un anneau mitotique.	
		Exprimée ubiquitairement avec un large spectre de substrats avec des fonctions anti-apoptotiques, et de régénération tubulaire lors de l'angiogenèse. Elle peut activer la pro-MMP-2 en l'absence de TIMP-2.	
		Dégrade le collagène III, la gélatine, la caséine et la fibronectine. A des similarités structurales avec la MMP-14 et active la pro-MMP-2. Peu décrite dans la littérature.	
		Active la pro-MMP2 par clivage. Peu décrite dans la littérature.	
		Active la pro-MMP2 par clivage. Peu décrite dans la littérature.	
		Active l'α1 proteinase inhibiteur	GPI

Figure 22 : Les diverses classes de MMPs et leurs fonctions spécifiques (à partir de Visse et Nagase 2003, Klein et Bischoff 2011, Artacho-Cordon et al 2012, ala-aho et Kähäri 2005, Vargova et al 2012).

#### d. Les MMPs, rôle promoteur ou inhibiteur de cancer ?

De nombreuses études ont impliqué les MMPs dans le développement de différents de types de cancers incluant le cancer du poumon, du sein et de la peau. L'expression et l'activité des MMPs sont élevées dans et autour des tumeurs, et souvent associées à des tumeurs de haut grade. Leur surexpression a été corrélée à la susceptibilité au cancer et à la mortalité des patients, les impliquant ainsi dans les stades précoces et tardifs du développement de la maladie. Des essais cliniques antérieurs basés sur l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs à spectre large (Overall et Kleinfeld 2006) ont été décevants et ont été stoppés (Vargova et al 2012). Des études plus récentes ont révélé des propriétés protectrices de certaines MMPs, lesquelles s'opposent au développement du cancer. Ces études résultent en partie de constatations réalisées à partir de modèles de souris développant des cancers et rendues déficientes pour l'expression de certaines MMPs, telles que la MMP-8 (López-Otín et Matrisian 2007). L'utilisation des inhibiteurs de protéases dans le cadre d'essais cliniques est à nouveau envisagée, mais en ciblant très spécifiquement certaines MMPs (Roy et al 2009). Cela impose de bien connaître le rôle de chacune d'elles dans un cancer donné. Quelques exemples sont présentés ci-dessous pour illustrer le rôle promoteur ou anti-tumoral des MMPs.

Les MMPs ayant un rôle pro-tumoral sont celles qui peuvent être impliquées dans la prolifération tumorale. Trois voies peuvent être engagées par les MMPs. La première est de libérer des précurseurs de facteurs de croissance ancrés dans la membrane plasmique, par exemple le TGF- $\alpha$ . La seconde est de libérer des facteurs de croissances séquestrés dans la MEC ou par d'autres protéines extracellulaires, par exemple les IGFs (insulin like growth factor) séquestrés par l'IGFBP (Fowlkes et Winkler 2002). La troisième en modifiant la composition de la matrice, les MMPs pourraient indirectement modifier les signaux prolifératifs en perturbant les interactions MEC/intégrines cellulaires. A titre d'exemple, *in vivo* et *in vitro*, la MMP-14 confère un avantage aux cellules tumorales en leur permettant d'échapper aux signaux anti-prolifératifs induits par le collagène I. En effet, elle clive le collagène I et active la proMMP-2 dans l'environnement direct des cellules cancéreuses, créant un microenvironnement favorable à la prolifération (Larsen et al 2006).

Les MMP-3,-7,-9 et-11 ont un rôle de régulation de l'apoptose, soit en s'opposant à l'apoptose des cellules tumorales et/ou en favorisant celle des cellules normales. Lorsque la MMP-3 est surexprimée par les cellules épithéliales mammaires, elle induit l'apoptose

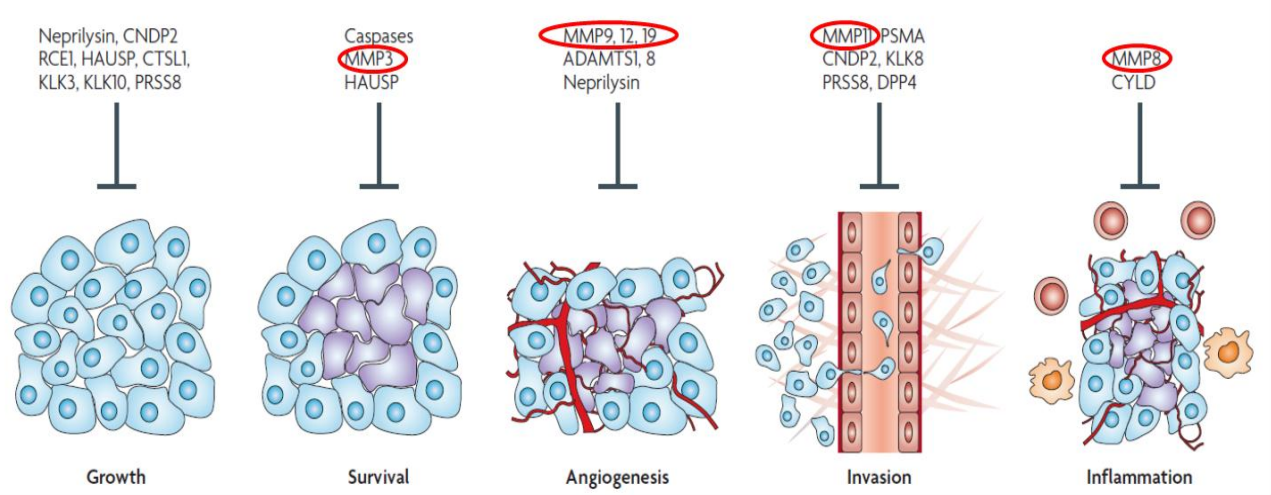


Figure 23 : Rôle fonctionnel des protéases anti-tumorales à différents stades de développement du cancer (López-Otín et Matrisian 2007).

probablement en dégradant les laminines. La MMP-7, quant à elle, relargue FasL de la membrane plasmique. En interagissant avec le récepteur de mort cellulaire Fas, il induit d'une part l'apoptose des cellules avoisinant la tumeur et d'autre part diminue l'apoptose des cellules cancéreuses en clivant le pro-heparine-binding epidermal growth factor (pro-HB-EGF) pour générer l'HB-EGF mature qui stimule leur survie cellulaire. La MMP-11 semble diminuer l'apoptose spontanée dans le cas de xénogreffe en libérant l'IGF. Avec la MMP-9, elles diminuent l'apoptose des cellules cancéreuses (Egeblad et Werb 2002).

L'apport en nutriments est essentiel au développement tumoral et pour cela, la tumeur doit générer de nouveaux vaisseaux sanguins. Les MMP-2, -9, -14 et -19 favorisent la néo-angiogenèse tumorale (Egeblad et Werb 2002). A titre d'exemple, la MMP-14 joue un rôle essentiel dans la néo-angiogenèse tumorale en initiant la migration et l'invasion des cellules endothéliales (Vargova et al 2012).

Certaines MMPs ont révélé un rôle inhibiteur dans la cancérogenèse (Figure 23). La MMP-8 a des propriétés anti-tumorales qui furent les premières à être démontrées *in vivo*. Elle est majoritairement produite par les neutrophiles et est liée à des conditions inflammatoires. Des souris déficientes en MMP-8 ont montré que l'absence de cette protéase augmente considérablement l'incidence de tumeurs de la peau. A l'inverse, les expériences de transplantation de moelle osseuse dans ces souris ont montré que la présence de MMP-8 produite par les neutrophiles est suffisante pour restorer la protection anti-tumorale que confère cette MMP (Balbin et al 2003). La MMP-12 semble avoir un rôle plus ambigu, montrée comme anti-proliférative dans les cas de cancer du poumon et associée à un pronostic favorable dans les cas de cancers du foie ou du colon, elle est pourtant associée à des pronostics à faible chance de survie dans d'autres cancers. Il a été proposé que la source cellulaire de la MMP-12 serait la cause de l'ambivalence de son action. Si elle est exprimée par les cellules cancéreuses, le pronostic est défavorable, alors qu'exprimée par les macrophages, elle a un rôle anti-tumoral (López-Otín et Matrisian 2007).

Ce ne serait pas la seule des protéases à avoir un double rôle. La MMP-3 a d'abord été décrite comme une protéase pro-tumorigénique mais des études récentes montrent son rôle protecteur dans des cas de cancer de la peau. De même, la MMP-9 a été fréquemment associée à la progression tumorale alors que des carcinomes induits par papillomavirus sont de plus haut grade et plus agressifs en souris MMP9<sup>-/-</sup>. La MMP-11 augmente la capacité des cellules cancéreuses mammaires à donner naissance à une tumeur primaire mais réprime le développement de métastases (López-Otín et Matrisian 2007).



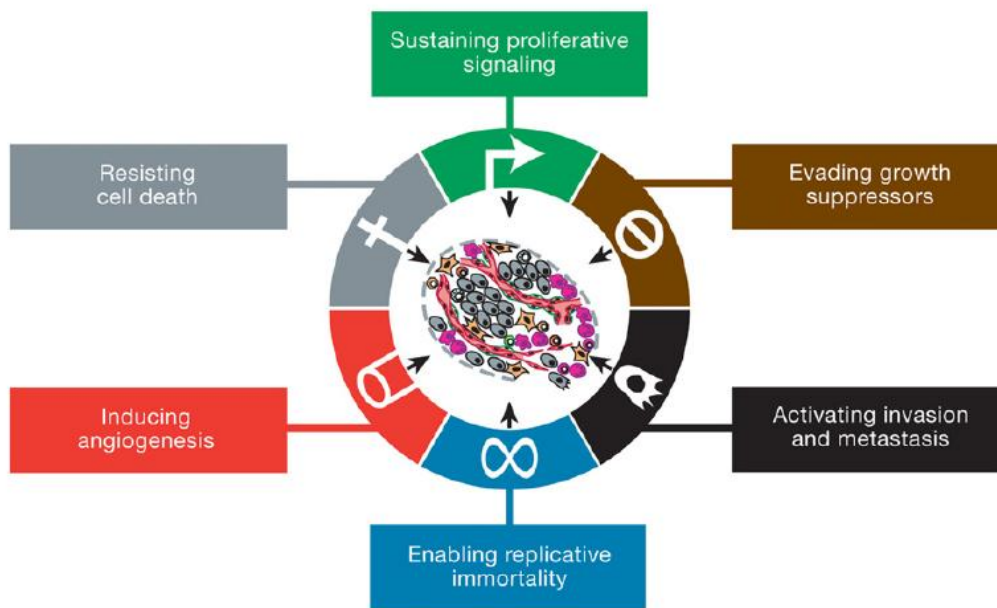


Figure 24 : Propriétés acquises par une cellule cancéreuse (Hanahan et Weinberg 2011).

## **Chapitre II : La cancérogénèse mammaire et le processus métastatique**

### **I. La cancérogénèse**

La cancérogénèse est l'ensemble de phénomènes transformant une cellule normale en cellule cancéreuse. A l'origine d'un cancer se trouve une cellule seule, possédant un ADN endommagé qui initie des processus chromosomiques aberrants. La grande majorité des cellules de l'organisme ont des processus de contrôle et d'élimination de ces aberrations. Cependant si l'une des cellules défectueuses survit, il en résultera une prolifération cellulaire anormalement importante. La plupart des cancers sont issus de clones provenant d'une seule cellule transformée, nommée cellule initiatrice du cancer. Cette cellule, par mutations successives, a acquis la capacité de se diviser indéfiniment, (Sager 1986) l'indépendance face aux signaux extracellulaires de prolifération, et l'échappement à l'apoptose (Hanahan et Weinberg 2000) (Figure 24). Le cancer est donc une pathologie multigénique, contrairement à de nombreuses pathologies génétiques (mucoviscidose, myopathie,..). Dans les cas de tumeurs solides telles que celles dérivées du colon, du sein ou du pancréas, entre 33 et 66 gènes montrent des mutations somatiques affectant les protéines codées par ces gènes (Vogelstein et al 2013). Deux propriétés sont essentielles à la progression tumorale : 1/ leur capacité à induire le développement de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (néoangiogenèse tumorale) via une production de VEGF (Folkman 2006). Ces néovaisseaux apportent les nutriments indispensables à la croissance de la tumeur. 2/ leur aptitude à envahir le tissu environnant et à coloniser des tissus localisés à distance, via l'expression modifiée de récepteurs d'adhérence (Hanahan et Weinberg 2011) et une production accrue de protéases (Nagase et al 2006).

	Tissu	tumeurs bénignes	tumeurs malignes
<b>tissu conjonctif</b>	tissu fibreux adulte	fibrome	fibrosarcome
	tissu fibreux embryonnaire (myxomateux)	myxome	myxosarcome
	tissu adipeux	lipome	liposarcome
	cartilage	chondrome	chondrosarcome
	tissu osseux	osteome	osteosarcome
<b>Tissu épithéliale</b>	épithélium glandulaire: -foie -rein	-adenonome hépatique -adenome tubulaire rénale	-carcinome hépato-cellulaire -carcinome cellulaire rénal
	épithélium de transition	papillome de cellules transitionnaires	carcinome de cellules transitionnaires
	placenta	hydatidiforme mole	choriocarcinome
<b>endothélium</b>	vaisseaux sanguin	hémangiome, hemangiopericytome	hemangiosarcome, angiosarcome
	vaisseaux lymphatique	lymphangiome	lymphangiosarcome

Figure 25 : Quelques exemples de tumeurs bénignes ou malignes selon leur tissu d'origine (D'après <http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/tumors.html>).

Il existe un grand nombre de tumeurs classées dans un premier temps en fonction de leur tissu d'origine et du statut bénin ou malin de la tumeur (Figure 25).

Les tumeurs malignes qui dérivent des tissus conjonctifs sont immédiatement invasives (Lurkin et al 2010), tandis que celles dérivant des tissus épithéliaux ont une phase non invasive lorsqu'elles sont contenues par la lame basale et sont qualifiées de carcinomes *in situ* (Cowell et al 2013). Les cellules tumorales perdent leurs interactions cohésives cellules-cellules par diminution d'expression des E-Cadhérines et réalisent une transition épithélio-mésenchymateuse (Hanahan et Weinberg 2000). Le carcinome devient invasif lorsque les cellules tumorales dégradent la lame basale et envahissent le tissu conjonctif sous-jacent. Parmi les carcinomes, certains proviennent d'épithéliums de revêtement, d'autres d'épithéliums glandulaires endocrines ou exocrines. Les carcinomes sont les cancers les plus développés chez l'Homme. Ils représentent 70 à 85% des cancers hépatocellulaires ; les cancers œsophagiens sont à 90% des carcinomes à cellules squameuses (Jemal et al 2011) et les carcinomes représentent 98% des tumeurs malignes mammaires (Mousseau et Garnier 2002).

C'est la forte prévalence de ce dernier type de cancer qui a orienté notre étude sur le carcinome mammaire qui représente une des premières causes de décès par cancer chez la femme.

## **II. Les carcinomes mammaires**

Afin d'appréhender le remaniement matriciel dans le cancer mammaire, une description du développement de la glande mammaire depuis le stade fœtal jusqu'au stade adulte est nécessaire. Le contrôle de ce développement est dépendant de facteurs locaux et de facteurs circulants, et implique un profond remaniement matriciel à chacune de ces étapes. Les activités des protéases responsables du remodelage de la matrice sont régies par un ensemble complexe d'activateurs, d'inhibiteurs et de récepteurs cellulaires (Skrzydowska et al 2005).

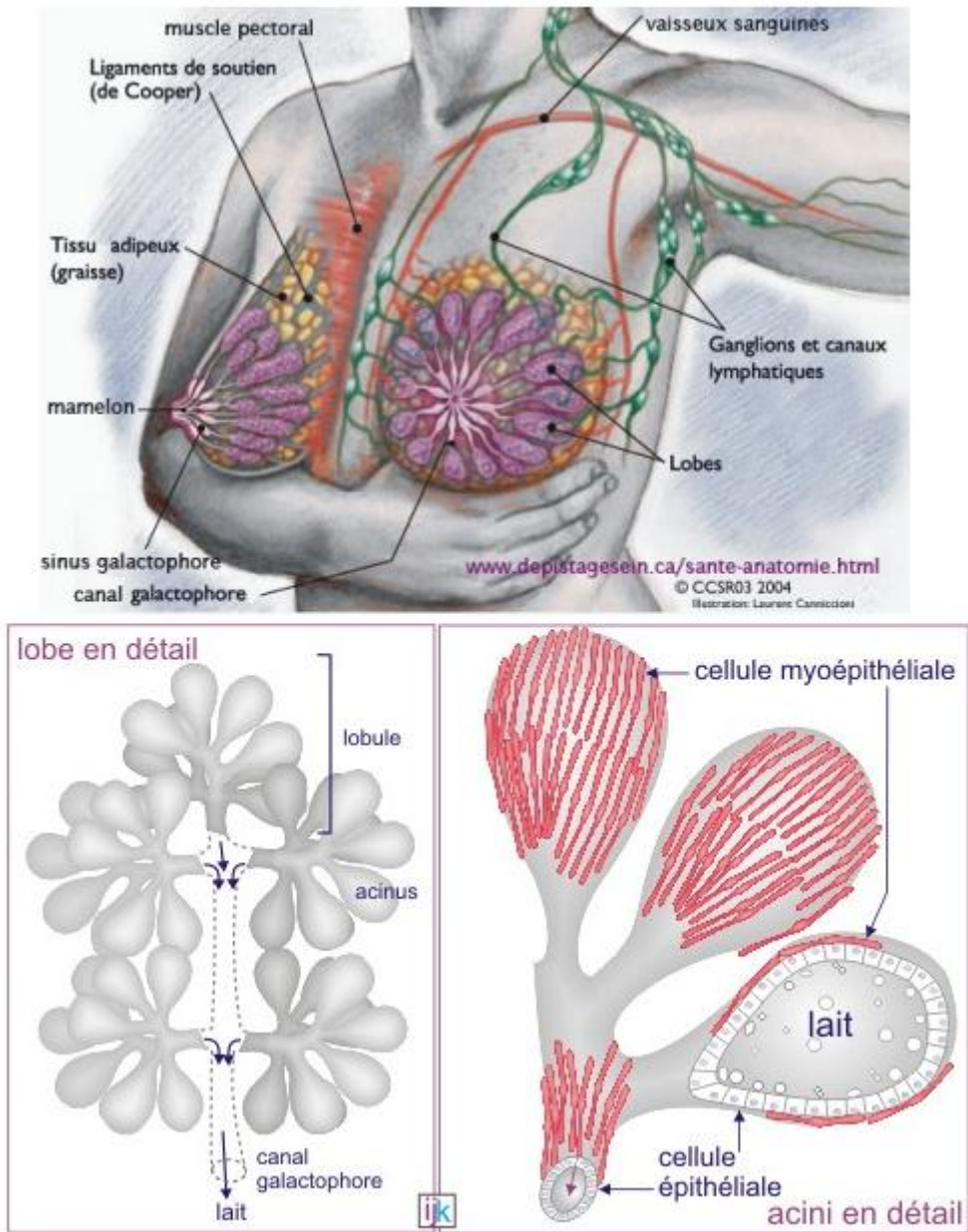


Figure 26: Description anatomique du sein et présentation schématique de l'organisation d'un lobe et d'acini organisés en lobule (<http://www.cellbiol.net/ste/alpHERCEPTIN1images.php>).

## 1. Morphogénèse mammaire et remodelage matriciel

### a. Morphogénèse, développement mammaire et histologie du sein

La morphogénèse par embranchement est un processus fondamental lors du développement qui permet l'amplification des surfaces épithéliales. Plusieurs organes font partie des organes « branchés » ou à embranchement : les poumons, les reins, la glande salivaire et la glande mammaire. La glande mammaire a la particularité de se développer principalement durant l'adolescence et au cours de la grossesse ; cependant une formation rudimentaire se met en place dès le stade foetal (Kim et Nelson 2012).

La fonction primaire de la glande mammaire (glande cutanée) est exocrine, il s'agit de la sécrétion lactée, laquelle est fonctionnelle uniquement si la mère décide d'allaiter son enfant (Watson et Kreuzaler 2011). Le tissu mammaire est alors constitué d'un embranchement de canaux inclus dans le tissu adipeux mammaire (pannicule adipeux sous-cutané) et débouchant à l'extérieur de l'organisme au niveau du mamelon par des canaux excréteurs (Figure 26). Reposant sur le muscle pectoral, cette glande est constituée de 10 à 20 unités lobulaires séparées par le pannicule adipeux. Chaque lobe se compose de lobules et donne sur l'extérieur par un canal, le canal galactophore. Un lobule est un ensemble d'acini regroupés autour d'un canal alvéolaire (canalicule intra-lobulaire). Puis plusieurs canaux alvéolaires se joignent et forment un canal lobulaire (canal extra lobulaire), et plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour former un canal galactophore.

Chaque unité sécrétrice est composée de couches de cellules épithéliales polarisées, dites luminales, entourées d'une couche discontinue de cellules myoépithéliales, dites basales, reposant sur une lame basale. Entourant cette structure, on trouve une gaine de fibroblastes, incluse dans le tissu conjonctif sous-jacent vascularisé (Fata et al 2000).

Le développement de la glande mammaire se passe en quatre phases distinctes : l'embryogénèse, la puberté, la grossesse et la ménopause (Watson et Kreuzaler 2011). Ce processus est hautement coordonné et est dirigé par des facteurs de croissance présents au niveau local et des hormones systémiques (œstrogène et progestérone) dont la production est variable au cours de la vie (LaMarca et Rosen 2008).

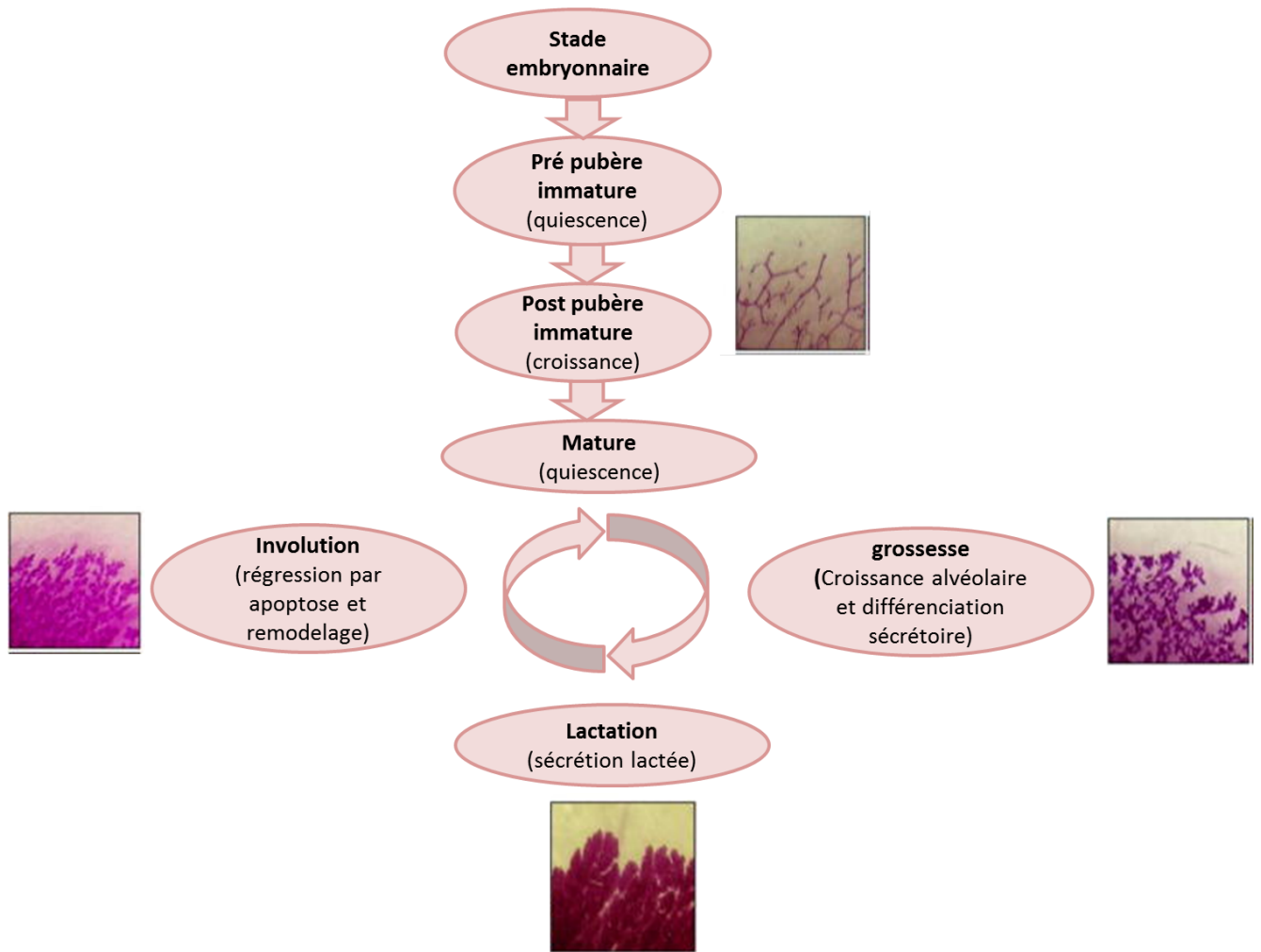


Figure 27 : cycle de développement et de remaniement de la glande mammaire. Les marquages histologiques montrent la morphogénèse tubulaire de souris vierge au stade post pubère (6 semaines de vie), au 15ième jour de grossesse, au jour 2 de la lactation et au jour 4 de l'involution (D'après Lewis 2000 et Ke et al 2006).

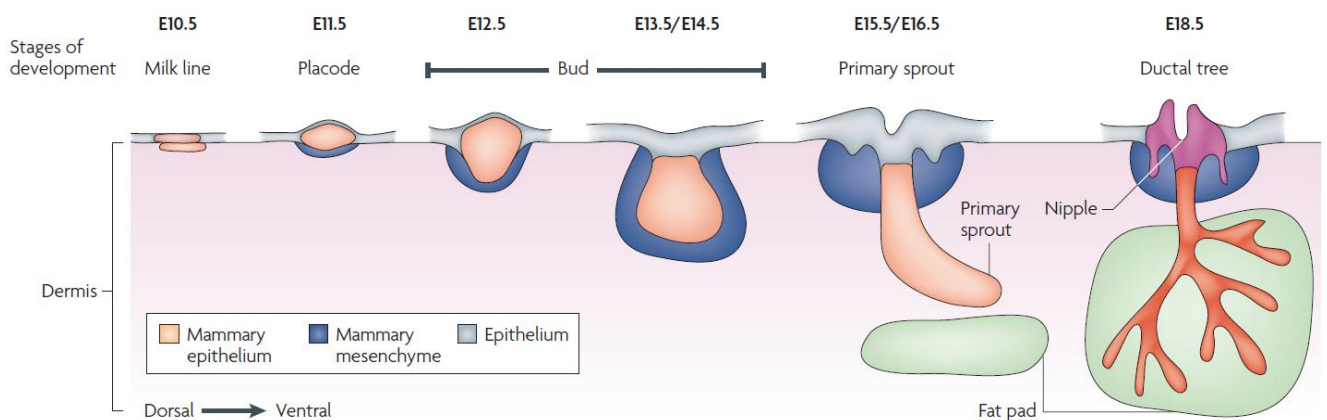


Figure 28 : formation de la glande mammaire chez l'embryon de souris (Robinson 2007).

Chacune des étapes du développement mammaire est caractérisée par un état du système lobulo-canalair, présenté sur les coupes histologiques (Figure 27) réalisées chez la souris. En effet, la difficulté d'étude de la morphogénèse mammaire humaine fait que le modèle murin est le plus proche et le plus adapté à la description de la croissance de cet organe (Khokha et Werb 2011).

\*Au stade fœtal, le parenchyme (cellules épithéliales et myoépithéliales) et le mésenchyme (fibroblastes et adipocytes) se mettent en place. Le développement de la glande mammaire démarre avec la migration de cellules épithéliales dérivant de l'ectoderme ; ce qui conduit à la formation d'aires d'épaississements épithéliaux de forme arrondies, appelées placodes, lesquelles envahissent le derme (mésenchyme) (Figure 28). Deux tissus mésenchymateux sont impliqués durant l'embryogénèse amenant à la formation de ces structures. Le mésenchyme fibroblastique mammaire stimule les cellules épithéliales mammaires embryonnaires pour former des structures canalaire atypiques branchées avec hyperplasie du canal, alors que le mésenchyme adipeux induit leur élongation. En coupe histologique, les canaux, de nombre limité, sont allongés avec parfois quelques branchements à terminaisons arrondies (Naccarato et al 2000 ; Kass et al 2007). Ce système rudimentaire n'évolue plus jusqu'au stade pré-pubère.

\*Les développements ultérieurs de la glande mammaire sont directement corrélés à la production d'hormones sexuelles féminines. Hors période de grossesse, depuis la puberté jusqu'à la ménopause, ces hormones évoluent selon un cycle de 28 jours. Par contre, pendant la grossesse, leurs taux augmentent considérablement jusqu'à l'accouchement. Les interactions épithélio-mésenchymateuses, impliquant des facteurs locaux, vont également être impliquées.

A l'adolescence, les hormones sexuelles (œstrogène et progestérone) dont les concentrations ne cessent d'augmenter, favorisent le développement du tissu adipeux et de la glande mammaire. Les bourgeons terminaux se développent dans le tissu adipeux, formant des canaux et des ramifications secondaires (Figure 29). A l'état adulte, à chaque cycle reproductif, cette glande subit un remaniment régulé. La gestation et la lactation représentent le niveau de développement maximal de la glande mammaire (allongement des canaux et développement des lobules avec mise en place des acini) (Naccarato et al 2000). La structure en « arbre » de la glande mammaire augmente sa surface cellulaire pour l'adaptation structurelle et fonctionnelle sur demande physiologique pour assurer la lactation. A la



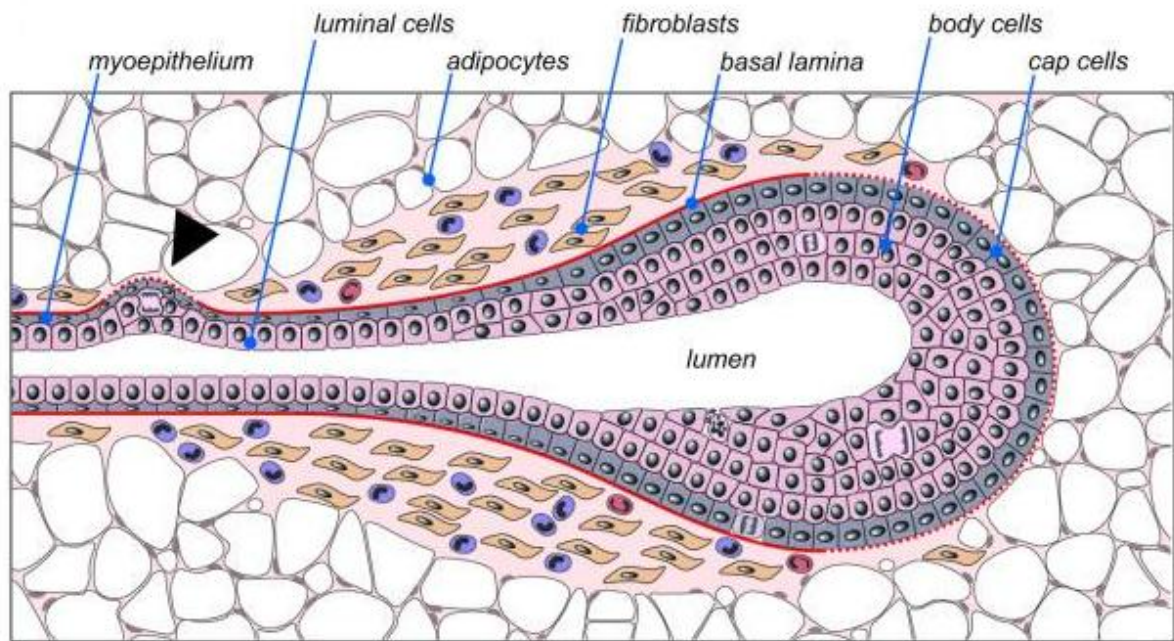


Figure 29 : Schématisation d'un bourgeon terminal et de son environnement à la puberté. La flèche indique la formation d'un nouveau bourgeon (Sternlicht 2006).

ménopause, la glande mammaire subit une involution correspondant à une régression des lobules et au maintien des conduits (Watson et Kreuzaler 2011, Howard et Gusterson 2000). Les cellules épithéliales luminales et les cellules myoépithéliales sont séparées du mésenchyme par la lame basale. Le remaniement de cette matrice est très régulé car elle assure divers rôles, dont l'organisation des cellules en alvéoles, la réponse aux hormones lactogènes et l'inhibition de la croissance cellulaire (Polyak et Kalluri 2010).

### **b. Remodelage matriciel physiologique**

La morphogénèse de la glande mammaire, tant dans la formation des branchements et l'élongation des canaux, que dans celle des bourgeons terminaux et la différenciation des acini, implique un remaniement matriciel important protéases dépendant. En culture 3D, dans un gel de collagène I, l'inhibition des sérines, cystéines et aspartiques protéases n'affecte pas la morphogénèse des organoïdes épithéliaux mammaires alors que l'utilisation d'un inhibiteur de MMPs (GM6001) diminue les embranchements induits par des facteurs de croissance (Simian et al 2001). La plasmine en activant les MMPs est un régulateur positif de la formation d'embranchements mais c'est l'action des MMPs elles-mêmes qui est indispensable à morphogénèse de la glande.

Dans le développement de la glande mammaire murine, la présence d'ARNm de MMPs et des protéines correspondantes a été démontrée dans la morphogénèse et l'involution (Fata et Bissell 2004). Une étude sur des coupes de tissu mammaire de souris pubères a été réalisée par hybridation in situ. Les ARNs des MMPs -2, -3, -9 et -14 ont été détectés dans des endroits distincts. L'ARNm de MMP-2 est concentré principalement dans le stroma péricanalaire et faiblement exprimé par le tissu adipeux. Son expression est réduite sur les sites de bourgeons initiateurs ou des branches latérales. L'ARNm de MMP-14, le principal activateur de la MMP-2, chevauche l'expression de MMP-2 en partie seulement. La MMP-14 est principalement exprimée dans le stroma, mais est également présente dans l'épithélium, au niveau des sites d'initiation d'embranchements et fortement concentrée à l'intérieur et autour du bourgeon terminal. La MMP-9 est exprimée à faibles niveaux tout le long de la glande dans l'épithélium et le stroma. La MMP-3 est exclusivement localisée à ce stade au niveau du stroma péricanalaire et du tissu adipeux (Wiseman et al 2003). Une étude antérieure observait des taux élevés dans les bourgeons terminaux et aux points d'embranchements, et suggérait un rôle primordial de cette MMP dans la morphogénèse à embranchement de la glande mammaire (Simian et al 2001).

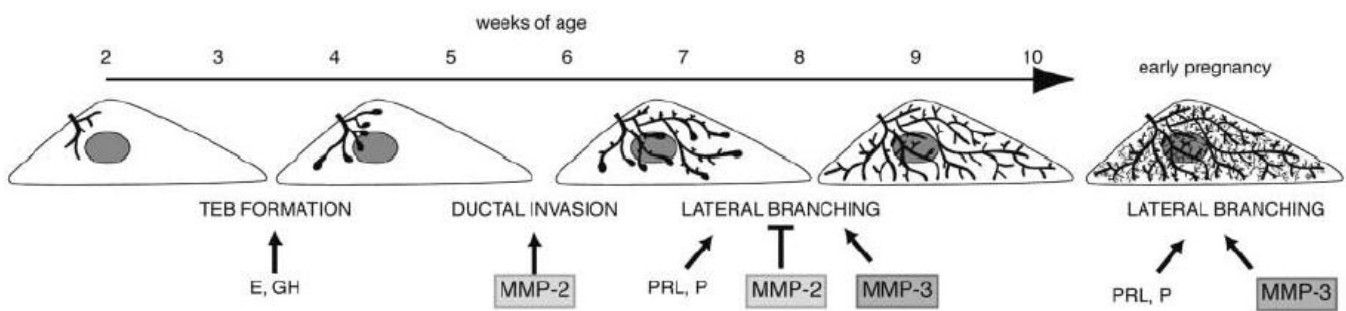


Figure 30 : Modèle d'intervention de MMPs dans la morphogénèse de la glande mammaire de souris (Wiseman et al 2003).

Des analyses sur modèle de souris rendues déficientes en MMP-2 ou -3, et d'analyse pharmacologiques utilisant des inhibiteurs de MMPs, ont permis de proposer un modèle d'intervention de ces deux MMPs dans le développement de la glande mammaires (Figure 30) (Wiseman et al 2003). Avant la puberté, le développement des canaux et branchements est limité. En réponse aux hormones sexuelles, à l'âge de 3 semaines, des bourgeons terminaux se forment. La MMP-2 stimule l'invasion des bourgeons terminaux et les conduits formés occupent le tissu adipeux en formant des branchements par dichotomie. A l'âge de 6-8 semaines, sous l'action de la MMP-3, se mettent en place des branchements latéraux. À 10 semaines, le tissu adipeux est rempli et reste relativement quiescent jusqu'à la grossesse, moment où il se produira une nouvelle vague de branchements latéraux, régulée par la MMP-3. Ainsi, la MMP-2 favorise l'invasion des bourgeons terminaux et inhibe le développement des embranchements secondaires, tandis que la MMP3 induit les effets inverses.

Des études de surexpression de MMP -3, -7, -14 dans des souris transgéniques conduisent à une hyperplasie canalaire, et toutes peuvent induire la tumorigénèse mammaire. Sternlicht et al (2000) ont montré que la surexpression de MMP-3 favorise des changements spontanés pré-malins et conduit à la formation de tumeurs malignes dans la glande mammaire. Une glande en lactation qui présente des hauts niveaux de transgènes présente des conduits primaires avec des branches surnuméraires et une altération de l'intégrité de la lame basale, avec une perte de laminine et de collagène IV (Witty et al 1995). Par ailleurs, la surexpression de MMP-14 conduit à l'infiltration de lymphocytes dans le stroma, une fibrose péricanalaire, une hyperplasie des conduits et à un adénocarcinome (Ha et al, 2001). En ce qui concerne la MMP-7, sa surexpression révèle un développement prémalin hyperplasique des nodules alvéolaires dans 50% des femelles âgées (Rudolph-Owen et al, 1998).

Ces différentes études démontrent l'implication majoritaire de la MMP-3 et de la MMP-2 dans le développement mammaire. D'autres MMPs interviennent, telles que la MMP-14 et la MMP-7. Leurs surexpressions, non démontrée pour la MMP-2, peuvent conduire à la formation de tumeur.



## **2. Cancérogène mammaire**

### **a. Épidémiologie**

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans l'Union européenne et aux Etats-Unis. Il est la première cause de mortalité par cancer chez les femmes. Statistiquement, il est estimé qu'une femme sur dix vivant jusqu'à 80 ans développera un cancer du sein au cours de sa vie. Le dernier Rapport de l'institut national du cancer présente « La situation du cancer en France en 2012 ». Une projection pour 2011 y est présentée et indique, pour le cancer du sein en France, une incidence de 53 000 nouveaux cas, nettement devant toutes autres formes de cancers pouvant toucher les femmes (colon-rectum 19000, poumon 12000). Ce cancer représente statistiquement 33% des cancers féminins et 15% des cancers tout sexe confondu. Environ 60% des nouveaux cas apparaissent chez les femmes âgées de 50 à 74 ans, avec un âge moyen de détection de 61 ans selon des données de 2005. En France, entre 2004 et 2008, 11359 décès par an dus à ce type de cancer ont été observés. Le taux de mortalité tend à baisser depuis la période 1994-1998. L'augmentation de l'incidence du cancer du sein et la diminution de la mortalité, peuvent être expliqués par respectivement la généralisation du dépistage et l'amélioration de la prise en charge thérapeutique (Rapport de l'institut national du cancer : La situation du cancer en France en 2012).

Les enjeux majeurs, concernant ce type de cancer, sont la prévention, le dépistage précoce, la caractérisation exhaustive de la tumeur pour envisager la thérapie la mieux adaptée pour chaque patiente, en limitant les effets secondaires et éviter la récurrence. Pour caractériser les tumeurs mammaires, il existe un certain nombre de critères utilisés en routine par les cliniciens.

### **b. Outils/ critères de caractérisation des tumeurs mammaires utilisés en clinique**

Pour chaque patiente atteinte d'un cancer, un dossier personnalisé est constitué incluant tous les éléments la concernant, la caractérisation de la tumeur initiale et l'évolution de la tumeur, les différents protocoles de traitement. Du matériel prélevé, pour les différentes analyses (biopsies, liquides corporels tels que urine, sang) ou lors de l'exérèse de la tumeur, est stocké.

L'ensemble de ces données et échantillons stockés sont utilisés en recherche pour apporter de futurs outils de

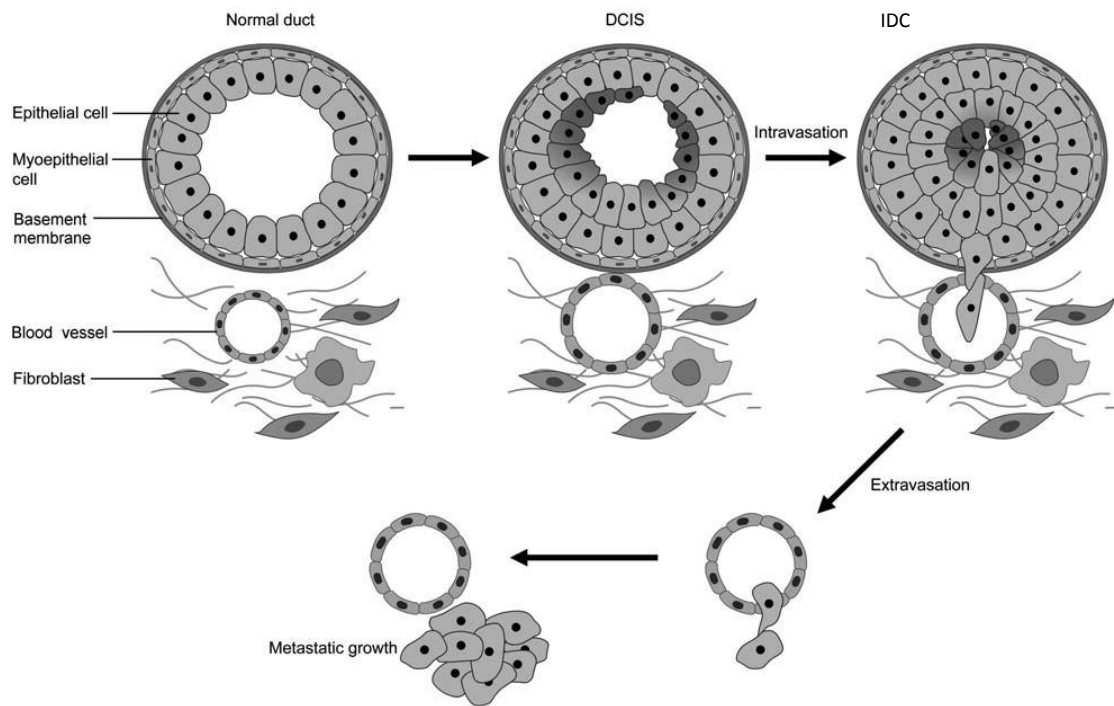


Figure 31 : Cascade d'évolution métastatique du cancer du carcinome canalaire *in situ* (DCIS) devenant un carcinome canalaire infiltrant (IDC) (Scully et al 2012).

diagnostic ou de pronostic. Une connaissance des outils actuels est nécessaire pour comprendre la comparaison des cohortes de patientes dans les études réalisées en recherche.

## 1. Classification anatomo-pathologique

Les adénocarcinomes représentent 98% des cancers du sein, se répartissent en carcinomes *in situ*, non invasifs, et en carcinomes invasifs.

\* Il existe deux types de carcinomes *in situ*, le carcinome canalaire *in situ* (CCIS) et le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS). La prolifération épithéliale maligne se situe dans la lumière du canal extralobulaire pour le CCIS (Figure 31) ou celle des acini et des conduits intralobulaires pour le CLIS. Le CCIS représente 80% des carcinomes non invasifs et 15 à 20% des carcinomes mammaires. Ces carcinomes *in situ* sont plus fréquemment diagnostiqués depuis l'utilisation plus répandue de la mammographie. Non diagnostiqués, et donc non traités, certains peuvent poursuivre leur développement et devenir infiltrants (Mallon et al 2000, Siziopikou 2013, Dauplat et Penault-Llorca 2004).

\* 70 à 85% des cancers du sein diagnostiqués sont des carcinomes infiltrants. Ces cancers, peuvent soit avoir envahi le stroma réactionnel à proximité des conduits mammaires, soit avoir envahi des ganglions lymphatiques locaux, soit avoir généré des métastases à distance. On distingue deux types de carcinomes mammaires invasifs : le carcinome canalaire infiltrant (CCI), qui représente 60 à 80% des cas, ou le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) pour 10% des cas.

Le CCI se présente sous la forme d'une lésion isolée dans 30% des cas (Blétard et al 2011). Dans 70% des cas, le cancer s'est répandu et représente l'évolution invasive la plus courante (Scully et al 2012).

Pour le carcinome lobulaire infiltrant (CLI), les cellules cancéreuses traversent la paroi des lobules et se disséminent dans les tissus environnants. Il représente environ 10% des cancers malins du sein. Les cellules tumorales, originellement issues d'un CLIS, s'infiltrent les unes derrière les autres en file indienne dans le stroma réactif.

D'autres formes de cancers mammaires plus rares existent (Mallon et al 2000).



TNM	Description
T <sub>is</sub>	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm or less in greatest dimension
T1a	0.5 cm or less
T1b	>0.5 cm but ≤ 1 cm
T1c	>1 cm but ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 cm but ≤ 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Tumor of any size with direct extension to chest wall, skin
N0	No regional lymph node metastases
N1	Metastases to moveable ipsilateral axillary lymph nodes
N2	Metastases to fixed ipsilateral axillary lymph nodes
N3	Metastases to ipsilateral internal mammary lymph nodes
M0	No distant metastases
M1	Distant metastases (including supraclavicular lymph nodes)

TNM Stage	
Stage	Description
0	T <sub>is</sub> , N0, M0
I	T1, N0, M0
IIA	T0, N1, M0 or T1, N1, M0 or T2, N0, M0
IIB	T2, N1, M0 or T3, N0, M0
IIIA	T0–T2, N2, M0 or T3, N1, M0
IIIB	T4, any N, M0, or any T, N3, M0
IV	any T, any N, M1

Figure 32 : Définition de la classification TNM et des stades (Richie et Swanson 2003).

Description	1	2	3
Mitotic count	few	(—)	many
Tubule formation	>75% of tumor	(—)	<10% of tumor
Pleomorphism	minimal variation	(—)	marked variation

A total grade of 3 is most favorable, and a total grade of 9 is least favorable

\* Elston C, Ellis I, eds. *The Breast*. Vol 13. Churchill Livingstone; 1998.

Figure 33 : Établissement des grades avec la classification Nottingham et évolution de la maladie (Richie et Swanson 2003).

## 2. Stades et grades histologiques

Une classification par stade, appelée TNM, proposée par Pierre Denoix et validée en 1953 par l'Union Internationale Contre le Cancer, est établie sur la base d'un interrogatoire et d'un examen clinique du patient, puis confirmée par analyse histologique.

Ce système TNM décrit de façon anatomique l'importance de l'expansion de la maladie grâce à trois composants : T correspond à la taille de la tumeur, N fait référence à la présence ou l'absence de métastase touchant les ganglions lymphatiques, M indique la présence ou non de métastases distantes. La classification par stade de 0 à IV est présentée dans la Figure 32 (Richie et Swanson 2003).

A cette classification par stade, s'ajoute une classification par grade dont la plus couramment utilisée est le système Nottingham (une modification par Elston-Ellis du système gradant de Bloom-Richardson) (Rakha et al 2008). Elle est évaluée par l'anatomopathologiste après examen microscopique de biopsies sur la base de 3 critères (architecture de la tumeur, index mitotique, forme et taille du noyau). Pour chaque critère, des scores allant de 1 à 3 vont être établis (du plus favorable au plus défavorable) ; l'addition des scores va permettre de classer les cancers en 3 grades. Le grade 1 est un cancer à croissance lente, avec de faibles risques de propagation. Le grade 2 correspond à une évolution moyenne, et le grade 3 à une évolution rapide avec de forts risques de propagation (Figure 33).

## 3. Classement par analyse en immunohistochimie de biopsies

Pour compléter la caractérisation de la tumeur, trois marqueurs sont principalement recherchés par immunohistochimie : les récepteurs à la progestérone, aux œstrogènes et à l'EGF humain-2 (HER-2) (O'Brien et al 2013). Ils sont déterminants pour orienter la thérapie des patientes.

Parmi les récepteurs hormonaux, le récepteur aux œstrogènes (ER) existe sous deux formes ER $\alpha$  et ER $\beta$ . ER $\alpha$  est requis en condition normale dans l'épithélium mammaire pour favoriser l'élongation canalaire durant la puberté et l'invasion du stroma, et ER $\beta$  est impliqué dans la différenciation de l'épithélium mammaire. Des souris KO pour ER $\beta$  montrent un développement normal de la glande mammaire, tandis que celles rendues KO pour ER $\alpha$



présentent des anomalies dans le développement mammaire postpartum. Seulement 10% des cellules des conduits mammaires expriment ER $\alpha$  ; tandis que très tôt dans processus de cancérogenèse, le gène ER $\alpha$  est surexprimé de sorte que 70% des carcinomes mammaires invasifs l'expriment. Ce récepteur est donc utilisé comme marqueur pronostic et est une cible thérapeutique (Pelekanou et Leclercq 2011). L'expression accrue de ce récepteur aux œstrogènes permet de proposer aux malades l'hormonothérapie, qui consiste à inhiber la biosynthèse endogène d'œstrogènes, par prise d'anti-aromatase (De Cremoux 2011).

Les récepteurs de la progestérone, PR-A et PR-B, sont sous le contrôle des œstrogènes et ces récepteurs sont également considérés comme facteur pronostic du cancer du sein (Giangrande et al. 1997). Une analyse par immunoblot de 202 cancers du sein PR-positifs a montré que les niveaux d'expression de PR-A étaient plus élevés que ceux de PR-B dans 59% des tumeurs, et l'étaient d'au moins un facteur 4 dans 25% des cas. Les résultats obtenus *in vitro* indiquent que PR-A peut agir comme un répresseur de PR-B suggérant que les tumeurs contenant principalement PR-A peuvent permettre d'identifier un sous-ensemble de patients présentant une réponse faible ou aberrante aux agents endocriniens (Graham et al 1995).

Les études de profil d'expression génique dans les tumeurs mammaires ont permis de mettre en évidence une amplification du gène HER2/neu, un des membres de la famille des gènes HER (Human Epidermal growth factor Receptor). Cette amplification du gène conduit à la surexpression de la protéine ErbB2, dès les premiers stades de la carcinogénèse mammaire (Jacobs 2000). Le statut HER2 positif est retrouvé dans 10-25% des cas, et est associé à un mauvais pronostic (Blétard et al 2011). La surexpression de HER2 est inversement corrélée avec l'expression d'ER et de PR (Cho et al 2008). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé spécifiquement contre ErbB2 représente une des stratégies thérapeutiques ciblées, proposée aux patientes dont les tumeurs surexpriment ce récepteur. En général, 70 à 90% des patientes atteintes de cancers du sein sont diagnostiquées HER2 négative et elles n'ont donc pas accès aux thérapies ciblant cette protéine. Cependant environ 20% de ces patientes pourraient être mal classées car elles risquent de développer un cancer du sein en récurrence HER2 positif. Ceci a été démontré sur des tumeurs primaires HER2 négatives, qui présentent des métastases HER2 positives ou des cellules circulantes dans le sang HER2 positives (Carney et al 2013).

Il existe des tumeurs dites « triples négatives » (ER-, PR-, HER2-) qui ne peuvent bénéficier ni de l'hormonothérapie, ni d'un traitement ciblant la protéine ErbB2.



#### 4. Les marqueurs sériques

Utiliser les fluides corporels, tel que le sang ou les urines, pour détecter le plus précocement possible et pouvant donner une information sur l'avancée de la progression tumorale, est un enjeu majeur pour les cliniciens. Pour le cancer du sein, le manque de sensibilité et de spécificité des marqueurs sériques disponibles dans les stades précoces de la maladie exclut leur utilisation pour le diagnostic précoce. Par exemple, le CA 15-3 qui est le marqueur le plus reconnu dans cette pathologie, n'augmente que pour environ 10% des patientes avec un stade I, pour 20% pour un stade II, pour 40% pour un stade III et pour 75% des patientes au stade IV. La concentration de CA 15-3, augmentée de 5 à 10 fois par rapport à la limite haute fixée par l'intervalle de référence, est suffisante pour alerter le médecin sur la présence possible de métastases. Cependant, le CA 15-3 manque de spécificité, car il peut être surexprimé chez 5% de personnes saines et chez des patients avec des maladies bénignes, touchant spécialement le foie. Il n'est pas non plus spécifique des carcinomes mammaires, étant retrouvé chez des patients avec d'autres adénocarcinomes (Duffy 2006, Lamerz et al 1993).

D'autres marqueurs existent. Une mucine épithéliale polymorphe de la famille MUC-1, comme le CA 15-3, est principalement utilisée pour le suivi thérapeutique (afin de contrôler l'efficacité du traitement) et post thérapeutique (pour détecter les risques de récurrence). Le marqueur ACE (antigène carcino-embryonnaire) est également utilisé mais avec moins de sensibilité et de spécificité diagnostic, que les 2 précédents. TPA/TPS reflète d'avantage une activité proliférative de la tumeur.

Les informations collectées, sur la base des approches décrites ci-dessus, restent cependant insuffisantes ; ce qui explique les nombreuses recherches en cours pour caractériser la tumeur, identifier de nouveaux marqueurs de diagnostic et pronostic et trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

De nos jours, les marqueurs pronostics classiques sont capables d'identifier un devenir favorable ou défavorable en termes de métastases pour environ 30% des patientes. Pour les 70% restantes, de nouveaux marqueurs sont nécessaires pour identifier les groupes à haut-risque et les groupes à bas-risque (Weigelt et al 2005).



### c. Outils développés en recherche

#### 1. Les Micro arrays à l'origine d'une nouvelle classification à partir de biopsies

Les avancées technologiques telles que les puces à ADN ont permis de classer plus finement les tumeurs du sein selon leur profil d'expression génique et ainsi d'établir quatre nouveaux types moléculaires de carcinomes mammaires, chacun possédant sa propre signature intrinsèque par rapport au tissu normal (Perou et al 2000, Sorlie et al 2003). Les types Luminal A, Luminal B, Basal et ErbB2 représentent respectivement 40%, 20%, 15 à 18% et 20 à 30% des cas de cancers mammaires, et montrent des différences en termes d'incidence, de facteur de risque, de pronostic, d'âge de diagnostic et de réponse aux traitements (Parker et al 2009, Prat et al 2013).

Le type Basal ou Basal-like exprime des gènes normalement associés aux cellules myoépithéliales. Ces tumeurs présentent deux altérations génétiques majeures touchant les récepteurs aux œstrogènes et à ErbB2, qui ne sont plus exprimés. Elles présentent un taux d'expression élevé des gènes de prolifération, et 82% des tumeurs présentent des mutations de TP53. Elles se caractérisent par une fréquence élevée de mutations de BRCA1. Ce groupe inclut la majorité des tumeurs dites « triples-négatives », n'exprimant ni les récepteurs aux œstrogènes ER, ni les récepteurs à la progestérone PR, ni ErbB2. Cependant ces tumeurs « triples négatives » peuvent être réparties de façon plus mineure dans les autres catégories (Kittaneh et al 2013). Le grade histologique de ces tumeurs Basal-like est élevé ; elles possèdent le pronostic de survie le plus défavorable et paraît affecter des femmes plus jeunes (Bertucci et al 2012, Livasy et al 2006). Une intensification de la recherche porte sur ce groupe.

Le type ErbB2 est caractérisé par une forte expression de HER2/neu. Ce type de tumeurs exprime faiblement les gènes du Type Luminal (des cytokératines CK7, 8, 18, 19 et d'autres). Ces tumeurs sont usuellement, mais pas toujours, HER2-positives et ER/PR négatives (Kittaneh et al 2013). Il inclut les tumeurs apocrines et canalaire infiltrantes de grade II et III exprimant fortement ErbB2. Elles sont de pronostic défavorable (Camponé et al 2011).

Le type Luminal se décompose en Luminal A et Luminal B ; leur profil d'expression génique se rapproche fortement de celui des cellules épithéliales lumbales mammaires (expression de





CR8/9 et CK19) (Bertucci et al 2012). Les tumeurs de type Luminal A expriment très fortement ER, et sous expriment HER2 et l'ensemble des gènes de prolifération. Un faible pourcentage de tumeurs présente des mutations pour BRCA2. Le pronostic vital est plutôt favorable. Le type Luminal B a une expression ER bien plus faible, peut exprimer HER2 de façon plus variable et exprime très fortement les gènes de prolifération. Le type B est moins fréquent (20%) que le type A (40%), et a un pronostic vital plus défavorable (Sorlie et al 2003, Kittaneh et al 2013).

Une étude sur de nombreuses lignées commerciales de cancer mammaire a permis de classer ces dernières selon ces 4 types moléculaires, permettant de mettre en perspective les résultats d'agressivité ou autres, obtenus *in vitro*, avec les résultats d'analyses sur biopsies de patientes, sur la base de cette nouvelle classification (Neve et al 2006).

## 2. Les Marqueurs protéiques en immunohistochimie sur biopsies

Différentes pistes sont explorées. Quelques exemples sont présentés ci-dessous.

La protéine Ki-67 est l'un des marqueurs dominants en cancérologie mammaire. Cette protéine de 36 kDa est exprimée dans le noyau des cellules en prolifération, au cours des phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire. Sa fonction précise n'est pas connue, mais sa participation au maintien du pouvoir prolifératif ou au contrôle du cycle cellulaire est suggérée (Scholzen et Geres 2000). De nombreuses études concernant Ki-67 ont été réalisées sur des tumeurs mammaires, qui le révèlent comme un excellent marqueur prolifératif des cellules tumorales mammaires ; car la fraction de cellules Ki-67 positives dans une tumeur est souvent corrélée avec le stade clinique de la maladie (Nicolini et al. 2006). L'antigène Ki-67 permet de déterminer la fraction de la tumeur en croissance et semble corrélé aux facteurs diagnostics histologiques (Tawfik et al 2012). L'expression de Ki-67 est inversement corrélée à la présence d'ER $\alpha$ , et corrélée à la présence d'ER $\beta$  (Rosa et al 2008).

Le Vascular endothelial growth factor (VEGF), principalement VEGF de type A, est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Son rôle est de favoriser la néoangiogenèse tumorale, qui correspond à un mécanisme de développement de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ces néovaisseaux contribuent à l'apport en nutriments nécessaires à la croissance tumorale, et facilitent la dissémination métastatique. Il est donc un facteur pronostic défavorable (Gasparini et al. 1997).

**Table 1: Aberrant expression of miRNAs in breast cancer**

Authors (year)[Ref.]	Samples used*	Method(s) used	Key miRNA changes	
			Up-regulated	Down-regulated
Michael <i>et al.</i> (2003)[14]	MCF-7, T47D breast cancer cell line	Northern blot		miR-143 miR-145 miR-16 let-7a-1
Lu <i>et al.</i> (2005)[15]	Breast cancer tumor tissues (6) vs. normal tissues (5) MCF-7 cell line	Bead-based flow cytometry Northern blot	miR-21	let-7
Iorio <i>et al.</i> (2005)[16]	Breast cancer tumor tissues (76) vs. normal tissues (30) Breast cancer cell lines	miRNA microarray Northern blot	miR-21 miR-155 miR-206 miR-122a miR-210	let-7 miR-10b miR-125a miR-125b miR-145
Volinia <i>et al.</i> (2006)[17]	Breast cancer tumor tissues (79) vs. normal tissues (6)	miRNA microarray	miR-21 miR-155 miR-206 miR-122a miR-210	let-7 miR-10b miR-125a miR-125b miR-145
Si <i>et al.</i> (2006)[29]	Breast cancer tumor tissues (5) vs. normal tissues (5) MCF-7 cell line	TaqMan RT-PCR	miR-21	

\*The number in parentheses at the 2<sup>nd</sup> column represents how many samples were used in the study.

Figure 34 : Expression aberrante de miRNAs dans le cancer du sein (Wang et Wu, 2007).

Le PCNA (proliferation cell nuclear antigen), facteur nucléaire indispensable à la réplication de l'ADN dans les cellules proliférantes, est l'un des biomarqueurs potentiels du cancer du sein. Présent en grande quantité, PCNA apparaît comme un marqueur de virulence, et est corrélé à la présence de p53 muté, associé à une tumeur de grade élevé et à des métastases distantes (Heimann et Hellman 2000, Mukhtar et al 2012, Schimmelpenning et al 1994).

D'autres marqueurs potentiels, tels que la E-cadhérine, la vimentine, les intégrines et les enzymes protéolytiques (uPA et MMPs), sont actuellement à l'étude (Heimann et Hellman 2000). Par ailleurs, sept gènes ont été identifiés comme étant surexprimés au stade précoce du carcinome canalaire *in situ* : DEPDC1, NUSAP1, EXO1, RRM2, FOXM1, MUC1 et SPP1 (Kretschmer et al 2011).

### 3. Les Micro-ARNs, marqueurs de diagnostic prometteurs sur biopsies ou liquides corporels

Avec la découverte de centaines de gènes produisant des ARNs non codant (ncRNAs), le génome s'est complexifié. Les plus petits de ces nc-RNAs sont les microARNs (miRNAs). Ce sont des séquences de 20-22 nucléotides, de structure en épingle, excisés d'ARNs précurseurs de 60 à 110 nucléotides. Ils sont impliqués dans des processus biologiques cruciaux tels que le développement, la prolifération, l'apoptose et la différenciation (Calin et Croce 2006). En 2012, 1434 miRNAs humains ont été recensés (Gu et al 2012).

Lu et al (2005) ont été les premiers à établir les profils aberrants d'expression des miRNAs dans un large échantillonnage (334) de multiples tissus tumoraux humains incluant des cancers du colon, rein, prostate, poumon, utérus et sein. Plus de la moitié des miRNAs testés (129/217) sont sous-régulés dans les tissus cancéreux comparés au tissu sain. Un profil d'expression de miRNAs a été établi en fonction de l'origine de la tumeur (épithéliale ou hématopoïétique) et en fonction de son stade de différenciation (17 tumeurs peu différenciées/68 plus différenciées et appartenant à différents types de cancers) (Lu et al 2005).

Pour le cancer du sein, une revue de 2007 présente un premier bilan de profils aberrants d'expression de miRNAs. La Figure 34 présente les variations confirmées dans les différentes études présentées (Wang et Wu, 2007). Des profils d'expression différentielle ont également

Genes	Loci	log2 fold change	Adjusted P.value				
miR-129-3p	11p11.2	-23.86634845	0.0506	miR-874	5q31.2	-2.829348053	0.000438618
miR-668	14q32.31	-15.87301587	0.04	miR-100	11q24.1	-2.781736443	7.32E-05
miR-488	1q25.2	-5.617314544	6.33E-06	miR-183*	7q32.2	5.93253603	0.010473616
miR-204	9q21.12	-4.752087104	4.63E-07	miR-454*	17q22	5.252342351	0.000237826
miR-215	1q41	-4.407307647	0.005803931	let-7g*	3p21.1	4.984783172	0.038198527
miR-139-3p	11q13.4	-3.750253537	3.49E-05	miR-592	7q31.33	3.914412027	0.051848409
miR-205	1q32.2	-3.584191223	1.63E-05	miR-190b	1q21.3	3.822193954	0.011638475
miR-654-3p	14q32.31	-3.321708086	0.003627753	miR-449a	5q11.2	3.546100694	0.044712337
miR-337-5p	14q32.2	-3.27939216	0.00019613	miR-760	1p22.1	3.231671879	0.058593441
miR-451	17q11.2	-3.174627414	0.001302005	miR-210	11p15.5	2.973935913	0.016929322
miR-504	Xq26.3	-3.157463711	0.001762529	miR-148b*	7p15.2	2.786665283	0.000432485
miR-518b	19q13.42	-3.153532596	0.001739482	miR-188-5p	Xp11.23	2.55450304	0.034381478
miR-483-5p	11p15.5	-2.964422269	0.001296854	miR-425	3p21.31	2.477271454	0.00683419
miR-497	17p13.1	-2.958883061	4.03E-05	miR-877	5p15.1	2.226445287	0.010473616
miR-486-3p	8p11.21	-2.93777587	5.35E-05	miR-629*	15q23	2.188160454	0.056679644
miR-145	5q32	-2.909161828	0.001369377	miR-301b	22q11.21	2.033976085	0.036983438
miR-543	14q32.31	-2.874385872	2.07E-05	miR-636	17q25.1	1.706601183	0.020686329
miR-99a	21q21.1	-2.842203759	0.000378898	miR-21	17q23.1	1.271732126	0.052188036

Figure 35 : différences d'expression de microARNs entre les tissus sains et cancéreux mammaires (Romero-Cordoba et al 2012).

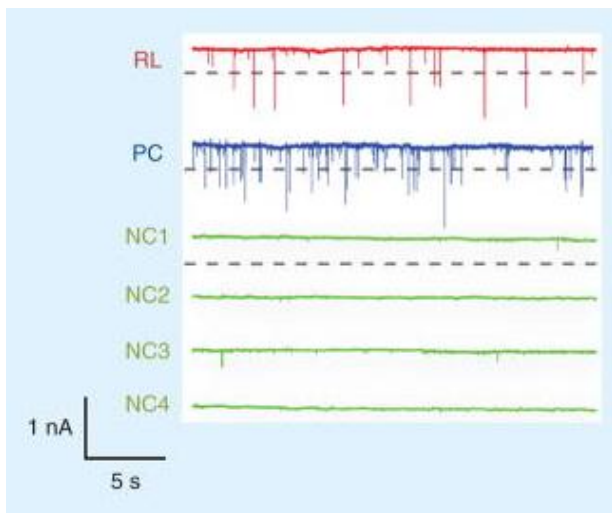


Figure 36 : Détection d'un miRNAs, le miR-122a, utilisant un nanopore solide de 3 nm de diamètre dans une membrane épaisse de 7 nm. 1 ug d'ARNs totaux de foie de rat est incubé avec une sonde spécifique dirigée contre le miR-122a. Le complexe sonde spécifique / miR-122a (RL) est purifié sur billes. Traces représentatives de 30 secondes, du courant en fonction du temps, issues d'un pore après l'addition du complexe (RL), ou d'un contrôle positif (PC) de 30ng de miR-122a ou de quatre contrôles négatifs (NC1-NC4). Ces derniers n'ont produit aucun signal en dessous du seuil qui a été fixé à  $I_0 - 0.4$  nA (lignes en pointillés gris), où  $I_0$  est le courant de référence (Wanunu et al 2010).

été retrouvés dans les 5 types de tumeurs identifiées sur la base de leur expression génomique (Luminal A, luminal B, Basal-like, HER2+, Normal-like) ; par contre, ces auteurs ne retrouvent pas de séparation nette d'expression de miRNAs entre le tissu normal et tumoral, décrite précédemment (Blenkiron et al 2007). Avec la mise au point et l'adaptation de la RT-PCR quantitative à la détection de miRNAs, et l'élargissement du nombre de miRNAs connus, de nouvelles études ont pu être menées sur le cancer mammaire. Notamment, Romero-Cordoba et al (2012) ont montré que sur 669 miRNAs testés, 133 présentaient une expression dérégulée en comparant 29 tissus cancéreux à 21 tissus sains adjacents (Figure 35).

L'ensemble de ces études démontrent la pertinence d'utiliser les miRNAs comme marqueurs du cancer à partir de biopsies de patientes.

Les miRNAs sont constamment relâchés de la tumeur primaire et peuvent se retrouver dans le compartiment sanguin (où ils sont très stables). Deux études démontrent la faisabilité de détecter ces miRNAs circulants, malgré leur présence à taux faibles. Par la technique de RT-PCR quantitative, Zheng et al (2011) ont testé, sur des échantillons de plasma, 15 miRNAs fréquemment surexprimés dans les tumeurs primaires de poumon ; 3 miRNAs (miR-155, miR-197, miR-182) ont été identifiés dans le plasma comme étant significativement surexprimés chez les patients atteints du cancer par rapport aux individus contrôles. La combinaison des 3 marqueurs mène à 91% de sensibilité et 87% de spécificité dans la discrimination de ce type de cancer. Ainsi, les miRNAs circulants pourraient être utilisés comme des biomarqueurs dans la détection précoce de cancer du poumon, et pour le suivi des patients lors de la prise en charge thérapeutique.

La difficulté de la détection des miRNAs par cette méthode vient du choix de primers sens et anti-sens adaptés à la longueur de la séquence (6-7 nm). En effet, plus la séquence du primer est courte moins il est spécifique d'une séquence. Pour pallier à cette difficulté, l'approche de détection par nanopore a été testée.

Une première étude sur nanopore solide de 3 nm de diamètre a été réalisée sur des extraits tissulaires de foie à partir d'extraits d'ARNs totaux (Figure 36). Une sonde spécifique du miRNA-122a est ajoutée afin de générer des ARNs double brins qui seront ensuite purifiés sur billes liant la protéine p19 (protéine virale liant exclusivement les ARNs double brins). Cette étude a montré la faisabilité de quantifier un miRNA spécifique de 20pb dans un extrait d'ARNs cellulaires avec un bon rapport signal-bruit (Wanunu et al 2010).

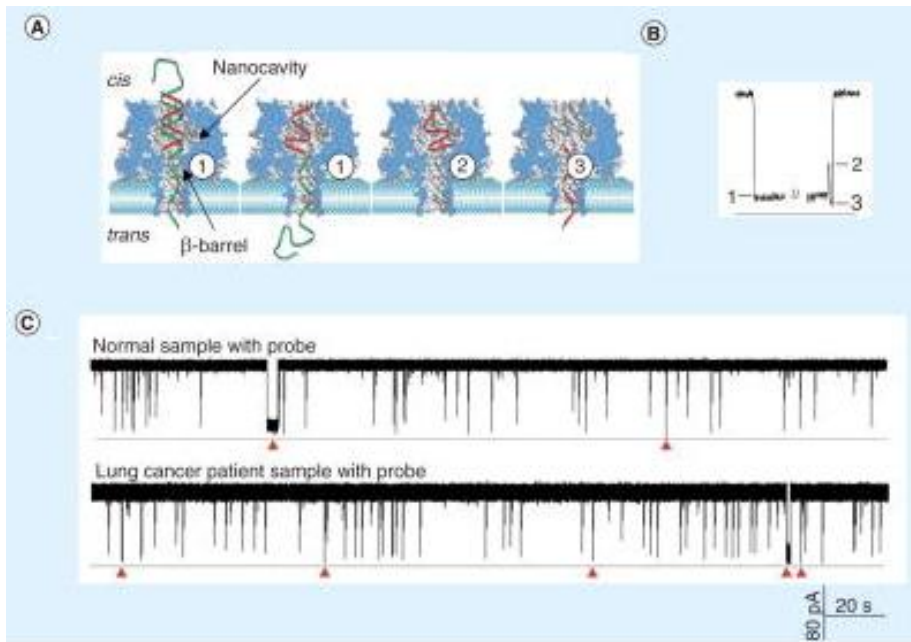


Figure 37 : Détection de miRNAs en utilisant un nanopore protéique. (A) Mécanisme moléculaire de la dissociation du complexe miRNA/sonde et la translocation dans le nanopore. L'extrait ARN total, préincubé avec la sonde a été ajouté à la solution du compartiment cis. (B) Long blocage dans le nanopore, typique d'une signature générée par le complexe miR-155/sonde P155. Trace enregistrée à 100 mV dans une solution contenant 1 M KCl tamponné avec du Tris 10 mM (pH 8,0). Niveau 1 : le piégeage du complexe miRNA/sonde dans le pore, la séparation du miRNA de la sonde et la translocation de la sonde à travers le pore. Niveau 2 : le miRNA décompressé résidant dans la cavité du pore. Niveau 3 : la translocation du miRNA décompressé à travers le pore. (C) traces de courant obtenus avec des ARNs totaux de patients sains (échantillon normal) et avec des patients atteints de cancer du poumon, tous deux préalablement incubés en présence de sonde P155. Les traces ont été enregistrées dans du KCl 1 M à +100 mV. Les flèches rouges indiquent les signatures d'événements correspondant à la translocation du complexe (Wang et al 2011).

Wang et al (2011) ont utilisé un nanopore protéique, l' $\alpha$ -hémolysine de *staphylococcus aureus*, pour détecter le miRNA-155, choisi parmi un ensemble de 100 miRNAs connus pour être dérégulés dans le cancer du poumon, sur du plasma de patients atteints de cancer et de sujets sains (Figure 37). La détection a été réalisée sur un extrait ARN total auquel a été ajoutée une sonde spécifique P155 du miRNA-155 pour chaque échantillon de plasma. Les fréquences d'événements de blocage de courant (signature du complexe) pour les patients atteints de cancer sont plus élevées que celles du groupe contrôle. Le nanopore protéique, utilisé comme capteur de miRNAs à l'aide d'une sonde oligonucléotidique, a permis de générer un signal électrique direct (sans marquage préalable) pour détecter des miRNAs cibles dans l'extrait ARN total issu du plasma de patient.



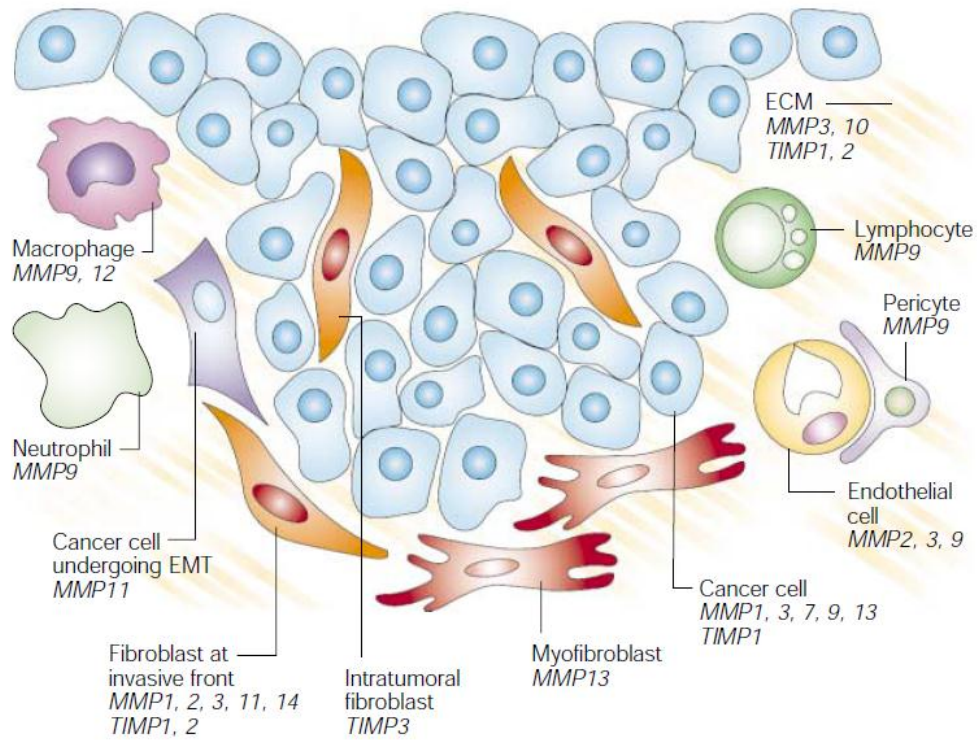


Figure 38 : Expression et TIMPs et MMPs dans la tumeur du sein. En plus des cellules tumorales, les cellules stromales coopèrent à la progression métastatique en sécrétant des MMPs et TIMPs (Egeblad et Werb 2002).

#### 4. MMPs, en tant que marqueurs de diagnostic et/ou pronostic ?

Le stroma tumoral joue un rôle majeur dans le développement de la tumeur mammaire (Polette et al 1994). Ce stroma tumoral inclut divers types cellulaires tels que des fibroblastes, des adipocytes, des cellules endothéliales, des cellules inflammatoires, des cellules du système immunitaire. Une communication complexe s'établit entre ces cellules, dont les fonctions vont être détournées au profit de la tumeur. Entre autre, la régulation homéostatique de la production des MMPs sera perdue au profit d'un excès d'activité de dégradation et de remaniement matriciel au sein de la tumeur (Sternlicht et Werb 2001). La Figure 38 illustre la diversité de types cellulaires présents au sein de la tumeur mammaire et leurs productions respectives de MMPs et d'inhibiteurs de MMPs (Egeblad et Werb 2002).

De nombreuses études plus récentes, incluant de nouvelles MMPs, ont été réalisées sur biopsies de patientes classées selon les critères cliniques de caractérisation de tumeurs mammaires (tels que les stades TNM, grades, statut d'expression ER, PR, HER2, parfois selon le protocole de traitement des patientes) afin d'identifier les MMPs, produites selon les stades de développement du cancer, et ainsi que d'identifier les cellules à l'origine de leur production. Quelques exemples sont présentés ci-dessous, qui montre la diversité des résultats obtenus à travers des études portant soit au niveau de l'expression des ARNs (Figure 39) ou au niveau protéique (Figure 40), et démontrent la grande complexité du système étudié. L'objectif de ces études est de déterminer si ces protéases peuvent être utilisées comme marqueurs pronostic et/ou pronostic, ou être ciblées dans le cadre de traitements thérapeutiques.

Auteurs	technique	MMPs testées	biopsies	variation des taux d'ARNm
Dalberg et al (2000)	Hybridation in situ	2	tissu normal tissu tumoral (18) classification histo-logique, statut ER, PR	↑ MMP14 dans les cellules tumorales ↑ MMP2 dans les cellules du stroma péri-tumoral
Têtu et al (2006)	Hybridation in situ	2	tissu tumoral (539) classification TNM, grade, statut ER, PR, HER2	↑ MMP2 et 14 principalement dans les cellules du stroma péri-tumoral, et seul MMP14 apparaît comme un facteur pronostic défavorable pour la survie
McGowan et al (2008) selon données de Van de Vijver et al, 2002	Microarray	17	pas de tissu normal Tumeur (295) : classification TNM, grade; statut ER	↑ MMP1, 9, 12, 15 dans tumeurs de grade élevé ↑ MMP1 dans tumeurs > 2cm ↑ MMP1, 9, 12, 14, 15 corrélée à faible taux de survie; seul MMP14 apparaît comme un marqueur pronostic indépendant
Figueira et al (2009)	RT-PCR quantitative	3	Tissu normal (30) tumeur primaire (72), statut ER, PR et d'invasion des nodules lymphatiques,	↑ MMP2, 14 entre tissu normal et tumoral
Kohrmann et al (2009)	RT-PCR semi-quantitative	19	Tissu normal (5) tissu tumoral, grade 2 (10), grade 3 (10) Classification TNM, statut ER, PR, HER2	↑ MMP1, 9, 11, 13, 28 entre tissu normal et tumoral de grade 2 et/ou 3 ↓ MMP7
Zhang et al, 2013	RT-PCR semi-quantitative	4	Tissu normal Tissu tumoral (120) Classification TNM, identification histologique	↑ MMP2, 7, 9, 14 entre tissu normal et tumoral, corrélée à la taille de la tumeur (T1 à T4) et à l'invasion des nodules lymphatiques (N0 à N3)

Figure 38 : Expression d'ARNm à partir de biopsies de patientes atteintes de cancer mammaire

Auteurs	technique	MMPs testées	biopsies	variation des taux de protéine
Talvensaari-Mattila et al (2003)	Immuno-histochimie	1	Tissu tumoral (453) IDC, classification TNM, statut ER, PR, grades	↑ MMP2 associée à un faible pronostic, Si des tumeurs ER- et PR-, donc à pronostic défavorable, sont détectées MMP2-négatives, leur pronostic vital devient plus favorable
Vizoso et al (2007)	immuno-histochimie	7	tissu normal tissu tumoral (131) IDS, classification TNM, grade, statut ER, PR	↑ MMP1, 7, 9, 11, 13 dans les fibroblastes et 7, 9, 11, 13, 14 dans les cellules inflammatoires, corrélée à un taux relevé de métastases à distances ↑ MMP9 et 1 corrélée à un pronostic défavorable de survie
Zhang et al, 2008)	immuno-histochimie	1	tissu tumoral (263) carcinomes invasifs classification TNM, grade, statut ER, PR	↑ MMP13 dans cytoplasme des cellules tumorales et stromales péri-tumorales ↑ MMP13 corrélée au phénotype invasif et inversement corrélée à la survie du patient, (non corrélée à la taille de la tumeur, au grade histologique, ni au statut ER, PR)
Kohrmann et al (2009)	western blot	17	Tissu normal (5) tissu tumoral, grade 2 (10), grade 3 (10) Classification TNM, statut ER, PR, HER2	↑ des formes actives et inactives de MMP1, 8, 11, 12, 15 entre tissu normal et tumoral de grade 2 et/ou 3 ↑ des formes inactives de MMP3, 9, 2, 24, 26 entre tissu normal et tumoral de grade 2 et/ou 3

Figure 40 : Détection de MMPs sur des biopsies de patientes atteintes de cancer mammaire.

Au bilan, il est classiquement admis que les MMP-9, MMP-2 (plus controversé), MMP-1, MMP-11, MMP-13 et MMP-14 sont surexprimées dans les cancers mammaires ; leurs taux élevés sont corrélés à des paramètres d'agressivité de la tumeur et généralement associés à un pronostic défavorable pour le patient.

\* Les MMP-9 et -2, de par leur capacité à dégrader la lame basale, sont essentielles dans le processus d'invasion (Klein et Bischoff 2011). La MMP-9 est exprimée dans les carcinomes mammaires invasifs, et non dans les carcinomes *in situ*, ni dans les glandes mammaires avec hyperplasie (Kupferman et al 2000).

\* La MMP-1, dégradant efficacement le collagène de Type I, participe à l'invasion du tissu conjonctif par la tumeur. Un taux de production élevé est corrélé au grade élevé de la tumeur (Köhrmann et al 2009) et se traduit par un taux de survie réduit pour les patientes (Vizoso et al 2007). Köhrmann et al (2009) observent une production clairement restreinte aux cellules tumorales, même si d'autres études sont divisées sur cet aspect (Heppner et al 1996). Le rôle de la MMP-1 est confirmé dans des études sur des modèles de xénogreffe de souris ; sa surexpression dans des lignées cellulaires mammaires humaines augmente le taux de croissance de la tumeur (Minn et al 2005), tandis que sa sous-expression dans une lignée mammaire invasive, les MDA-MB-231, réduit sa taille (Wyatt et al 2005).

\* La MMP-11 est préférentiellement exprimée par les cellules du stroma tumoral ; elle est fortement associée aux carcinomes canaux in situ (CCIS) avec microinvasions. (Gonzalez et al 2009), suggérant l'implication de cette enzyme dans la progression du cancer. Des souris, prédisposées à développer spontanément des cancers mammaires et rendues déficientes pour la production de MMP-11, présentent une augmentation des métastases, en dépit d'une réduction du nombre de carcinomes développés et une réduction de leur taille (Andarawewa et al 2005).

\* La MMP-13 est à la fois produite par les cellules stromales péri-tumorales et les cellules tumorales ; en raison de sa très large spécificité de substrat par rapport aux autres MMPs, elle jouerait, entre autre, un rôle important dans l'activation en cascade des MMPs (Balbin et al 2003).

\* La surexpression de la MMP-14 ou MT1-MMP dans les tumeurs mammaires apparaît comme un marqueur d'agressivité (Vizoso et al 2007). Elle est présente dans les carcinomes canaux invasifs, fortement exprimée par les cellules du stroma tumoral (cellules inflammatoires mononuclées et fibroblastes) (Gonzalez et al 2010). Lorsqu'elle est surexprimée, par des cellules épithéliales non malignes, ces cellules deviennent tumorigènes et invasives (Soulié et al 2005), et dans des souris transgéniques, elle induit des malformations de la glande mammaire et des adénocarcinomes (Ha et al 2001).



Des essais *in vitro* de culture 3D de lignées mammaires et *in vivo* de xéno greffe sur un modèle de souris, ont montré que la présence de MMP-14 membranaire confère aux cellules une résistance à l'apoptose, mettant en évidence un nouveau mécanisme par lequel cette enzyme favorise la progression tumorale (Maquoi et al 2012).

\* Pour la MMP8, principalement produites par les neutrophiles, des études montrent plutôt un effet inhibiteur sur le développement métastatique. Il a été également montré que, dans un modèle de xéno greffe de souris, la surexpression de MMP-8 dans des cellules métastatiques de carcinomes mammaires humains réduisait les métastases, alors que sa sous-expression dans des cellules non métastatiques mammaires humaines rendait les cellules plus métastatiques (Montel et al 2004). Cependant, une augmentation significative de MMP-8 et pro-MMP-8 dans les tissus cancéreux mammaires, par rapport au tissu normal, ont été observés (Figure 40) (Köhrmann et al 2009).

D'autres MMPs ont également été étudiées, mais de façon plus restreinte. La MMP-7 dégrade le collagène IV, la laminine et la fibronectine. Des taux accrus ont été détectés par immunohistochimie sur des tumeurs mammaires de patientes ; les auteurs ont également montré que des cellules mammaires invasives, dont la production de MMP-7 a été génétiquement éliminée et qui ont été injectées dans des souris, induisent des tumeurs dont la croissance est ralentie (Jiang et al 2005). A l'opposé, des taux intratumoraux élevés sont corrélés aux paramètres d'agressivité de la tumeur (Vizoso et al 2007). La MMP-3 a été peu étudiée, et les résultats existants sont contradictoires. Cependant une étude montre que la surexpression de MMP-3 dans des souris transgéniques développe spontanément des tumeurs malignes (Sternlicht et al 2000). Pour les autres MMPs, peu d'études ont été réalisées, et différents résultats apparaissent.



Les MMPs surexprimées dans les tissus cancéreux mammaires, telles que MMP-1, -2, -9, -11, -13, -14, peuvent se retrouver dans le sérum ou l'urine de patients (Martin et Matrisian 2004). Des études ont été menées pour déterminer si les taux détectés pouvaient avoir une valeur diagnostic ou pronostic, et s'ils pouvaient varier en fonction du stade de développement de la tumeur.

\* La présence accrue de MMP-9 dans des liquides corporels de patientes atteintes de cancer du sein a été confirmée par trois études estimant qu'une augmentation de MMP-9 dans les urines (Fernandez et al 2005), le sérum (La Rocca et al 2004) et le plasma (Ranuncolo et al 2003) est un facteur prédictif de la propagation des métastases et permettrait de suivre les réponses aux traitements. Wu et al en 2008, confirme les résultats précédents, montrant que les taux sériques de MMP-9 et TIMP-1 sont plus élevés chez les patients atteints de cancer du sein (n=60) que dans les pathologies mammaires bénignes (n=18) et les contrôles sains (n=15), sans différence significative entre les 2 derniers groupes. 63% des patientes avec un cancer du sein ont un taux de MMP-9 et TIMP-1 circulant supérieur à 230 ng/ml. Les taux sériques accrus sont associés à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques, mais également corrélés à des tumeurs de stade élevé et à une survie globale faible avec un risque accru de rechute. Une corrélation entre les taux plasmatiques et le grade histologique des tumeurs a également été démontrée (Vasaturo et al 2013). Wu et al (2008) suggèrent l'utilisation de la MMP-9 comme marqueur pour la détection de métastases, le risque de récurrence, et le diagnostic précoce du cancer du sein.

\* Le taux sérique de la MMP-2 est également accru chez les patientes atteintes de cancer de sein métastatique, et est corrélé au stade histologique des tumeurs (Vasaturo et al 2013).

\* Concernant la MMP-1, une étude récente met en évidence que son taux sérique est significativement plus bas dans le sérum de patientes atteintes de cancer du sein à des stades précoces que pour les sujets sains, et se traduit par un faible taux de survie à 5 ans. Les auteurs ont suggéré, qu'une présence élevée à ce stade, aurait au contraire un rôle positif pour la survie des patients (Kulic et al 2012).

L'utilisation des MMPs comme marqueur tumoral, détectable dans les fluides corporels, est récente. De nouvelles techniques plus sensibles vont probablement permettre d'élargir ce panel.





### **III. Modèles d'études du cancer**

L'étude de cancers humains peut être menée à partir de biopsies tumorales ou suite à l'exérèse de la tumeur. Ces échantillons tumoraux peuvent être utilisés pour caractériser la tumeur à des fins cliniques ou valider des informations obtenues, en recherche, à partir de modèles de tumeurs sur animaux ou obtenues à partir de culture 2D ou 3D *in vitro*.

Les études sur tumeurs solides humaines sont complexes. L'échantillon testé ne présente qu'un moment précis et généralement tardif dans l'évolution de la lésion. Au moment du diagnostic, les tumeurs sont déjà dans le dernier quart de leur évolution et ont vécu un minimum de 30 divisions pour atteindre 1 g (Van Staveren et al 2009).

L'expérimentation sur modèle animaux ou culture cellulaire *in vitro* est nécessaire pour obtenir des informations cinétiques du développement du cancer, des stades précoces aux stades tardifs, mener des investigations sur les mécanismes propres aux cellules cancéreuses (voies de transductions...), tester des anticancéreux potentiels et identifier de nouveaux marqueurs. De nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* ont été développés pour appréhender les mécanismes de développement du cancer (Van Staveren et al 2009).

#### **1. Modèle d'étude *in vivo*, la xénogreffe sur modèle de souris**

Les xénogreffes sur modèles animaux, induisant des tumeurs, apparaissent naturellement comme le modèle d'étude le plus proche du cancer humain puisqu'elles procurent un microenvironnement complexe aux cellules, prenant en compte la régulation physiologique générale.

L'utilisation des xénogreffes sur modèle de souris, permet d'induire des tumeurs à partir de lignées tumorales humaines ou de fragments tumoraux issus de biopsies. Il existe un ensemble de lignées commercialisées de tous les types de cancer, et pour un grand nombre d'entre elles utilisées depuis longtemps pour des études *in vitro*. De nombreuses données sont accessibles dans la littérature. Beaucoup d'études ont été réalisées en injectant les cellules tumorales en sous-cutané, formant des tumeurs dans un tissu, différent de leur tissu d'origine. Ensuite, les lignées tumorales et les fragments tumoraux prélevés chez les patients ont été implantés dans



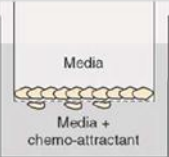

	Technique	Methodology	Advantages	Disadvantages
	<b>Movement on a 2D substrate</b>	Plate cells on 2D substrate Analyze by time-lapse microscopy	Simple and easy to image Can use different ECM components as substrates Can add growth factors Good for studying mesenchymal motility	Very artificial and can be difficult to analyze Direction of movement is random
	<b>Wound healing assay</b>	Prepare confluent cells on 2D substrate Scrape a 'wound' in the middle of the cells Analyze the number of cells moving into wound	Simple and easy to image and analyze Cells move in a defined direction Can add growth factors	Very artificial Cell-cell adhesions might interfere with cell motility and complicate analysis
	<b>Transwell/Boyden assay</b>	Plate cells in upper chamber Add chemo-attractant to lower chamber Analyze the number of cells that migrate across filter into the lower chamber Can coat the filter with ECM components that will block the pores, this adds an invasion component to the assay Dunn chamber is conceptually similar but differently organised	Relatively simple and easy to quantify Can analyze movement in response to a gradient Can add ECM components	Difficult to image with high resolution
	<b>3D invasion assays</b>	Plate cells above or below a reconstituted 3D matrix then analyze the number of cells that migrate into the matrix and the distance they move Can combine this type of assay with the transwell assay	3D environment more closely resembles <i>in vivo</i> situation Good for studying amoeboid movement and plasticity between modes of motility Can be combined with transwell assay to generate a chemo-attractant gradient Can be used to study primary tumour explants	More difficult to image and quantify than 2D assays Difficult to control chemo- attractant gradient

Figure 41 : Les différents modèles 2D et 3D utilisés dans l'étude des cancers, avantages et inconvénients (Sahai 2005).

le site d'origine (dit orthotopique) des tumeurs primaires. Ce modèle est plus fin puisque la croissance de la tumeur s'effectue dans son tissu d'origine.

Afin de permettre à une tumeur maligne orthotopique et métastatique d'être suivie, plusieurs chercheurs ont mis au point des modèles de tumeurs "marquées". Des études en vidéomicroscopie ont pu être réalisées en développant des lignées tumorales qui portent une protéine étrangère telle que la protéine de fluorescence verte (GFP) ou rouge (RFP), ou la luciférase de luciole, puis implantées dans les modèles de souris. Ceci permet de suivre par exemple la croissance tumorale, l'invasion des tissus, l'intravasation et l'extravasation des métastases ; les nodules tumoraux internes peuvent également être mesurés (Teicher 2006).

## 2. In vitro 2D 3D (lignées tumorales)

Contrairement aux xéno greffes sur modèles animaux, les modèles d'études *in vitro* permettent de contrôler l'environnement à t0, de réaliser un nombre d'essais beaucoup plus important. Ils sont à l'origine de la majorité des connaissances accumulées en cancérologie.

Il est possible, entre autre, d'étudier séparément les différentes caractéristiques propres aux cellules tumorales (prolifération, adhérence, migration), mais également les différentes étapes de formation de néovaisseaux (néoangiogenèse), processus indispensable au développement de la tumeur.

Notre laboratoire ayant développé un modèle d'étude pour comparer les capacités migratoires de cellules tumorales, nous allons, dans un premier, détailler les différentes techniques 2D et 3D classiquement utilisées pour étudier la migration cellulaire (Figure 41).

Les tests 2D les plus couramment utilisés pour évaluer les capacités migratoires des cellules cancéreuses sont les tests en blessure et les tests en chambre de Boyden (Page et al 2013, Benton et al 2011, Kim 2005).

Les tests en blessure sont simples, peu coûteux et représentent l'une des méthodes développées le plus tôt pour étudier la migration directionnelle *in vitro* (Figure 41). Les cellules sont cultivées sur plastique ou sur coating de molécules matricielles. A confluence, une bande de cellules est éliminée, formant une "blessure". Le test consiste à capturer des images au début et à des temps réguliers montrant la migration des cellules qui recolonisent la blessure. En comparant les images, il est possible de quantifier le taux de migration des cellules normales et tumorales (Rodriguez et al 2005).



Le test en chambre de Boyden (Albini et al 1987) consiste à étudier la migration des cellules en franchissant une membrane perforée, depuis une chambre supérieure vers une chambre inférieure laquelle contient un chimioattractant (Figure 41). La taille des pores doit être choisie en relation à la taille des cellules qui doivent passer au travers (8µm pour les cellules tumorales). Un coating de Matrigel est déposé sur le filtre (coté chambre supérieure). Lorsque la quantité de Matrigel utilisée est inférieure à 50µg, le test n'est pas discriminant entre cellules invasives et cellules contrôles. Au-delà de 50µg, seules les cellules tumorales franchissent le filtre, et ce test discrimine les cellules tumorales selon leur potentiel invasif. L'analyse de l'activité migratoire se fait en comptant les cellules ayant migré sous le filtre (coté chambre inférieure). Cette méthode présente un désavantage; beaucoup de cellules sont déposées à la surface du filtre mais seulement 10% des cellules franchissent le filtre, sélectionnant, dans la population, les cellules ayant les plus fortes capacités migratoires (Entschladen et al 2005, Albini et al 1987).

De façon générale, les tests 2D sont encore largement utilisés pour comprendre les mécanismes moléculaires du processus migratoire et leur régulation.

Les tests 3D sont généralement plus complexes dans leurs dispositifs expérimentaux. Les applications du modèle 3D portent principalement sur l'analyse des trajectoires de migration des cellules en réponse à différents traitements, ou sur la reconstitution d'organisations cellulaires proches de celles observées *in vivo* (acini de glandes exocrines, follicules thyroïdiens, structure capillaires-like, ..).

Le gel est généralement formé à partir de composants matriciels, comme le collagène fibrillaire de type I mimant la matrice conjonctive, le Matrigel mimant la lame basale, la fibrine mimant la matrice du caillot sanguin. D'autres gels existent tels que les hydrogels par exemple.

Lorsque les cellules sont mixées dans le gel, les trajectoires migratoires sont analysées par vidéo-microscopie, combinant les avantages d'une résolution temporelle maximale et de long temps d'observation. Peu de cellules sont analysées au cours de ce test (Entschladen et al 2005).

Les cellules peuvent également être posées sur un réseau 3D. La présence de chimioattractant dans le gel permet d'orienter la migration verticale des cellules (Sakai et al 2011). L'environnement 3D, contrairement à la culture en 2D, favorise le regroupement des cellules en structures polarisées, proches de celles présentes dans l'organisme.

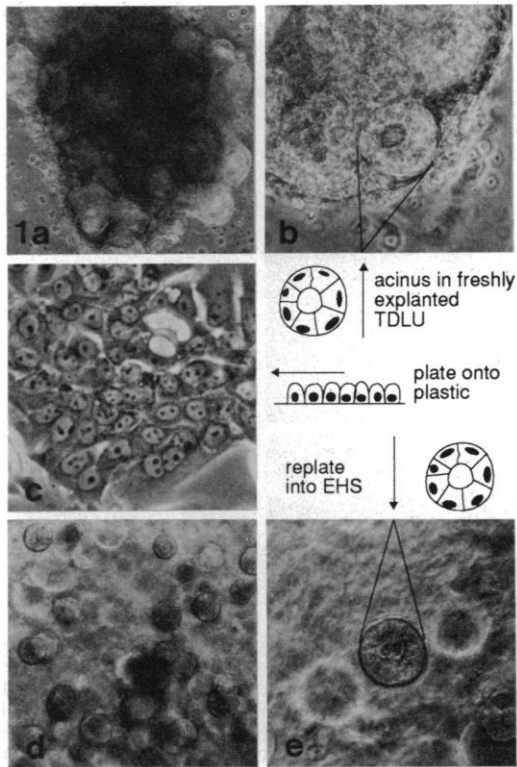


Figure 42 : Images de microscopie en contraste de phase de cellules normales épithéliales : (a) explant d'une unité lobulaire, (b) acinus unique, (c) cellules au second passage en culture monocouche, (d) sphères entièrement développées sur Matrigel, (e) agrandissement d'une des sphères. (a et d x100 ; b, c et e x250) (Petersen et al 1992).

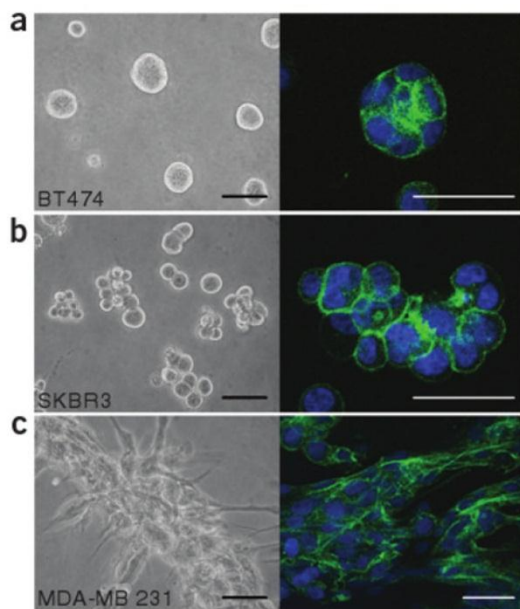


Figure 43 : Des lignées cellulaires de cancer du sein en culture 3D. Images en contraste de phase (à gauche) et sections transversales observées en microscopie confocale (à droite). Marquage de l'actine à la phalloïdine-FITC et des noyaux au DAPI. Observation des BT-474 (a), SK-BR-3 (b) et MDAMB-231 (c) cultivées pendant 4 jours sur gel 3D de Matrigel. En a et b, les colonies ont été complètement extraites du gel pour l'immunocoloration. En c, les colonies ont été immunocolorées dans le gel. Barres d'échelle, 100 um (à gauche) et 50 um (à droite) (Lee et al 2007).

Par exemple, des cellules endothéliales ensemencées sur un réseau 3D, de Matrigel ou de collagène I mixé avec de la laminine, reconstituent des structures capillaires-like (Kubota et al 1988). Les cellules épithéliales mammaires humaines normales, sur réseau 3D de Matrigel, s'organisent en sphères multicellulaires au centre desquelles se trouve le lumen (Figure 42e), reconstituant ainsi leur organisation en acinus (Figure 42b). Cette structure constitue l'unité fonctionnelle des glandes mammaires, responsable de la production de lait. Au contact de cette lame basale reconstituée, elles répondent par une régulation négative de la prolifération, et par une polarisation cellulaire caractérisée par l'expression de kératines 18 et 19 et de sialomucine à la membrane apicale et un dépôt de collagène IV à son pôle basal. Au contraire, les cellules tumorales mammaires (lignées ou biopsies) ne régulent pas la prolifération donc produisent des amas cellulaires bien plus grands, et perdent leur polarisation, probablement en lien avec l'activation d'ErbB2 (Muthuswamy et al 2001, Petersen et al 1992).

L'équipe de Bissel, sur cette base, a développé un test sur gel de Matrigel enrichi en laminine, qui permet de classer plus de 20 lignées en 3 groupes ("grappe-like », stellaire, et ronde) selon leur potentiel invasif, en comparaison avec un modèle de cellules non malignes (HMEC) qui s'organisent en acini (Figure 43).

Les cellules BT474 formant des colonies de forme arrondie visible en microscopie à contraste de phase. Les noyaux sont organisés de façon régulière autour du centre de la colonie (visible en microscopie confocal).

La classe des « grappe-like », qui inclut les SKBR3, montre un ensemble de colonies à faible interaction cellule-cellule. C'est le marquage de l'actine-F qui les différencie le plus distinctement des autres morphologies.

Les cellules, formant des structures de type stellaire, regroupent des lignées invasives telles que les MDA-MB-231. Elles présentent des projections faisant souvent le lien entre plusieurs colonies (Kenny et al 2007).



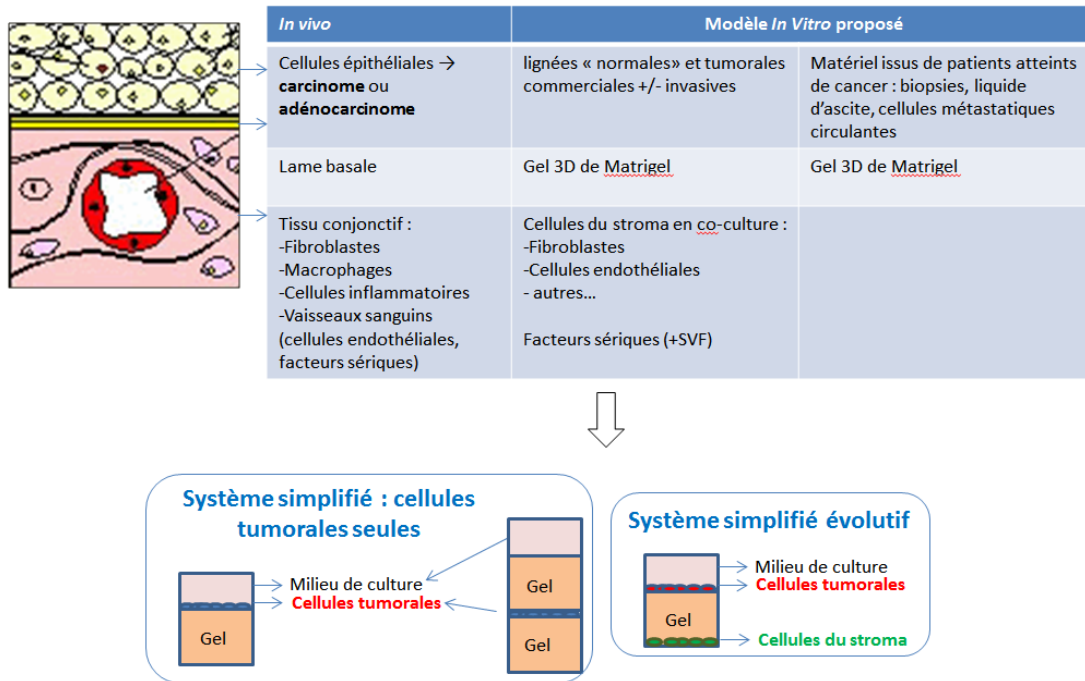


Figure 44 : système modèle d'étude du microenvironnement tumoral *in vitro* développé au LAMBE : un système évolutif.

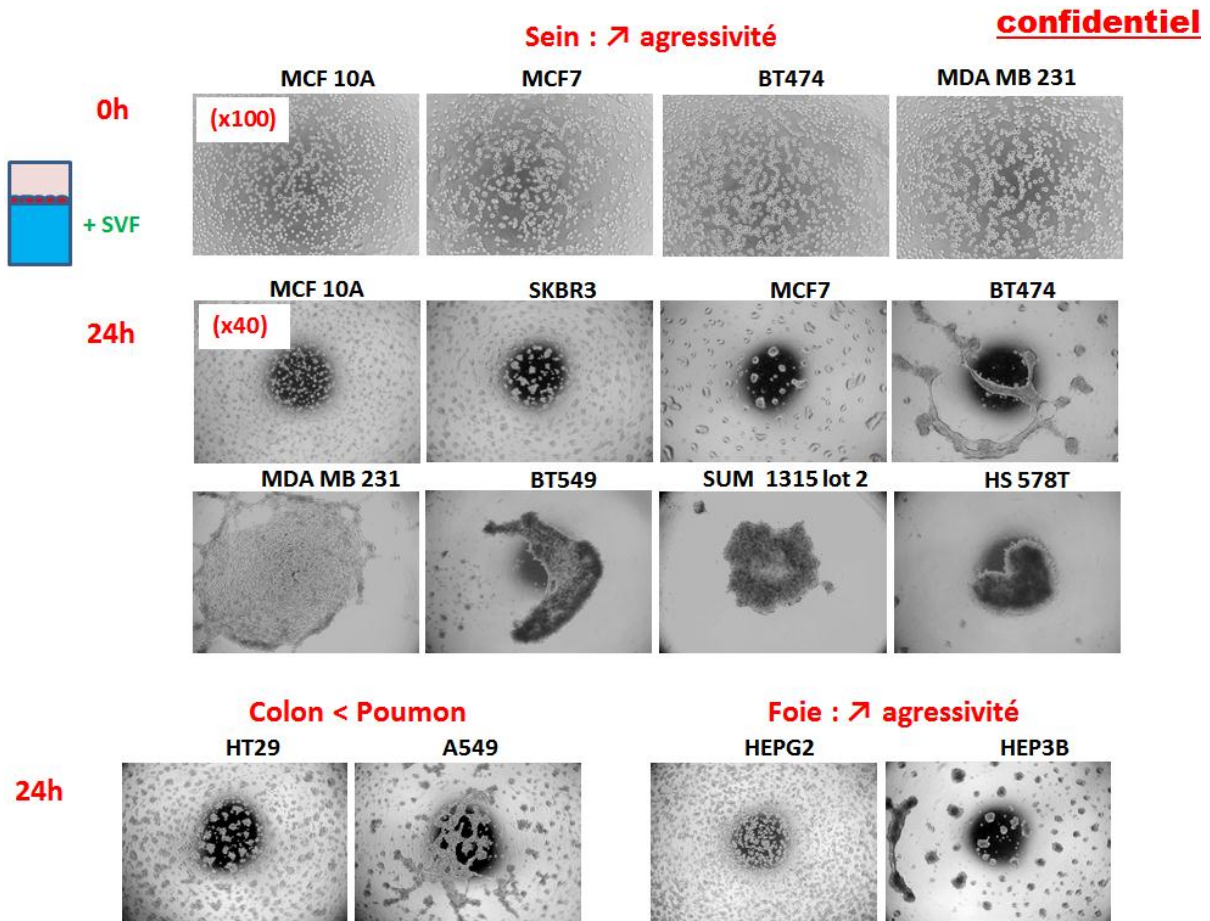


Figure 45 : migration différentielle de lignées tumorales, appartenant à différents types de cancers (sein, colon, poumon, foie), selon leur potentiel invasif sur un gel 3D de Matrigel.

### 3. Modèles d'études développés au laboratoire pour classer les lignées tumorales

Le modèle développé au laboratoire LAMBE (à l'Université de Cergy-Pontoise) (Figure 44) fait actuellement l'objet d'une demande de dépôt de brevet. Il utilise le Matrigel comme support de la migration 3D de lignées cellulaires cancéreuses, lesquelles sont soit posées sur le gel soit emprisonnées entre deux couches de gel en présence ou en absence de facteurs sériques. Ces conditions ont été systématiquement testées sur 22 lignées, appartenant à différents types de carcinomes. La présence de facteurs sériques accélère la migration des cellules, alors que les cellules piégées entre deux couches de gel sont ralenties ; cependant l'ordre de classement des lignées selon leur potentiel invasif est systématiquement respecté. A titre d'exemple, la Figure 45 présente des différences de capacités migratoires de cellules sur gel en présence de facteurs sériques. A t0, les cellules sontensemencées et réparties de façon homogène à la surface du gel (Figure 44, images x100). Après 24h, les cellules se sont regroupées, soit en amas multiples pour les moins invasives, ou, pour les plus invasives, en une plaque unique regroupant toutes les cellulesensemencées. L'augmentation du degré d'invasivité se caractérise par un regroupement plus compact des cellules, que l'on retrouve à la fois pour les amas multiples ou pour l'amas unique. Sur simple observation microscopique, il est donc possible de classer les lignées appartenant à un même type de cancer (8 lignées mammaires de non invasives à très invasives) ou appartenant à des cancers différents (poumon, colon, foie) (Figure 45).

L'observation cinétique et l'effet du nombre de cellulesensemencées sur leur capacité à se regrouper est présenté pour deux type cellulaires : la lignée SKBR3, peu invasive et la lignée BT474, moyennement invasive (Figure 46). Ensemencées à 35000 cellules, les BT474 migrent pour établir des contacts cellules/cellules formant un réseau cellulaire connecté, lequel conduit ensuite à la formation d'amas isolés répartis dans l'ensemble du puits. Les SKBR3, moins invasives, ayant donc une capacité migratoire plus faible, forment des amas plus petits, plus nombreux et moins compacts. En faisant varier le nombre de cellulesensemencées (de 17500 à 70000) sur gel après 48h d'incubation, la taille des amas formés augmente pour les SKBR3 et les BT474, cependant la différence dans leurs capacités à se regrouper est retrouvée à chaque densité cellulaire.

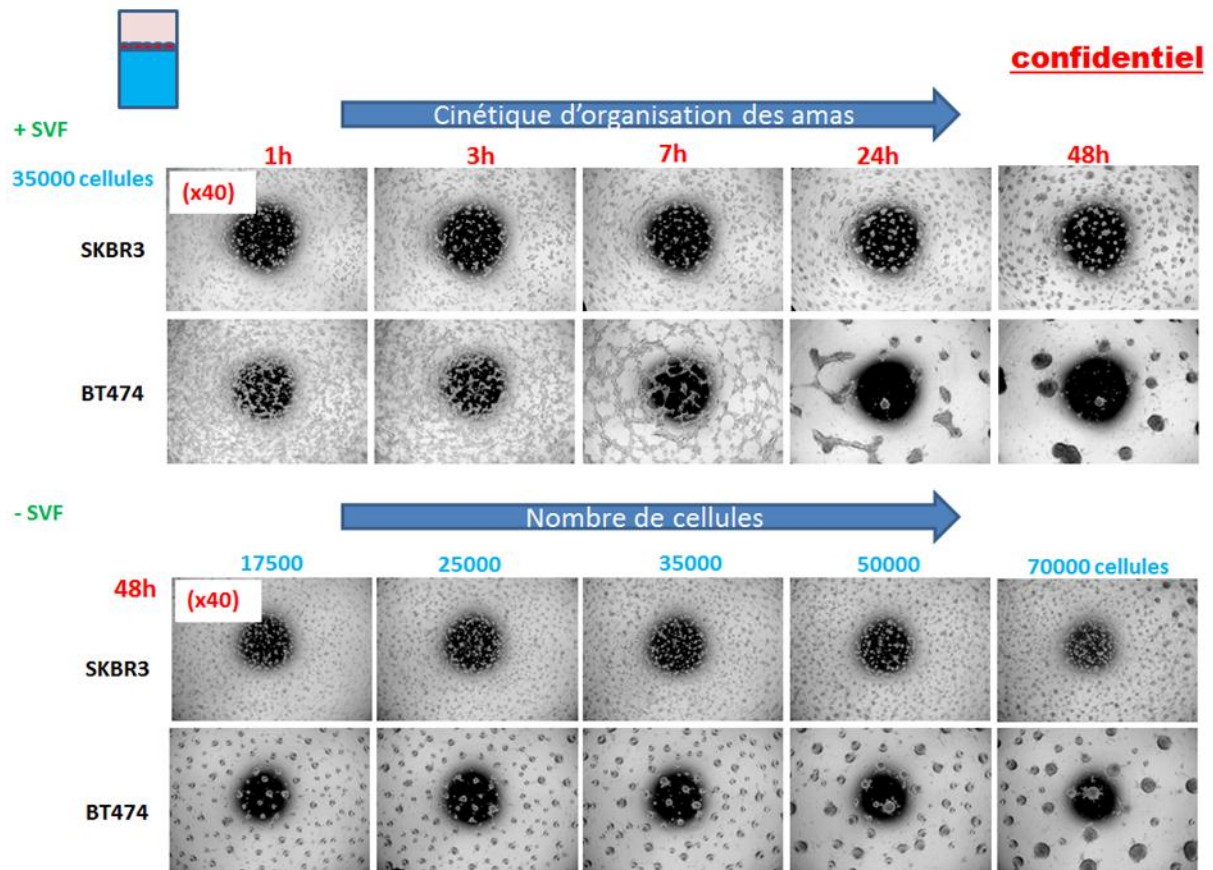


Figure 46 : effet cinétique (1-48h) et effet dose (17500-70000 cellules) sur le regroupement des cellules, cultivées sur un gel 3D.

Ce test présente plusieurs avantages comparé aux chambres de Boyden, classiquement utilisées pour classer des lignées tumorales. Il permet de sonder les capacités migratoires de l'ensemble de la population et d'être plus facile à mettre en œuvre. Des outils d'analyse sont en cours de développement qui devraient permettre d'être également plus résolutifs.

Par ailleurs, l'objectif du laboratoire est d'utiliser ce test comme outil pronostic en clinique à partir de matériel prélevé chez des patients atteints de cancer (biopsies, cellules provenant le liquide d'ascite ou cellules métastatiques circulantes). Or ces échantillons sont caractérisés par la diversité des types cellulaires présents (cas des biopsies) et par l'hétérogénéité de la population cellulaire épithéliale collectée (normales et tumorales plus ou moins invasives). Des lignées de cellules à potentiel invasif variable ont donc été mixées ; il a été montré que 10% seulement de cellules très invasives dans une population non invasive sont détectables par ce test ; les images de regroupement cellulaire obtenues rendent compte de deux paramètres (du degré d'invasivité global de la population et du pourcentage de cellules invasives présentes) (résultats non montrés).

Le système mis en place ici peut évoluer vers un modèle plus complexe, intégrant les cellules du stroma tumoral (Figure 44). Ceci permettra de visualiser les interactions possibles entre les divers types cellulaires par le biais de molécules diffusibles (cellules du stroma vers cellules tumorales, et inversement). L'objectif du laboratoire est, entre autre, d'en faire un outil de recherche pour identifier de nouveaux marqueurs tumoraux.

Dans les modèles en 2D, seules les interactions cellule-substrat gouvernent la migration cellulaire. Cependant, les cellules migrent normalement dans ou sur une matrice extracellulaire 3D de fibres, de protéines d'adhérence et de glycosaminoglycanes et protéoglycanes (Zaman et al 2006). Les propriétés physiques du gel peuvent influencer le comportement cellulaire tant sur des modulations internes à la cellule migrante (telle que la réorganisation du cytosquelette) que dans la libération de protéases favorisant (la réorganisation de leur environnement plus propice à la migration cellulaire). En plus de l'adhérence et des forces qui permettent à la cellule de se tracter, la rigidité de la matrice est un facteur clé qui influe sur le mouvement de la cellule dans un réseau 3D. La motilité à travers un environnement extracellulaire 3D, dont la taille des pores est beaucoup plus petite que les dimensions cellulaires, ne dépend que de l'activité de protéases à large spectre telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs) (Zaman et al 2006).

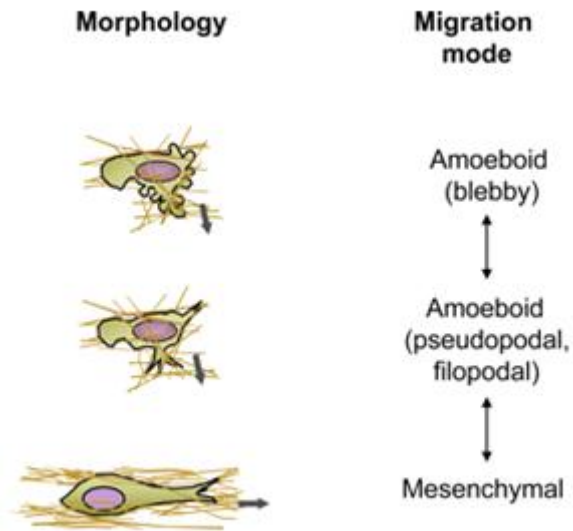


Figure 47 : Morphologie cellulaire, modes de migration et transitions possibles. Chaque mode de migration nécessite un ensemble de mécanismes moléculaires dont la régulation peut changer le mode de migration. Les altérations du mode de migration les plus étudiées sont les transitions mésenchymal-ameboïde. La flèche grise indique la direction de la migration (Friedl et Wolf 2010).

## **Chapitre III : Biophysique de la migration cellulaire.**

L'environnement 3D avec lequel les cellules interagissent, et qui implique majoritairement des intégrines, a conduit les chercheurs à s'intéresser au concept de mécanotransduction. Cela inclut les forces mécaniques exercées par les cellules sur la MEC, et inversement celles que la MEC exerce sur les cellules. Ces forces mécaniques interviennent dans de nombreux processus biologiques incluant la morphogénèse, la réparation tissulaire et la formation de métastases cancéreuses (Miron-Mendoza et al 2013). La migration cellulaire implique la déformation de la cellule, ainsi qu'une déformation du tissu environnant, puisque l'espace occupé par les cellules au cours de la migration change. Les propriétés mécaniques initiales des cellules et du tissu vont donc être changées. Ainsi, les forces motrices de la cellule et les forces de résistance du tissu, dépendront des propriétés mécaniques initiales des cellules migrantes et du tissu (Lange et Fabry 2013).

### **I. Mouvements cellulaires**

Afin d'étudier la migration des cellules, en particulier cancéreuses, il est nécessaire de faire la distinction entre deux types de mouvements cellulaires possibles : le mouvement améboïde, se produisant par alternance de contraction/décontraction cytosolique liée à la transition solution-gel de l'actine, et le mouvement lié à la contraction ATP-dépendante de l'actine organisée en fibres de tension.

#### **1. Mouvement améboïde**

Le mouvement améboïde est un mouvement passif, indépendant de la sécrétion de protéases matricielles et le plus couramment utilisé par les cellules en migration dans un contexte physiologique. Cette migration se réfère aux cellules rondes ou ellipsoïdales ; elle est caractérisée par l'absence de fibres de tension et d'adhésions focales matures. Il existe deux sous-types de mouvements améboïdes (Figure 47).

Le premier est celui des cellules rondes, dont la membrane forme des bulles ("bleb") ; elles ne sont pas adhérentes et utilisent la propulsion comme mode de migration. Cela concerne principalement les leucocytes circulants, recrutés lors de la réponse inflammatoire, ou le mouvement des amibes, un protiste eucaryote unicellulaire (Figure 47).

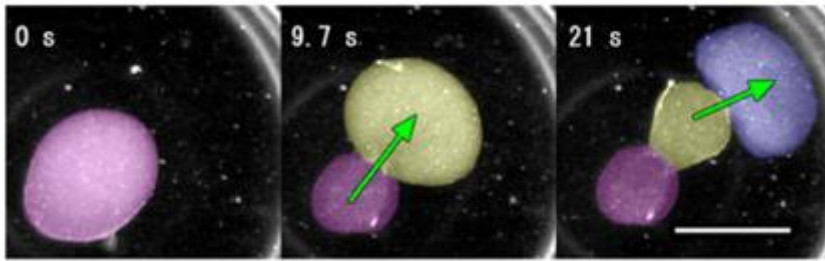


Figure 48 : Reconstitution de la locomotion amiboïde « bleb-driven » (système IVA= *in vitro* Amoeba system) à l'aide d'extrait cytosolique et de fraction actomyosine provenant de *amoeba proteus* (amibe polymorphe pouvant générer de larges pseudopodes pour le mouvement). L'actomyosine (pseudo-colorée en violet) est injectée dans l'extrait cytosolique (région claire) à  $t=0$ . L'actomyosine montre un mouvement ressemblant à la locomotion « bleb-driven » dès les premières secondes. L'injection d'actomyosine dans l'extrait cytosolique forme une sphère bombée qui s'épanche dans une direction et génère un mouvement de locomotion par répétition séquentielle des épanchements et contraction (Nishigami et al 2013).

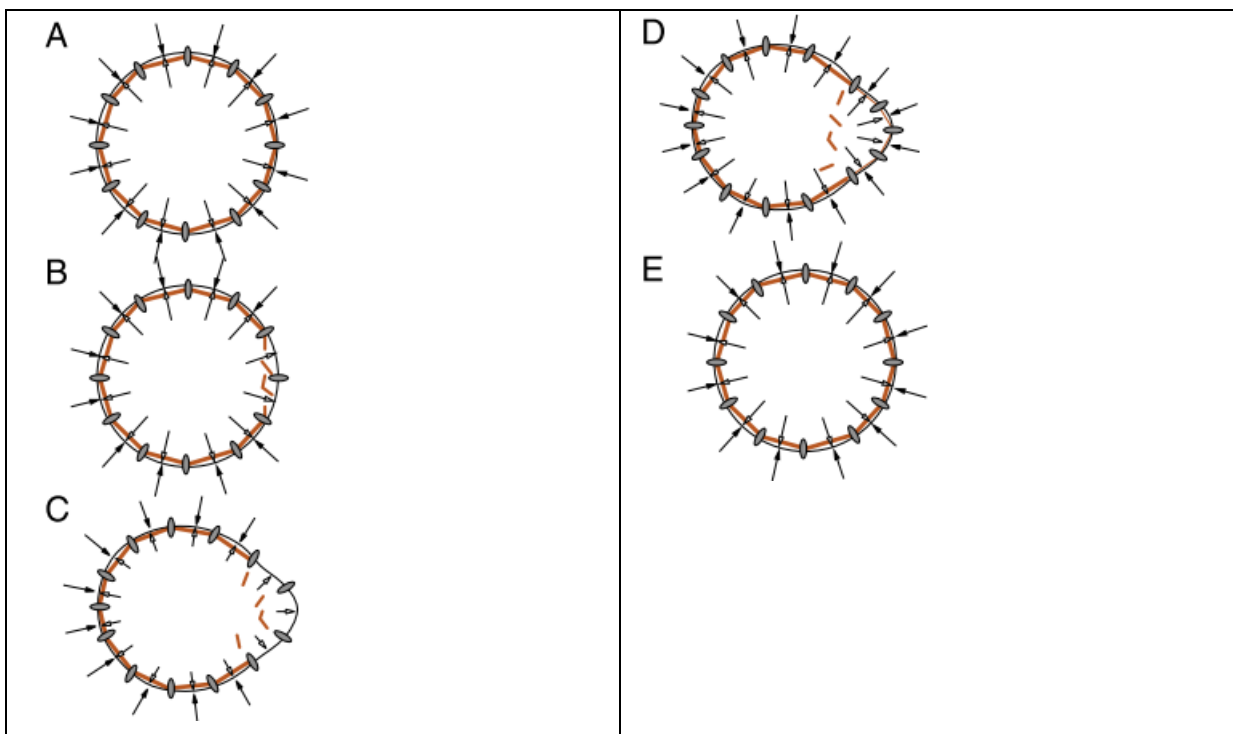


Figure 48': Modèle proposé pour la migration selon le mode "bulle et filopode/lamellipode" (Yoshida et Soldati 2006).



Une reconstitution de la locomotion améboïde « bleb-driven » a été réalisée à l'aide d'extrait cytosolique et de fraction actomyosine provenant de *amoeba proteus* (Figure 48). Un modèle a été proposé pour expliquer ce type de locomotion (Yoshida et Soldati, 2006). Initialement, la pression cytoplasmique s'équilibre avec la tension de surface (Figure 48'A). Un déséquilibre de ces forces entraîne une dissociation localisée du cortex d'actomyosine, précisément dans l'axe de migration de la cellule (Figure 48'B), puis un détachement de la membrane qui résulte d'une dissipation de la tension membranaire, et la formation d'une bulle due au gradient de pression intracellulaire (Figure 48'C et D). Ensuite, une nouvelle couche d'actine corticale est reformée et l'équilibre des forces est restauré (Figure 48'E). Ce type de migration nécessite une alternance de phases solution/gel de l'actine, régulée dans l'espace et le temps par la liaison des ions calcium. La microscopie a révélé la présence d'une couche liquide comprise dans une couche gel. Durant le mouvement, la couche liquide s'écoule dans la direction du mouvement et la couche gel reste fixe (Nishigami et al 2013, Friedl et Wolf 2010).

Le second, peu décrit, concerne les cellules de forme élipsoïdale générant des filopodes, riches en actine, engagés dans de faibles interactions avec la MEC (Figure 47). Il concerne tout particulièrement les cellules dendritiques, qui font partie des cellules du système immunitaire. Ces cellules sont peu adhésives car elles ne possèdent aucune structure d'adhésion focale. Il s'agit du mouvement améboïde pseudopodal. Ce mouvement est environ 10 fois plus rapide que le précédent. Les cellules adoptent un mode de déplacement qui nécessite la formation de pseudopodes, des structures temporaires d'actine. Ce type de déplacement nécessite une activation par la voie Rac pour les protrusions antérieures qui est contrebalancée par la voie Rho/ROCK dans les autres parties cellulaires (Friedl et Wolf 2010, Yoshida et Soldati 2006).

## 2. Mouvement mésenchymateux.

Lorsqu'une cellule est attachée à la MEC, des forces contractiles, impliquant l'actine et la myosine, sont générées, induisant une tension interne, nommée pré-stress cytosquelettique. Ce pré-stress ne peut pas être mesuré mais il est déduit des forces de tension exercées au niveau de l'environnement par la cellule. Le pré-stress du cytosquelette augmente la rigidité cellulaire avec une relation linéaire (Lange et Fabry 2013).



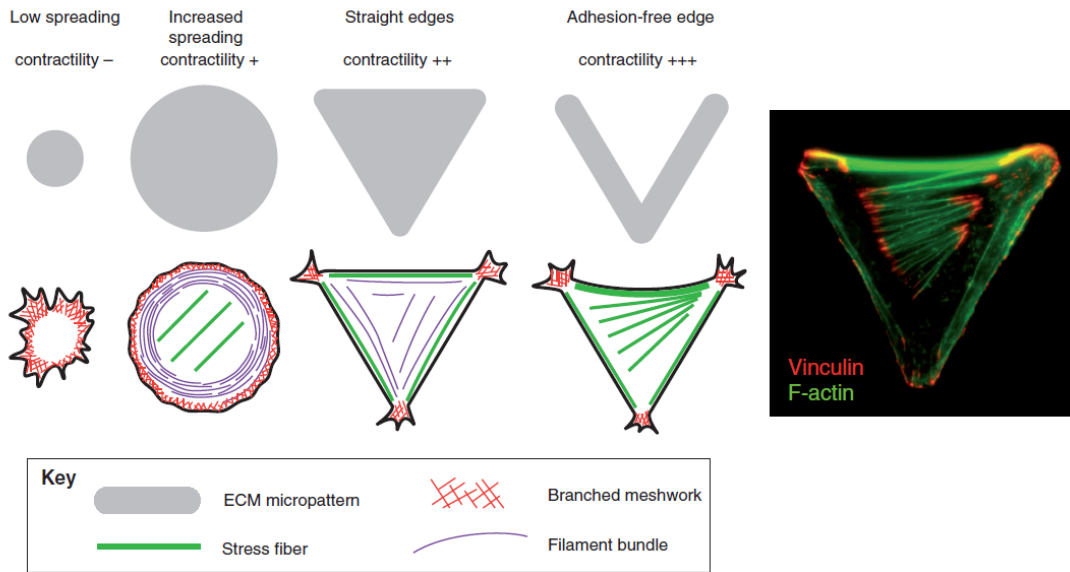


Figure 49 : Effet du motif d'adhésion cellulaire sur la forme, l'architecture et la contractilité cellulaire (Théry 2010).

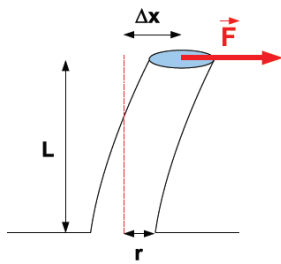


Figure 50 : Représentation schématique d'un plot d'un micromotif infléchi ou déviés pas une force  $\vec{F}$  (d'après la thèse de Ghibaudo M).

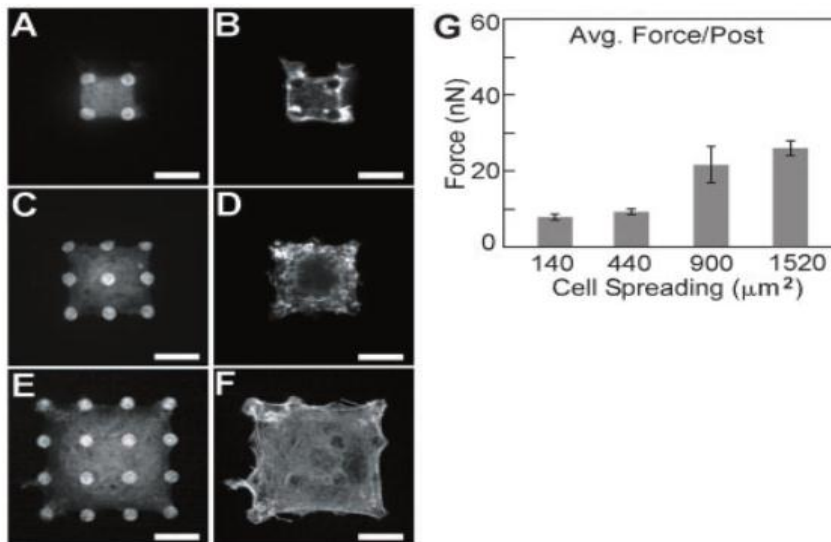


Figure 51 : Microscopie confocale de cellules de muscle lisse attachées à un nombre variable de plots. A et B : 2x2 plots, C et D : 3x3 plots, E et F : 4x4 plots. A, C et E montrent le marquage de la fibronectine, B, D et F le marquage des microfilaments d'actine. (Barre d'échelle = 10 $\mu\text{m}$ ). Les filaments d'actine, organisés en fibres de tension se situent majoritairement en périphérie de la cellule (Tan et al 2003).

Les mécanismes de mouvements cellulaires actifs, impliquant une alternance entre adhérence/non adhérence cellulaire au substrat, entraînent une réorganisation des fibres de tension. Les cellules migrantes, en adhérant temporairement à la MEC, génèrent des forces de tension internes, qui s'opposent à la déformation des cellules, nécessaires à leur migration. En effet, pour migrer à travers un tissu, la cellule doit dégrader la MEC pour se faire un chemin, puis s'étirer en avant, adhérer à la matrice, puis se contracter. Dans le même temps, les forces contractiles ont augmenté la pré-tension initiale et la rigidité cellulaire, entravant sa déformation et le mouvement (Lange et Fabry 2013). L'assemblage du complexe filaments d'actine / myosine, suivi de l'hydrolyse de l'ATP, conduit à la contraction cellulaire. Les forces de contraction résultantes induisent la réorganisation morphologique et le remodelage de la matrice extra-cellulaire facilitant le mouvement cellulaire (Olson et sahai 2009).

La famille des fibres de tension se compose de 4 types de structures observées *in vitro* en culture 2D : les fibres de tension dorsales et ventrales, les arcs transverses et les « chapeaux » périnucléaires. Elles diffèrent selon leur attachement aux adhésions focales et par leur contenu en myosine (Elson et Genin 2013). Lorsque les cellules adhèrent à des micropatrons de protéines matricielles, elles organisent de longues fibres de tension liées aux adhésions focales attachées à la surface adhésive. Selon la forme géométrique et la taille des micropatrons, les formes cellulaires changent ainsi que l'organisation de l'actine. Les cellules forment préférentiellement des embranchements d'actine ramifiés lorsqu'elles sont confinées dans un petit motif fin (Figure 49A). Avec l'étalement cellulaire, il se forme des faisceaux d'actine circonférentiels présents à l'intérieur de la cellule, ainsi que des fibres de tension au centre de celle-ci (Figure 49B). Les bords droits facilitent l'assemblage des fibres de tension (Figure 49C), qui deviennent plus prononcées au-dessus des bords non adhésifs (ou concaves) (Figure 49D), par exemple le long de l'arête qui relie les deux extrémités de la forme en V, où la cellule est fortement contractée (Figure 49E) (Théry 2010).

Des études ont également été réalisées sur des microplots recouverts par des substrats matriciels (prepolymer of polydimethylsiloxane) (PDMS) recouvert de fibronectine), qui permettent en plus d'accéder aux forces de tension exercées par les cellules sur ces structures. Des cellules ont étéensemencées sur un nombre variable de microplots allant de 2x2 à 5x5, induisant un étalement cellulaire allant respectivement de 140 à 1520  $\mu\text{m}$  (Figure 51A, C, E). Ce dispositif a permis de mesurer les forces exercées par la cellule pour fléchir les plots (Figure 50) L'augmentation de l'étalement cellulaire, fonction du nombre de plots, induit une

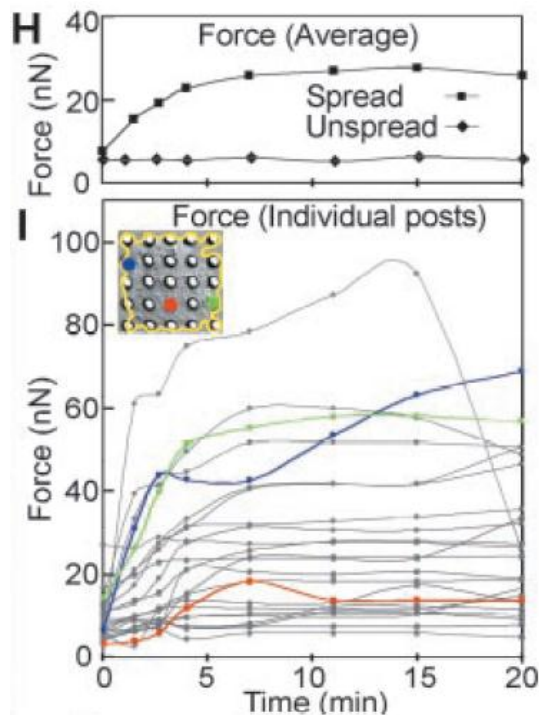


Figure 52 : Les cellules ont été privées de sérum pendant 12h et traitées à  $t_0$  (temps de début des mesures) avec du LPA, qui stimule la contraction actine/myosine. H : Ensemble des forces moyennes générées par plot en fonction du temps de culture pour des cellules étalées (spread) sur 5x5 plots ou non étalées (unspread) sur 3x3 plots. La cellule étalée exerce une force plus importante sur ces derniers. I : Représentation des forces exercées sur chacun des 25 plots sur lesquels est étalée une cellule. Les forces exercées par la cellule sont plus importantes en périphérie de celle-ci, là où se trouvent les fibres de tension (Tan et al 2003).

augmentation de la formation de fibres de tension (Figure 51B, D, F) et de la force générée par le cyrosquelette (Figure 51G).

Lorsque les cellules sont privées de sérum, seules les cellules étalées répondent au traitement par le LPA (lysophosphatidic acid.), qui stimule la contraction actine/myosine. Ce traitement permet d'observer la formation de fibres de tension et un niveau de contractilité cellulaire équivalent à celui obtenu lorsque les cellules sont cultivées avec sérum (Figure 52H). Les forces exercées sur les plots en périphérie de la cellule sont plus importantes (Figure 52I) (Tan et al 2003).

Une récente revue aborde la migration cellulaire du point de vue biophysique en lien avec les forces de traction exercées par les cellules en mouvement, les forces d'adhésion entre les cellules et l'environnement matriciel, la rigidité des cellules, et des matrices extracellulaires (Lange et Fabry 2013).

Les cellules perçoivent les propriétés mécaniques, via majoritairement les intégrines et y répondent en modifiant leur comportement cellulaire. Par exemple, à une rigidité accrue du support d'adhésion, les cellules s'étalent et adhèrent d'avantage, et se contractent de façon plus efficace, mais se déplacent plus lentement, du fait d'un plus grand nombre d'adhésions cellule-matrice par cellule.

Les cellules s'étalent selon un processus de « mouillage » ; les cellules isolées ou en amas agissent comme des gouttes de liquide avec une tension de surface et une adhérence. La tension de surface provient de la tension corticale du complexe actine-myosine et, dans le cas des agrégats cellulaires, des jonctions cellule-cellule. Les forces liées à l'actomyosine sont les plus fortes pour des déplacements de faible vitesse. Un substrat « mou » répondra rapidement par une grande déformation à une force élevée. Dans ces conditions, la cellule est incapable de maintenir une force importante et s'étale moins.

L'étalement, dépendant donc de la rigidité du support d'adhérence, explique partiellement les raisons pour lesquelles les cellules migrent naturellement selon un gradient de rigidité vers les régions les plus dures du substrat (durotaxie). Chaque formation ou dissociation d'adhésion cellule-MEC perturbe l'équilibre des forces de traction poussant la cellule à bouger jusqu'à ce que toutes les adhésions cellule-matrice disparaissent. Si ce processus apparaît au hasard dans l'espace, alors la cellule subit une migration diffusive avec une vitesse inversement proportionnelle au nombre de sites engagés dans des interactions cellule-matrice.



Par exemple, un substrat plus rigide avec un étalement cellulaire plus important, donc avec plus de zones de liaisons cellule-matrice par cellule devrait résulter en une migration ralentie. Les cellules montrent souvent une plus grande polarité et anisotropie en s'étalant sur des substrats plus rigides et la migration n'est pas un processus au hasard. La cellule utilise des lamellipodes pour établir de nouvelles adhésions aux extrémités d'orientation à l'aide d'adhésions focales et de protéines transmembranaires comme les intégrines. Le mouvement des lamellipodes est permis par la polymérisation de l'actine et les forces de traction des complexes actine-myosine. (Lange et Fabry 2013)

Lors de la migration des cellules cancéreuses, il y a dégradation d'une partie au moins de la MEC. Avec le développement de la tumeur, les cellules cancéreuses induisent des changements dans le microenvironnement péri-tumoral poussant les fibroblastes à déposer de grandes quantités de collagène fibrillaire. La lysyl-oxydase et les transglutaminases tissulaires, formant des liaisons entre les fibres de collagène, sont surexprimées, augmentant la tension générée sur la MEC. En réaction, le collagène fibrillaire est groupé et aligné perpendiculairement au front tumoral. Cet alignement dirige l'invasion des cellules cancéreuses. Des études récentes ont montré que les cellules cancéreuses utilisent la protéolyse pour réarranger mécaniquement la MEC environnante et former des micropistes en forme de tube que les autres cellules peuvent utiliser sans utiliser de protéases (Kraning-Rush et al 2013).

## **II. Contraintes mécaniques et réponse tumorale**

La tumeur subit un stress provenant du microenvironnement et généré par sa croissance. Les fluides interstitiels et les composants non-fluidiques du microenvironnement tumoral exercent une tension sur la tumeur. Lorsque les tumeurs sont excisées, elles maintiennent une tension accumulée dans la tumeur, qui sera ensuite relâchée lorsque le tissu excisé subit une autre coupure. Afin d'évaluer cette tension dans les tissus cancéreux, des tumeurs murines induites, ainsi que des tumeurs humaines, ont été excisées puis sectionnées permettant leur relaxation. Les déformations observées ont confirmé que la tension interne due à la croissance de la tumeur est compressive et qu'elle est contrebalancée par une force de tension à la périphérie. La tension interne augmente avec la croissance de la tumeur mais est indépendante de la densité tumorale. Les tissus sains ne subissent pas cette forme de relaxation suite à l'excision.



Une partie de la tension de croissance est stockée par la MEC environnant la tumeur (Stylianopoulos et al 2012).

Les contraintes mécaniques sur l'environnement, liées à la croissance de la tumeur, peuvent en effet modifier le comportement des cellules prédisposées à devenir cancéreuses. Par exemple, l'activation de la  $\beta$ -caténine, un élément clé de la voie de mécanotranscription, a été montrée dans le cas d'une pression appliquée de 1kPa sur des excisions de colon de souris prédisposées à avoir un cancer (déficientes pour APC, anaphase promoting complex), tandis qu'une pression équivalente appliquée sur des explants de colon normal n'active pas cette voie. Or une activation inappropriée de la  $\beta$ -caténine sur des cellules de colon déficientes en APC pourrait être la cause principale du développement de cancer de colon (Whitehead et al 2008).

De plus, les fibroblastes du stroma augmentent leur production de collagène, ce qui induit la rigidification de la MEC, et conduit à exercer une contrainte externe sur le tissu tumoral. La compression qu'exerce le microenvironnement sur la tumeur influence sa croissance. En effet, lorsque des sphéroïdes de carcinome du colon sont placés dans des gels d'agarose, l'augmentation de la concentration en agarose, donc de la rigidité de l'environnement, minimise la croissance en taille de la tumeur. La prolifération cellulaire est ralentie et les cellules plus rapprochées. Tous les sphéroïdes (indépendamment de la forme) exercent une pression de 4kPa sur leur environnement peu importe la concentration en agarose. Cette inhibition de la croissance peut être inversée en relâchant la pression exercée par l'environnement sur le sphéroïde. Cette pression, subie par le sphéroïde sur des temps longs, augmente également l'apoptose (Cheng et al 2009). La tension mécanique exercée par le microenvironnement peut être à l'origine de la perte des vaisseaux sanguins et lymphatiques au cœur de la tumeur. Cependant cette tension peut permettre la formation de sphéroïdes dans le cas de cellules qui n'en forment pas naturellement (Koike et al 2002).

L'application d'un stress de 10kPa sur des sphéroïdes lors d'une croissance à long terme est suffisante pour réduire considérablement leur croissance par inhibition de la prolifération au cœur de la tumeur (Montel et al 2011).

L'utilisation de sphéroïdes permet d'étudier la réponse tumorale à des « stress » mécaniques à l'échelle de la tumeur. Afin d'étudier la réponse d'une cellule unique à la déformation ou de déterminer son élasticité, des études ont, entre autres, été réalisées en microscopie à force atomique (AFM). Ainsi il est possible de comparer l'élasticité (module de Young) de cellules





saines et cancéreuses. Les cellules cancéreuses de vessie sont plus déformables que les cellules saines, et cette augmentation de l'élasticité est corrélée à une désorganisation de leur cytosquelette (Suresh 2007). La progression cancéreuse, caractérisée par une rigidification de la matrice extracellulaire, s'accompagne également d'une augmentation de l'élasticité des cellules tumorales. De même, la mesure par AFM du module de Young sur des biopsies de cancer du sein humain révèle une signature propre à chaque stade du cancer (Plodinec et al 2012). En comparant un tissu sain et un tissu cancéreux issu d'une tumeur bénigne, la distribution du module de Young (représentatif de l'élasticité) se situe entre 1,9kPa et 3,7kPa pour la tumeur bénigne et entre 1,1kPa et 1,8kPa pour le tissu sain. Les tissus provenant de tumeurs pré-métastatiques plus invasives montrent un pic dominant entre 0,3 et 0,8kPa. Pour métastaser la cellule doit avoir un certain degré de flexibilité et de déformabilité lui permettant de se mouvoir dans son environnement, son module de Young est donc plus faible que celui des cellules saines (Plodinec et al 2012, Lekka 2012).

Cette technique peut également être utilisée pour observer des changements de morphologie cellulaire suite à l'utilisation d'agents potentiellement thérapeutiques. En effet, dans une étude récente, une nouvelle molécule (alterporriol L) isolée à partir d'un champignon marin a été utilisée sur des cellules MCF-7 (lignée de cellules cancéreuses mammaires). Les cellules non traitées ont une forme ovoïde avec une surface lisse et des pseudopodes connectant les cellules les unes aux autres. Lorsque les cellules sont traitées à l'aide de l'alterporriol L, elles sont rondes, le nombre de pseudopodes connectant les cellules diminue fortement, des corps apoptotiques apparaissent. Les cellules traitées présentent toutes les caractéristiques de cellules en apoptose ou en nécrose avec une disparition de réseau d'actine-F (Huang et al 2012).



### **III. Dégradation enzymatique de gels de protéine.**

Une approche minimaliste pour étudier la liquéfaction des matrices par des protéases, à l'origine de l'invasion cellulaire, est de suivre la dégradation enzymatique de gels de protéine. Ce modèle simplifié permet de s'affranchir de la complexité cellulaire et de tenter de dégager les mécanismes physiques à l'origine de cette protéolyse.

Nous allons brièvement introduire la gélification ou transition sol-gel (Adam et Lairez 1996, Djabourov et al 2013) et définir principalement les termes qui nous seront utiles pour présenter l'état de l'art sur la dégradation enzymatique de gels de protéines.

La transition sol-gel ou gélification signifie qu'une molécule infinie, gel, apparaît à partir d'une population de molécules solubles et dissociées. Le gel est donc un réseau macromoléculaire. Lors de la gélification, les molécules s'associent par connections aléatoires avec au moins trois de leurs voisines. La gélification est donc une transition critique de connectivité entre un système soluble et un système hétérogène composé du gel et du milieu liquide. Les propriétés physiques du milieu changent durant la gélification. En particulier, près du seuil de gélification ( $p_c$ ), des grandeurs physiques mesurables, comme la fraction gel ( $X_{gel}$ ), ou l'élasticité ( $G$ ), ont un comportement en loi de puissance lorsqu'elles sont exprimées en fonction de l'écart au seuil de gélification,  $\varepsilon$  ( $\varepsilon = |p - p_c|/p_c$ ), avec  $p$  qui représente le degré de connectivité ou la fraction de liens réalisés. Chaque loi de puissance introduit un exposant différent associé à la grandeur macroscopique. La détermination des valeurs numériques de ces exposants, trois au moins, permet de caractériser la classe d'universalité associée au processus de gélification.

La première approche théorique de cette transition de phase a été mise en place par Flory et Stockmayer dans les années 50. Dans le cas de ce modèle particulier, trois exposants critiques ont été déterminés, chacun d'entre eux appréhendant une variation de quantité particulière près du seuil. Cette théorie suppose que tous les amas libres du système sont équiréactifs. Les exposants sont tous liés par des lois d'échelle dues à l'autosimilarité des amas. Le processus de connexion des monomères conduit à une polymérisation branchée ou en arbre. Cette théorie ne prend en compte ni les encombrements stériques, ni le volume exclu. Dans ce modèle, chaque molécule est un point immatériel infiniment mobile pouvant être à tous les endroits en même temps. Il s'agit d'une approche de champ moyen. La probabilité qu'une réaction d'embranchement ait lieu est proportionnelle à la concentration en réactif. Ainsi,



l'environnement local d'un monomère est remplacé par une concentration moyenne sur l'ensemble du milieu. Ce modèle ne permet pas de caractériser correctement le comportement critique des grandeurs près du seuil de gélification (Flory 1941, Adam et Lairez 1996, Djabourov et al 2013).

La percolation permet de tenir compte des effets de volume exclu. La transition sol-gel est considérée comme une transition de connectivité. En considérant un système de chaîne idéale dans un maillage vide à  $d$  dimension avec un nombre de sites occupés au hasard  $p$  et non-occupés  $1-p$ . Pour un  $p$  donné, un amas est un groupe de sites voisins occupés. Le seuil de percolation est le nombre de sites occupés  $p_c$  pour qu'un amas devienne infini (d'un bord à l'autre du système). La percolation de lien, dans le cas de la gélification, consiste en une augmentation de la quantité de connexions existant entre amas qui résulte en un changement de la solution en gel. Tous les sites du maillage sont alors occupés. Le pourcentage de lien ( $p$ ) est alors défini comme  $p_c$  lorsque le nombre de liens est suffisamment important pour générer l'amas de taille infini (De Gennes 1976, Stauffer 1979). Dans l'analogie percolation/gélation, l'amas de percolation correspond aux polymères branchés et la probabilité  $p$ , correspondant au degré de connectivité entre les polymères, est le ratio entre site avec lien chimique et nombre de liens possibles. Lorsque l'amas augmente en taille, le système passe d'un liquide de plus en plus visqueux à un solide viscoélastique avec l'apparition de l'amas infini. En d'autres termes, au seuil de percolation, la viscosité du système ( $\eta_s$ ) devient infinie, lui conférant une élasticité ( $G_s$ ) permanente. En dessous du seuil de gélification  $\eta_s = \eta_0 \varepsilon^{-s}$ , où  $\varepsilon$  est l'écart au seuil critique. Au-dessus du seuil de gélification,  $G_s = G_0 \varepsilon^f$ .

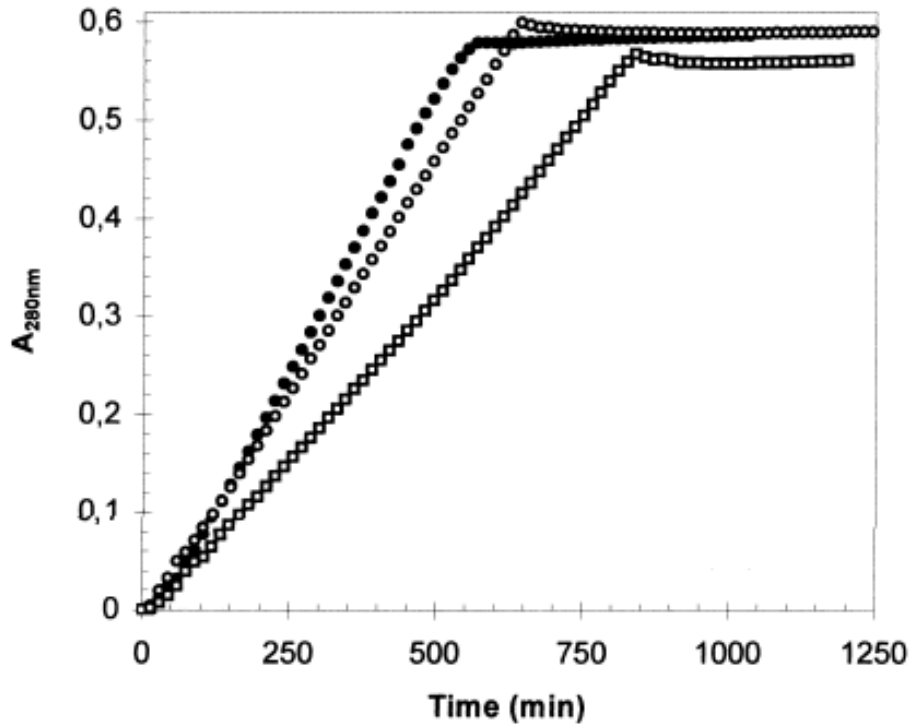
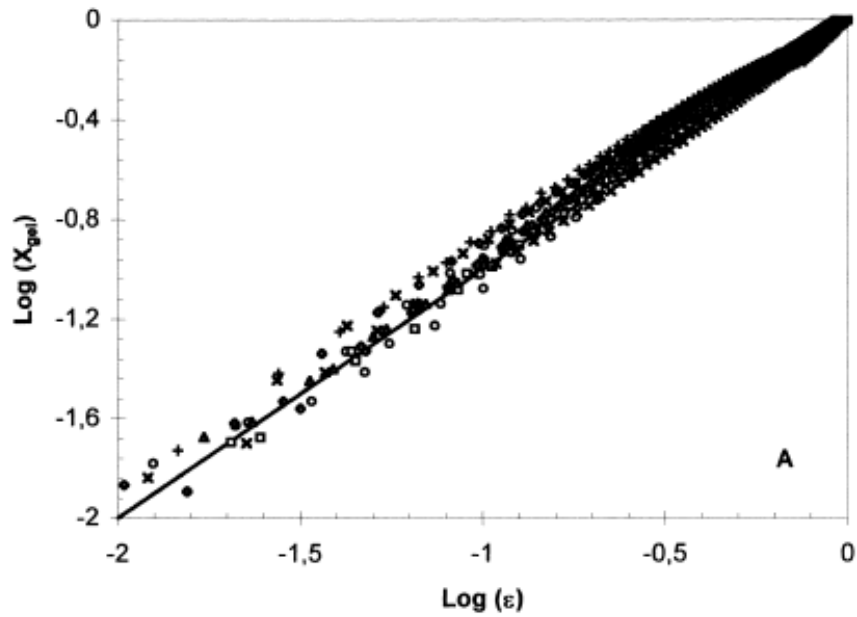


Figure 53 : Cinétique de dégradation de gels de fibronectine par (  $\square$  ) 0.113, (  $\circ$  ) 0.560 et (  $\bullet$  ) 0.968  $\mu\text{M}$  de thermolysine.



0.968 (  $\circ$  ), 0.560 (  $\square$  ), 0.325 (  $\diamond$  ), 0.202 (  $\triangle$  ), 0.056 (  $\times$  )  
0.027 (  $+$  )  $\mu\text{M}$  thermolysin.

Figure 54 : Dépendance de  $X_{\text{gel}}$  en fonction de  $\epsilon$  (l'écart au seuil de transition de phase gel-sol) pour la dégradation d'un gel de fibronectine par diverses concentrations en thermolysine.

Les mécanismes cellulaires favorisant la migration ont été largement étudiés, bien que de nombreux aspects soient à explorer et à comprendre (Sahai 2005) comme la mécanique d'invasion à l'échelle de la tumeur entière, la caractérisation exacte des groupes de protéases majoritairement impliqués dans le processus métastatique, les effets de la présence de pressions exercées par les cellules tumorales sur les cellules saines environnantes. Afin de permettre aux cellules tumorales de quitter son organe d'origine, de migrer, de traverser les parois des vaisseaux sanguins et pénétrer de nouveaux tissus, il est nécessaire de perméabiliser les MEC à plusieurs reprises. Pour cela, il a été montré qu'elles augmentent leurs sécrétions d'une large gamme de protéases, tout spécialement les MMPs. Le mécanisme physique de la solubilisation des matrices protéiques par des protéases a été peu étudié à la fois du point de vue de la transition de phase, gel vers solution, que de la cinétique enzymatique. A notre connaissance, la première étude sur la dégradation de gels de protéines par des protéases solubles a été réalisée en 2000 (Berry et al, 2000). Le but était de tenter de savoir si cette dégradation enzymatique était analogue à un processus de gélification. La dégradation de gels de fibronectine et de matrice reconstituée (Matrigel), par trois protéases, la thermolysine, la trypsine, et la protéinase K a été suivie par spectrophotométrie à 280 nm en mesurant l'apparition de produits solubles au cours du temps pour différentes concentrations en enzymes.

Ces expériences montrent une augmentation linéaire de l'absorbance au cours du temps, suivie d'une rupture de pente avec l'apparition d'un plateau où l'absorbance devient constante (Figure 53). Cette rupture de pente est fonction de la concentration en enzyme.

Ce comportement observé est différent d'une cinétique classique de la dégradation d'un substrat en solution par une enzyme. En effet, elle est normalement caractérisée par une longue phase post-stationnaire, absente ici. La cinétique obtenue, à partir d'un gel, traduit la libération progressive de produits de dégradation protéique dans la phase liquide jusqu'à la solubilisation complète du gel. Le brusque changement de pente correspond au temps de passage de la phase gel à la phase liquide. Ce temps diminue quand la concentration en enzyme augmente.

Dans les conditions expérimentales, le nombre de liaisons peptidiques coupées par les protéases est constant au cours du temps.

Il est obtenu que la fraction gel ( $X_{gel} = 1 - X_{sol}$ ) décroît linéairement en fonction du temps. Dans les différentes conditions expérimentales,  $X_{gel}$  varie comme  $\varepsilon^\beta$  avec  $\beta=1$ . (Figure 54)



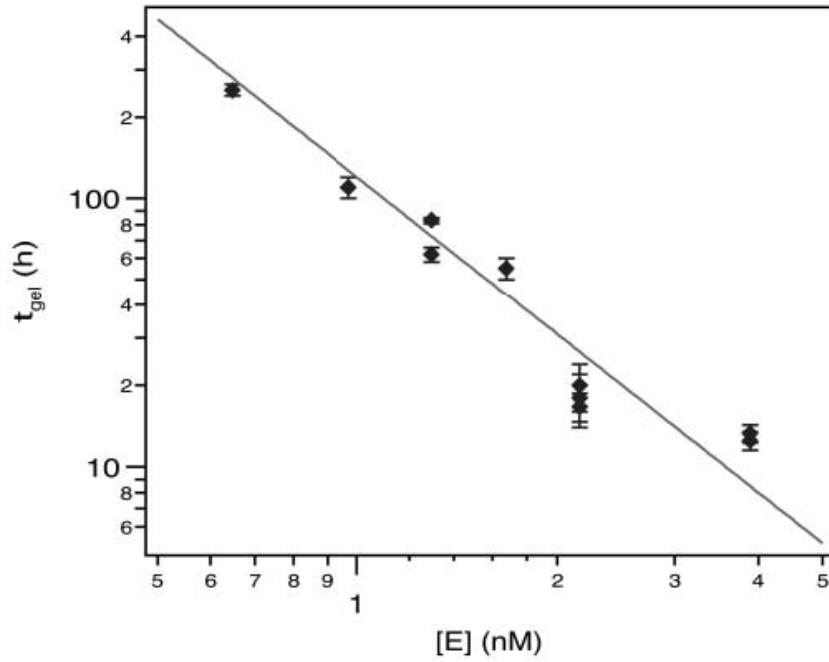


Figure 55 : Influence de la concentration en thermolysine ([E]) sur la variation du temps de protéolyse du gel à une fraction volumique de 1% (t<sub>gel</sub>).

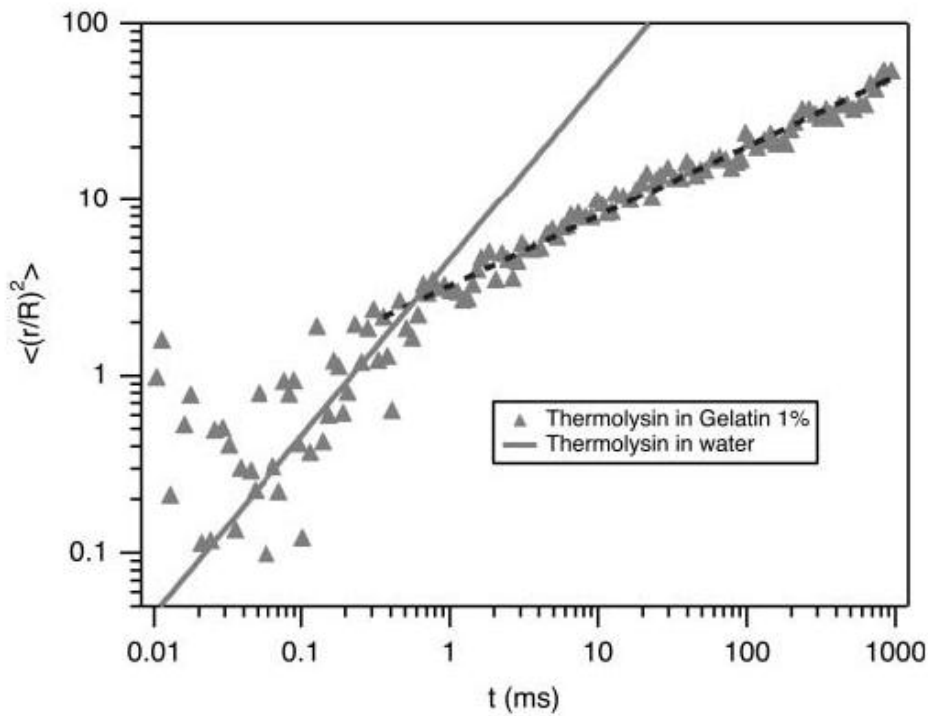


Figure 56 : Réduction du déplacement quadratique moyen de la thermolysine dans le gel. La ligne pleine considère le déplacement de la thermolysine dans l'eau. Les pointillés correspondent à la loi de puissance de  $\langle (r/R)^2 \rangle = (3.2 \pm 0.1) \times t^{0.4 \pm 0.01}$ . (r = déplacement de l'enzyme R= rayon de l'enzyme)

Cette étude montre pour la première fois que la dégradation enzymatique de gels de protéines peut être décrite comme une transition de phase gel-solution. Cette valeur numérique d'exposant critique est différente par rapport à la valeur prédite, égale à 0,44 (Stauffer, 1985) pour de la percolation aléatoire associée au processus de gélification ; ce modèle ne suffit donc pas à expliquer la transition gel-sol observée pour la dégradation de gels de protéines par des protéases.

De nouvelles études de la protéolyse de gels de gélatine à 1% par la thermolysine ont été réalisées par des expériences de diffusion quasi-élastique de lumière et de spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) où l'enzyme est marquée avec un fluorophore (FITC) (Fadda et al, 2003). La question posée était de déterminer si le processus de dégradation était dépendant de la diffusion de l'enzyme. Des billes de latex (d'environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont emprisonnées dans un gel de gélatine en présence d'enzyme. La dynamique de ces billes, suivie par diffusion quasi-élastique de lumière, est modifiée par la dégradation enzymatique du gel au cours du temps et permet d'établir que le temps de dégradation varie comme  $1/[E]^{1/\beta}$  avec  $-1/\beta = 1.95 \pm 0.15$  (Figure 55). Les données ont été interprétées comme un processus de solubilisation limité par une diffusion anormale de l'enzyme. Cette hypothèse est validée par les expériences de FCS. Le déplacement moyen carré ( $\langle r^2 \rangle$ ) de la thermolysine dans le gel, obtenu à partir de la fonction de corrélation de fluorescence, montre un comportement sous-diffusif (pour  $t > 3$  ms),  $\langle r^2 \rangle \propto t^{0.4}$  (Figure 56). Il a été proposé un mécanisme de diffusion de l'enzyme à travers une barrière de potentiel, l'enzyme reste immobilisée pendant le temps nécessaire pour hydrolyser un lien peptidique puis saute sur un site voisin sur lequel elle est de nouveau piégée. Dans le cas où le temps de résidence sur un site ne devient pas négligeable par rapport au temps de diffusion entre deux sites, un comportement anormal est observable ; dans le cas contraire la diffusion brownienne est attendue, alors la barrière de potentiel est négligeable.

Il a été également trouvé que le module élastique varie comme  $G \propto \varepsilon^{4.1 \pm 0.4}$  (Pelta, 2005) , au cours de la dégradation enzymatique de gels de gélatine, la valeur de l'exposant d'élasticité est différente de celle prédite, égale à 2, pour de la percolation aléatoire, montrant ainsi la difficulté de comprendre la transition de phase gel-sol catalysée par une enzyme.

Pour tenter d'expliquer la dégradation enzymatique de gels de protéine, la première hypothèse était de penser qu'elle suivait un modèle réverse de transition sol-gel de type percolation. Ce

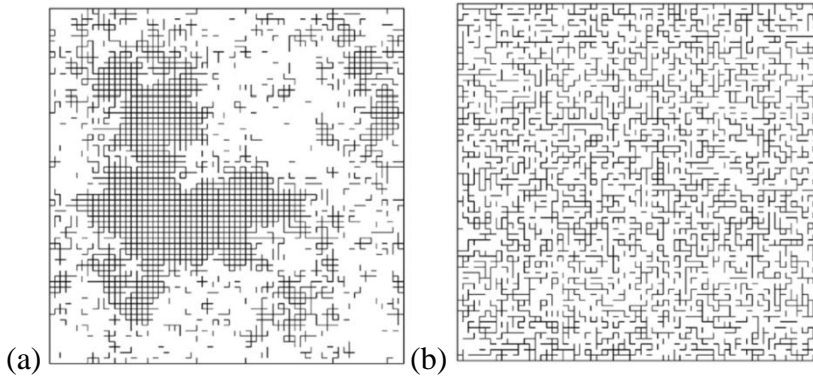


Figure 57 : (a) Modèle de « pacman percolation » dans un réseau carré de taille  $64^2$  avec une seule enzyme introduite dans le système après 12 000 déplacements. La densité de ponts non-hydrolysés est  $p=0,42$ . (b) Cas de la « random percolation » dans les mêmes conditions. (Abete et al 2004)

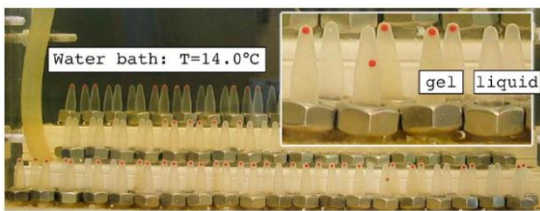


Figure 58: Protocole expérimental de dégradation de gel : Le gel au stade solide permet à la bille rouge de se maintenir au sommet du tube. Au moment de la transition gel-sol ( $t_c$ ) la bille tombe. (Lairez et al, 2007)

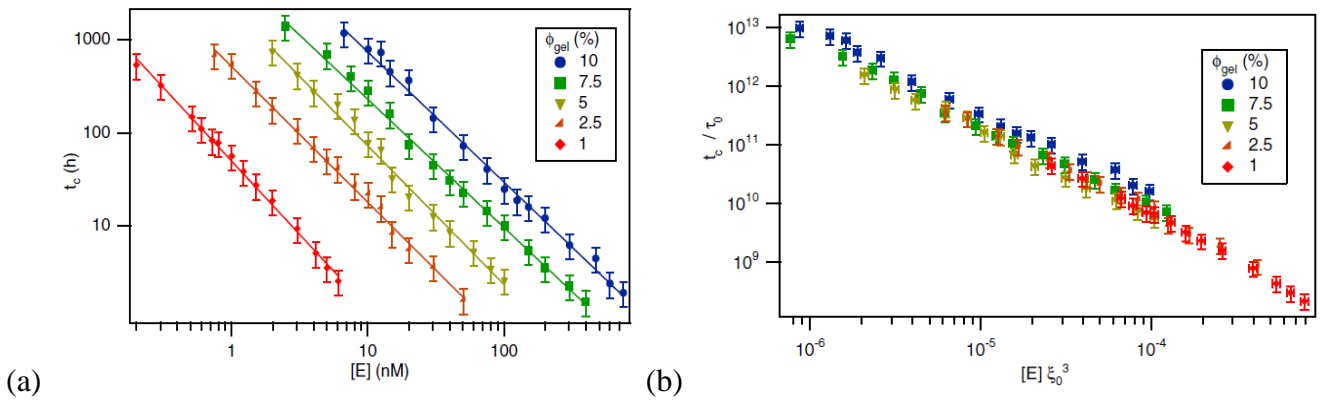


Figure 59 : (a) Influence de la concentration en gélatine sur le mécanisme de dégradation de la thermolysine. (b) Le temps de dégradation ( $t_c$ ) est représenté en fonction de la concentration en thermolysine ( $[E]$ ) pour différentes fractions volumiques de gel ( $\phi_{gel}$ ). Les variables sont réduites en tenant compte du nombre d'enzyme par maille et du temps élémentaire de diffusion de l'enzyme. (Lairez 2007)

mécanisme est également dépendant de la diffusion de l'enzyme pouvant introduire des corrélations entre les coupures dans le gel.

Afin d'explorer cette possibilité, le modèle de « pacman percolation » a été étudié par simulation de Monte-Carlo (Abete et al, 2004). Dans ce modèle, le gel de protéine est schématisé par un réseau cubique, et l'enzyme suit une marche aléatoire sur ce réseau coupant des liens au cours de sa marche. Pour une faible densité en enzyme, moins d'une enzyme par maille, le modèle conduit à une nouvelle classe d'universalité qui serait liée à des corrélations entre coupures dans le réseau (Figure 57a). En particulier pour la fraction gel, l'exposant critique est estimé à 1 comme celui trouvé expérimentalement pour la dégradation enzymatique de gels (Berry et al, 2000).

Lorsque plusieurs enzymes sont intégrées au modèle et tant que leurs concentrations restent faibles face à la densité du réseau, il n'existe pas de différence notable entre la présence d'une ou plusieurs enzymes. Lorsque la densité en enzyme est élevée (supérieure ou égale à une enzyme par maille) tous les ponts sont hydrolysés simultanément et il n'existe alors plus de corrélation entre eux, on retombe sur de la percolation aléatoire (Figure 57b).

D'autres expériences ont été réalisées pour tester si la dégradation enzymatique de gels est limitée par la réaction ou la diffusion, et pour vérifier la robustesse ou la validité du modèle théorique avec des gels de gélatine dégradés par de la thermolysine. Un système à chutes de billes (Gau, 2005, DEA) a été mis au point pour augmenter à la fois le nombre d'expériences et la statistique (Figure 58).

Dans un premier temps il a été vérifié que l'ajout d'une bille ne génère pas de force de cisaillement capable de biaiser les résultats. Pour cela, une mesure de rhéologie sur un gel à 1% de gélatine a été comparée à l'expérience de la chute de bille. Elle a permis de considérer que la force de cisaillement de la bille est négligeable et ainsi de valider le protocole expérimental. Lorsque la thermolysine est mise en présence de gélatine à diverses fractions volumiques de gel, la représentation de  $t_c$  en fonction de la concentration en thermolysine  $[E]$  permet de montrer que pour chaque  $\phi_{gel}$  les temps de dégradation suivent une loi de puissance dépendante de  $[E]$  tel que :  $t_c([E])=t_c(1)[E]^{-1/\beta}$  (Figure 59a). L'ensemble des données aboutit à un exposant  $1/\beta$  compris entre  $4/3$  et  $5/3$ . Lorsqu'il est tenu compte du nombre d'enzymes par maille, toutes les courbes peuvent être superposées. La thermolysine a un mécanisme sous-diffusif anormal indépendant de la fraction volumique en gel (Figure 59b).

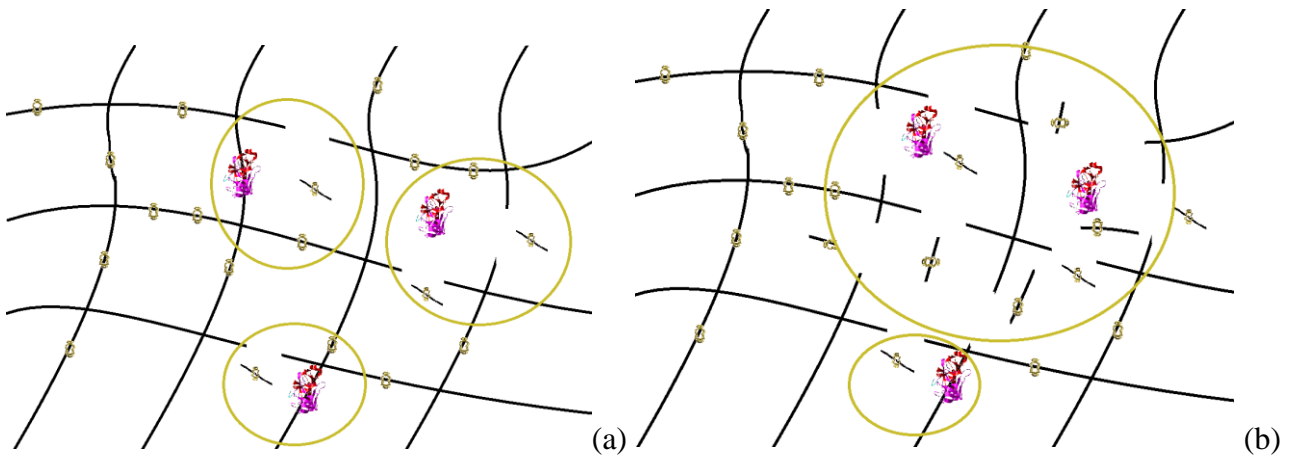


Figure 60 : « Swiss chesse » modèle (a) Au temps  $t_0$  les enzymes présentes dans le gel dégradent les mailles du gel formant des bulles de dégradation. (b) Au temps  $t_1$  les bulles de dégradation se rejoignent.

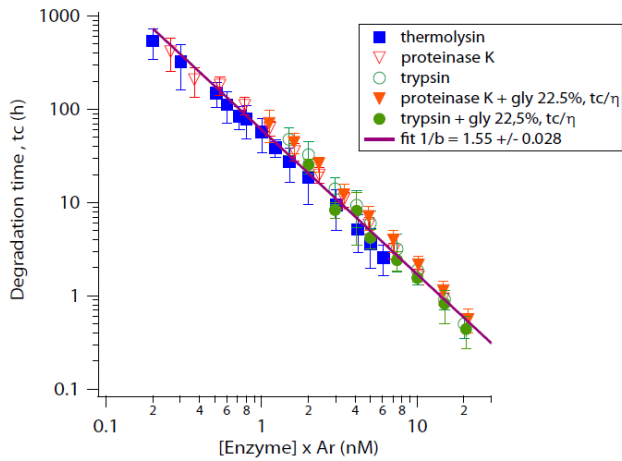


Figure 61 : Le temps de dégradation  $t_c$  représenté en fonction des concentrations en enzymes. L'ensemble des résultats a été superposé en tenant compte des variations de l'activité relative ( $Ar$ ) des enzymes et de la viscosité due à la présence de glycérol (thermolysine, trypsine, protéinase K avec et sans glycerol à 1% de gélatine).

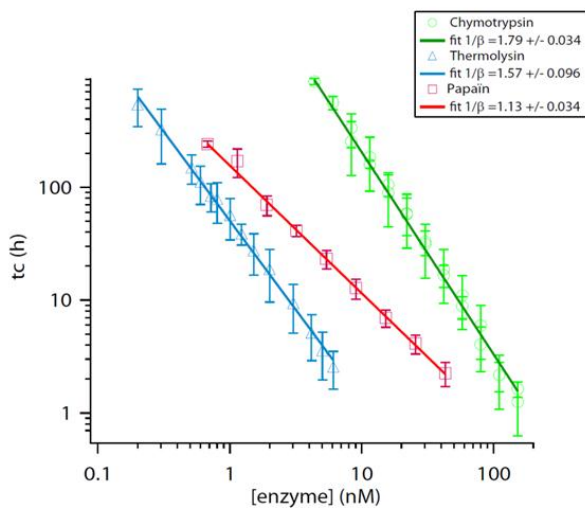


Figure 62 : Représentation à 1% de gélatine des temps de dégradation de l' $\alpha$ -chymotrypsine, la papaïne et la thermolysine. Les valeurs d'exposant  $1/b$  montrent des mécanismes de dégradation différents.

Ce mécanisme sous-diffusif est-il limité par la réaction ou par la diffusion de l'enzyme ? Pour répondre à cette question les auteurs ont ajouté 22% de glycérol à l'expérience afin d'augmenter la viscosité apparente du milieu. Ainsi, ils ont pu observer un décalage des temps de dégradation pour chaque pourcentage de gélatine testé. Ces décalages vers des temps plus longs ne changent pas l'exposant observé donc le mécanisme de dégradation mais est caractéristique d'un effet sur la diffusion de l'enzyme. En effet, la prise en compte de la viscosité et de la perte d'activité permet de superposer les courbes en présence et en absence de glycérol et ainsi d'affirmer que la cinétique de dégradation de gels de gélatine par la thermolysine est limitée par la diffusion.

Un modèle théorique de « swiss-chesse » (Figure 60) est proposé pour rendre compte des données expérimentales (Lairez et al, 2007). L'enzyme, la thermolysine, suit une marche aléatoire à effet de mémoire. Elle a donc une probabilité plus importante de retourner sur le même site plutôt que de se déplacer vers un nouveau site créant ainsi une bulle de dégradation. Lorsque l'action simultanée de plusieurs enzymes mène les bulles de dégradation à se rencontrer, ces dernières fusionnent tout en laissant des espaces gélifiés, conduisant à l'effondrement du gel et donc à sa solubilisation. L'application de cette théorie à la dégradation d'un gel par une enzyme donne que le temps de dégradation ( $t_c$ ) en fonction de la concentration en enzyme varie comme  $t_c \propto [E]^{-1/\beta}$  avec  $4/3 < 1/\beta < 5/3$ . Ce modèle valide les résultats expérimentaux avec  $1/\beta = 1,46$  (Lairez et al 2007).

Au laboratoire, il a été obtenu pour des gels de gélatine à 1% mis en présence de la protéinase K et la trypsine, la même dépendance, que celle observée pour la thermolysine des temps de dégradation en fonction de la concentration en enzyme (Figure 61). Pour ces enzymes, la réaction est limitée par la diffusion. Par ailleurs pour la papaïne, le temps de dégradation devient inversement proportionnel à la concentration en enzyme, suggérant une diffusion brownienne de l'enzyme. Dans ce dernier cas, la cinétique est limitée par la réaction. Pour une autre enzyme l' $\alpha$ -chymotrypsine, l'exposant de diffusion anormale change par rapport à la thermolysine, et le processus est limité par la diffusion (Figure 62) (Breton et al en préparation). Ces derniers résultats montrent que la dégradation enzymatique de gels de protéines ne peut pas se résumer à un comportement universel et la compréhension de ce processus nécessite de nouvelles expériences. C'est l'objet de cette thèse, ou nous allons explorer systématiquement l'effet de la concentration en gélatine, du changement de la



viscosité du milieu et de la force ionique, ainsi que l'implication du nombre de sites de coupures pour différentes enzymes, afin de mieux comprendre la transition gel-sol catalysée par une enzyme. Une étude théorique récente de la cinétique de dégradation enzymatique de gels, pour laquelle l'enzyme diffuse le long d'une chaîne avec des sites d'interaction qui correspondent aux sites de coupure au niveau des nœuds du réseau permet d'expliquer la variation de l'exposant de diffusion anormale,  $t_c \approx [E]^{-1/(1-\beta/2)}$  avec  $\beta$  compris entre 0 et 1. (Chatterjee et Cherayi 2010).





# Matériel et Méthodes

## Biophysique de la dégradation de gels de protéines par des protéases.

Le choix des enzymes s'appuie sur le nombre de sites de coupure qu'elles possèdent sur la gélatine, leur activité sur substrat modèle (azocaséine) et leur stabilité à 14°C.

### L' $\alpha$ -chymotrypsine.

L' $\alpha$ -chymotrypsine (E.C. 3.4.21.1, Sigma C7762) est une sérine protéase de la famille S1 composée de 241 acides aminés (aa). L' $\alpha$ -chymotrypsine est formée à partir du chymotrypsinogène. Composée de 3 chaînes peptidiques (A : 13 aa, B : 131 aa et C : 97 aa) l' $\alpha$ -chymotrypsine en est la forme active. Elle possède 49,9% d'acides aminés hydrophobes et 50,1% d'hydrophiles. Cette enzyme coupe en C-terminal à la suite d'un résidu tyrosine, phénylalanine, tryptophane ou leucine. Son point isoélectrique se situe à 8,75. Dans nos conditions expérimentales, à pH7, elle est chargée positivement. Elle est considérée comme stable et globalement hydrophobe.

L' $\alpha$ -chymotrypsine a 94 sites de coupures sur la gélatine s'il n'est pas tenu compte de la conformation en fibre ou en réseau de celle-ci.

### La Papaine

La Papaine (E.C. 3.4.22.2, Sigma P4762) est une cystéine protéase à large spectre appartenant à la famille des peptidases C1. Elle hydrolyse les ponts peptidiques avec une préférence pour les acides aminés à large chaîne latérale hydrophobe. Composée de 345 aa formant une seule chaîne peptique avec trois ponts disulfures et un groupe sulfhydryl nécessaire à son activité. Sa structure tridimensionnelle consiste en 2 domaines structuraux distincts reliés par le site actif. Pour être activée, elle nécessite la présence de L-cystéine à 5mM. Son point isoélectrique est de 8,75. Elle possède 1705 sites de coupures sur la gélatine.

### La protéinase K

La protéinase K ou endopeptidase K (E.C. 3.4.21.64, Sigma P2308) est une sérine protéase à large spectre appartenant à la famille des subtilisines. Elle hydrolyse les protéines préférentiellement après des acides aminés hydrophobes. Cette enzyme est stable à de



nombreux pH et dans de nombreux tampons et son point isoélectrique est de 8.9. Le site catalytique se compose de la triade Asp39-His69-Ser224. Le site de reconnaissance du substrat, impliquant Gly100-Tyr104 et Ser132-Gly136, forme trois brins bêta antiparallèles avec le substrat (Müller 1994). Elle possède 860 sites de coupures sur la gélatine.

Les enzymes sont solubilisées, de 1mg/ml à 10 mg/ml, dans un tampon Tris-HCl 200mM pH 7,4 puis aliquotées et conservées à -80°C.

#### Mesure de l'activité enzymatique.

Les activités enzymatiques de chacune des protéases sont mesurées en présence d'azocaséine (Sigma A2765), correspondant à de la caséine complexée à un colorant, l'azo. La libération du colorant est proportionnelle à l'activité de dégradation de l'enzyme. Les enzymes sont placées dans une solution d'azocaséine à 0.44% (m/v) diluée en tampon Tris-HCl 200mM pH 7,4. Une cinétique de 30 minutes à 37°C est effectuée en prélevant à intervalles réguliers du mélange réactionnel. L'activité enzymatique est arrêtée à l'aide d'acide trichloroacétique à 50% (v/v) précipitant ainsi les protéines. Après une heure d'incubation dans la glace et une centrifugation de 30 minutes à 4°C, le surnageant est neutralisé à l'aide de NaOH 2N. La quantité d'azo libérée est mesurée par densité optique à 440nm. Des tests d'activité ont également été effectués en compétition entre de l'azocaséine et de la gélatine à divers pourcentages.

#### Expérience de la chute de bille

Le choix du substrat est basé sur sa capacité à être dégradé par des enzymes (nombre de sites de coupure présents pour chaque enzyme), ses propriétés physiques (formation de réseau) et son intérêt biologique (modèle proche de l'*in vivo*).

#### La gélatine.

La gélatine se présente sous forme de poudre de gélatine provenant de peau de veau fournie par Sigma (G9382) de masse molaire d'environ  $1.10^5$ g/mol, et correspond à du collagène dénaturé. Le collagène est formé de 3 chaînes polypeptidiques maintenues par des liaisons faibles et des ponts covalents, formant ainsi une triple hélice. Chaque chaîne se caractérise par la présence d'une glycine tous les 3 acides aminés, ainsi qu'une proportion de 30% en proline et hydroxyproline et 10% des acides aminés ont des résidus hydrophobes. La gélatine est soluble à une température minimale de 40°C puis gélifie si elle est présente en



concentration supérieure à  $0.01\text{g/cm}^3$ . La gélification est due à la transition pelote-hélice (transition de l'état fluide à solide). Chaque chaîne de collagène dénaturé a la possibilité de créer des liaisons avec au moins 3 chaînes voisines et ainsi de former des agrégats. Ces derniers se lient jusqu'à l'apparition d'un agrégat macroscopique correspondant au gel.

Les solutions de gélatine sont solubilisées dans un tampon 200mM Tris-HCl à pH 7.4 et incubées à une température de  $60^\circ\text{C}$  durant 1 heure. Les différentes dilutions de l'enzyme sont préparées dans le même tampon durant l'incubation de la gélatine. La gélatine est ensuite mise en présence de l'enzyme puis l'ensemble est vortexé. Une bille de latex rouge de 2 mm de diamètre est ensuite déposée dans le système comme témoin de solubilisation. Les échantillons sont placés à  $4^\circ\text{C}$  durant une heure. Cette température a été choisie de manière à déplacer l'équilibre entre la dégradation et la gélification en faveur de la formation rapide d'un gel. L'échantillon est alors transféré dans un bain thermostaté à  $14^\circ\text{C}$  pour évaluer le temps de dégradation ( $t_c$ ) par prise automatique de photos toutes les 15 minutes. Les expériences concernant le type d'interaction pouvant exister entre le gel et les enzymes ont été réalisées selon le même protocole mais dans des tampons Hepes 20mM, pH 7.4 contenant 100mM, 200mM ou 400mM de NaCl.

### **Détermination du diamètre enzymatique par diffusion de lumière.**

Dans le but de déterminer l'encombrement stérique des enzymes utilisées, leur diamètre hydrodynamique a été mesuré.

La diffusion de lumière mesure un mouvement brownien relié à la taille de la particule. Cette mesure est effectuée en illuminant les particules en suspension et en analysant la fluctuation de l'intensité de diffusion. En pratique, les particules en suspension sont en agitation permanente due au mouvement brownien. Les petites particules bougent plus vite que les grosses particules. Du au déplacement constant des particules, ce qui est perçu sur le détecteur est aussi en mouvement, l'intensité fluctue donc. En utilisant l'équation de Stokes-Einstein mettant en relation le mouvement brownien et la taille de la particule, il est possible d'établir une corrélation entre l'intensité du signal et la taille de la particule. Une grosse particule se déplaçant lentement, la corrélation entre deux intensités séparées dans le temps sera plus grande que celle de petites particules. La distribution de l'intensité en fonction d'une distribution de tailles permet d'établir le diamètre hydrodynamique des particules. Pour les mesures, les protéases ont été solubilisées dans du tampon Tris-HCl 200mM pH 7.4 à des concentrations de 5mg/ml pour la thermolysine et de 7mg/ml pour l' $\alpha$ -chymotrypsine, la



protéinase K et la papaïne, puis filtrées à 0.22 $\mu$ m. Les mesures ont été faites à l'aide du *zetasizer nano* (Malvern).

### **Détermination du potentiel Zeta ou des charges de surface des enzymes.**

Les potentiels zêta (charge de surface) de chacune des enzymes de cette étude, ont été déterminés afin d'établir l'implication des interactions électrostatiques dans les mécanismes observés en dégradation de gels de protéine.

Quand une particule chargée est mise en suspension dans un liquide, les ions de charge opposées sont attirés vers la surface de la particule en suspension. Un échantillon chargé négativement attire les ions positifs du liquide et inversement. Les ions près de la surface de la particule seront fortement liés tandis que les ions qui sont plus loin seront faiblement liés formant une couche diffuse. Dans la couche diffuse, il y a une limite théorique appelée le plan de glissement : des ions au niveau de cette frontière se déplacent avec la particule quand ils se déplacent dans le liquide, mais des ions en dehors de la frontière resteront où ils se trouvent.

Le potentiel au niveau du plan de glissement est appelé le potentiel zêta. Il est obtenu par mesure de la mobilité électrophorétique des particules.

Cette technique a été utilisée pour mesurer le potentiel zêta de chacune des protéases utilisées dans l'étude de la dégradation de gels de protéines par des protéases. Pour se faire, chaque protéine est préparée à une concentration de 1 mg/ml (m/v) dans du tampon Tris- HCl 200mM pH 7.4 puis filtrée à 0.02 $\mu$ m afin d'éviter la présence d'agrégats. Les mesures sont ensuite effectuées à l'aide du *zetasizer nano* (Malvern).





## Modèle de migration des lignées issues de cancer mammaire et étude des protéases impliquées.

### Expérience de migration cellulaire sur gel de Matrigel.

Les conditions de culture des cellules, c'est-à-dire, à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> implique l'utilisation de gels compatibles expérimentalement.

#### Le Matrigel

Le Matrigel est un mélange complexe de diverses protéines produites par les cellules Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de sarcome murin. La composition protéique du Matrigel se rapproche de celle de la lame basale, parce qu'il contient du collagène de type IV, de la laminine-111, des protéoglycanes à heparane sulfate, du nidogène et de nombreux facteurs de croissance.

#### Culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires étudiées proviennent de cancer du sein humain.

Les cellules MDA-MB-231 issues de l'effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire sont de type Basal B. Leur profil d'expression génique classe ces cellules parmi les ER- PR-, et la protéine TP53 est très présente mais mutée.

La lignée Hs578T provient d'une tumeur primaire de carcinome canalaire invasif. De type Luminal, elle n'exprime pas de récepteurs aux œstrogènes ni à la progestérone ; TP53 est présente et mutée.

Les cellules BT549 sont issues d'un carcinome canalaire papillaire invasif, de type Basal B. Elles n'expriment ni ER ni PR, et TP53 est très présente bien que mutée.

La lignée MCF7 a été prélevée de l'effusion pleurale d'un carcinome canalaire invasif. Elle est de type Luminal, ER+ et PR+; elle exprime très peu de TP53 mutée.

Les cellules BT474, de type Luminal et provenant d'un carcinome mammaire canalaire invasif, sont dites triples positives, c'est-à-dire qu'elles sont ER+, PR+ et HER2+. La protéine TP53 est présente.

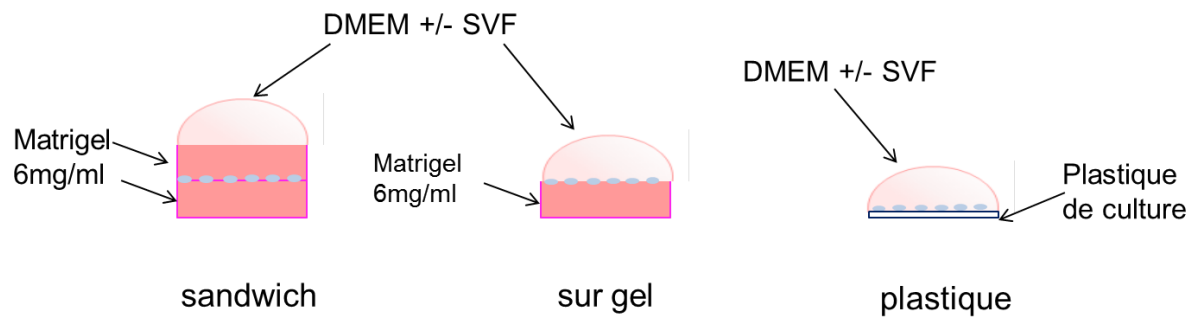


Figure 63: Protocole expérimental du test de migration cellulaire.

La lignée T47D de type Luminal, issue de l'effusion pleurale d'un carcinome canalaire invasif, est double positive PR+, ER+ et la présence de TP53 mutée est à noter (Nerve 2009).

Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté de 10% de sérum de vœu fœtal (SVF), 50µg/ml de pénicilline et streptomycine, 10mM HEPES et 2mM de Glutamax dans une atmosphère thermo-régulée à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont décollées du support à l'aide de trypsine-EDTA (0.25%). Elles sont ensuite soit réensemencées pour l'entretien des lignées, soit utilisées à plus faible densité pour des tests de migration cellulaire.

### Test de migration cellulaire

Le Matrigel est préparé à une concentration de 6mg/ml à 4°C, dans le même milieu DMEM que les cellules, avec pour différence la présence ou l'absence de 10% SVF. Dans un premier temps, 40µl de gel est déposé dans des plaques 96 puits. Le gel est ensuite incubé 1h30 à 37°C. Une fois les cellules décollées de leur support initial, elles sont réensemencées à raison de 35000 cellules/puits durant 1 heure. Le milieu est ensuite éliminé. 40µl de gel est alors ajouté sur les cellules des puits qui serviront à la culture dite en « sandwich » et 50µl du milieu approprié est ajouté au-dessus des cellules cultivées « sur gel » (Figure 63). Après 1h30 à 37°C, 50µl de milieu est ajouté au « sandwich ». Un contrôle sur plastique de culture est mené conjointement. L'ensemble des puits est photographié à divers temps allant jusqu'à 48h.

Après ces 48h d'incubation dans une étuve à 37°C dans une atmosphère à 5% CO<sub>2</sub>, le gel et les cellules sont solubilisés à l'aide de 40µl de SDS 4% sous agitation pendant 1 heure.

Des tests sur les niveaux d'expression protéique des MMPs ont été effectués par zymographie. De plus, afin de réaliser une RT-PCR quantitative, l'extraction des ARNs est effectuée grâce au kit RNAspin mini RNA isolation kit (GE Healthcare). Les quantités d'ARNs présents sont quantifiées par mesure d'absorbance à 260nm. Les ARNs sont ensuite dilués aux concentrations adéquates en eau ultra pure et conservés à -20°C en vue de leurs utilisations ultérieures.

### Zymographie sur gels de gélatine, fibrinogène, caséine

La technique de zymographie permet de révéler la présence de MMPs sous leurs formes actives et inactives.



Le principe est celui d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE), additionné d'un substrat protéique spécifique (substrat) qui est piégé dans le gel. Les protéases migrent selon leur masse moléculaire apparente.

Le SDS est ensuite éliminé, par échange avec le Triton X-100, puis ce dernier est éliminé par lavages. Les protéases étant renaturées, le gel est incubé 18 heures à 37°C. La coloration au bleu de Coomassie du gel contenant le substrat permet de révéler les protéases qui sont mises en évidence par la présence de bandes blanches sur fond bleu; ces bandes sont caractéristiques de la capacité des protéases à dégrader le substrat.

Cette technique avec un substrat de type gélatine, permet la révélation des gélatinases (MMP-2 et MMP-9). A la préparation du gel SDS-PAGE à 10 % (m/v) est ajouté 0.1 % (m/v) de gélatine. Cette dernière est préparée au préalable en la chauffant durant 1 heure à 50°. Les échantillons sont dilués à l'aide d'un tampon (bleu de bromophénol 0.02%, Tris-HCl 100mM pH 6.8, SDS 0.7%, éthanol 6.6% et glycérol 25%) sans agent réducteur. La migration est réalisée à 4°C et à 20 mA/gel. Après migration, le gel est démoulé. Il sera lavé deux fois 15 minutes dans un bain d'eau distillée contenant 2,5 % (m/v) de Triton X-100 à 4°C. Le gel est ensuite incubé pendant 18 heures à 37°C dans un tampon Tris-HCl 100mM CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 10 mM, pH 7,4, dans lequel est ajouté du Brij-35 à 0.02% (m/v).

Le gel est ensuite coloré à l'aide de bleu de Coomassie 0.5% en solution dans un mélange d'acide acétique, éthanol et eau (1:4 :5 v/v/v). Il est ensuite décoloré avec une solution d'acide acétique, d'éthanol et d'eau (1:2 :7 v/v/v).

La même technique est utilisée avec une préparation de substrat de caséine à 0.05% (m/v) et permet de visualiser les MMP -3, -7, -12 et -11, et les MMP-1 et -13 avec une plus faible sensibilité.

L'utilisation du fibrinogène à 0.07% (m/v) comme substrat permet l'observation des MMP-3 et -14.

### **RT-PCR semi-quantitative pour la détermination des protéases majoritaires.**

La première étape de la qRT-PCR, ou PCR reverse quantitative, est la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire de l'ARN cible extrait. Pour cela une transcriptase inverse est présente dans le mélange qui sera ajouté au 10µg d'ARNs totaux présents pour la PCR quantitative.

Température d'hybridation	Gène	Amorce	Sequence	Reference
62°C	MMP1	MMP1F	CTGGCCACAACCTGCCAAATG	Ito et al., 2007
		MMP1R	CTGTCCCTGAACAGCCCAGTACTTA	
62°C	MMP-2	MMP2F	ATGACAGCTGCACCACTGAG	Primer3
		MMP2R	ATTTGTTGCCAGGAAAGTG	
58°C	MMP-3	MMP3F	TGATCCTGCTTTGTCCTTTG	Elshaw et al., 2004
		MMP3R	TTCAAGCTTCCTGAGGGATT	
62°C	MMP-7	MMP7F	GAGTGCCAGATGTTGCAGAA	Primer3
		MMP7R	AAATGCAGGGGGATCTCTTT	
62°C	MMP-8	MMP8F	TCTGCAAGGTTATCCCAAGG	Primer3
		MMP8R	CTTGCTGGAAAACTGCATCA	
58°C	MMP-9	MMP9F	TTGACAGCGACAAGAAGTGG	Elshaw et al., 2004
		MMP9R	CCCTCAGTGAAGCGGTACAT	
58°C	MMP-10	MMP10F	GGCTCTTTCACCTCAGCCAAC	Primer3
		MMP10R	TCCCGAAGGAACAGATTTTG	
58°C	MMP-11	MMP11F	GGGGATGTCCACTTCGACTA	Kohrmann et al., 2009
		MMP11R	CAGTGGGTAGCGAAAAGGTGT	
58°C	MMP12	MMP12F	TTGAATATGACTTCCTACTCCAACG	Primer3
		MMP12R	GTGGTACACTGAGGACATAGCAAAT	
58°C	MMP-13	MMP13F	AGGAGATGCCCATTTTGATG	Elshaw et al., 2004
		MMP13R	ACCTAAGGAGTGGCCGAACT	
62°C	MMP-14 ou N	MMP14F	GCAGAAGTTTTACGGCTTGCA	Gomes et al., 2012
		MMP14R	TCGAACATTGGCCTTGATCTC	
58°C	MMP-15 ou N	MMP15F	ACCTGCATGAAAACAACCTC	Primer3
		MMP15R	GTCAACGTCCTTCCACTGGT	
58/62°C	GAPDH	GAPDHF	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	Primer3
		GAPDHR	CCCCACTTGATTTTGAGGGGA	
58/62°C	βACTIN	βACTINF	CTCTCCAGCCTTCCTCCT	Primer3
		βACTINR	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

Figure 64 : Tableau des amorces correspondants aux gènes étudiés en RT-PCR quantitative.

Toutes les étapes de ce procédé se font donc dans le même tube, et la PCR a pour base l'ADN nouvellement synthétisé.

Le principe de la PCR quantitative est basée sur la possibilité de suivre l'amplification de l'ADN cible en temps réel par émission de fluorescence. Les données sont collectées à chaque fin de cycle. Plus l'échantillon de départ est concentré en ADN cible plus le nombre de cycle nécessaires pour que la fluorescence dépasse le bruit de fond est faible. Lorsque la quantité d'ADNc généré permet de sortir du bruit de fond le numéro du cycle est nommé Ct pour « cycle threshold » ou cycle seuil. Ce point apparaît en début de phase exponentielle et permet pour ce type de PCR d'étudier la production d'amplicons en cours de cycle et non pas à la fin. C'est ce Ct qui permettra par la suite de déterminer la quantité relative d'ADNc présente dans l'échantillon. La q-PCR se découpe en 3 phases :

- La phase de bruit de fond au cours de laquelle le nombre d'amplicons générés est insuffisant pour que le signal fluorescent sorte du bruit de fond.
- La phase exponentielle pour laquelle le signal des fragments générés dépasse le bruit de fond et est détecté. Le nombre de fragments produits double à chaque cycle.
- La phase stationnaire, ou de saturation, qui intervient lorsque certains réactifs deviennent limitant.

Pour pouvoir exprimer une quantité relative d'expression du gène cible, on considère :

- $X_n$  : le nombre de molécules d'ADN au cycle n.

- $X_0$  : le nombre de molécules initiales.

-E : l'efficacité de l'amplification

$X_n = X_0 \cdot (1+E)^n$  en considérant une efficacité d'amplification de 100%,  $X_n = X_0 \cdot 2^n$  puisque la quantité d'amplicons doit doubler à chaque cycle. Pour chaque échantillon, une correction est apportée par rapport aux gènes de référence. Les gènes de référence sont ubiquitairement exprimés par toutes les cellules et garantissent la régularité de la quantité d'ARN initial déposé dans chaque puits et permettent d'exprimer une quantité relative d'ARN présents à la fin de l'amplification. La normalisation de l'expression du gène cible par rapport au gène de référence est égale à  $2^{-(Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})}$  ou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .





Les RT-PCR quantitatives sont réalisées à l'aide du C1000 Thermal Cycler et du CFX 96 Real Time system (Biorad). Les amorces ont été sélectionnées à partir de la bibliographie sur le sujet ou ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 (Figure 64). Les PCR sont effectuées dans un volume final de 20 $\mu$ l en utilisant 5 $\mu$ l d'ARN à 2ng/ $\mu$ l, 4 $\mu$ M de chaque amorce, 10 $\mu$ L de tampon de réaction 2X contenant le SYBR Green I, du MgSO<sub>4</sub>, les dNTPs nécessaires à la réaction. Le mélange d'enzyme fourni contient la SuperScript III Reverse Transcriptase (RT) et la Platinum Taq DNA Polymerase (Kit Invitrogen SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR) permettant aux phases de transcription inverse et de PCR de se produire dans le même puits. L'étape de synthèse d'un ADN complémentaire se produit durant 3 minutes à 50°C. La PCR débute par une pré-incubation correspondant à une dénaturation de 5 minutes à 95°C. L'étape d'amplification répétée 40 fois est composée d'une dénaturation de 15 secondes à 95°C, d'une hybridation et d'une élongation de 30 secondes soit à 62°C soit à 58°C en fonction des couples d'amorces utilisés (Figure 64). L'acquisition de la fluorescence se produit à la fin de chaque cycle donc de chaque étape d'élongation. La réaction se termine par l'acquisition d'une courbe de fusion. Les deux gènes de référence choisis sont la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) dont la protéine produite est impliquée dans la glycolyse et la  $\beta$ -Actine dont le produit protéique est impliqué dans la formation du cytosquelette.



# RÉSULTATS

## Première Partie

### Dégradation enzymatique de gels de protéine



Lors d'une précédente étude sur la dégradation de gels de gélatine par la thermolysine, il a été montré que la diffusion de l'enzyme était ralentie (Fadda et al 2000) et que la cinétique était limitée par la diffusion. Un modèle de percolation continu, le « swiss-cheese modèle », permettait de rendre compte des résultats expérimentaux. Le temps de dégradation ( $t_c$ ) variant comme une loi de puissance de la concentration en enzyme :  $t_c \propto [E]^{-1/\beta}$  avec  $4/3 < 1/\beta < 5/3$  (Lairez et al, 2007). Dans la continuité de ces travaux, des expériences ont été réalisées de solubilisation de gels de gélatine (1%) par la trypsine et la protéinase K, et ont montré que ces deux endopeptidases présentent un comportement similaire à la thermolysine. Il a également été observé, pour l' $\alpha$ -chymotrypsine et la papaïne, des comportements différents de l'évolution des temps de dégradation en fonction de la concentration en enzyme, montrant respectivement que le mécanisme de dégradation était associé à de la diffusion anormale et la cinétique limitée par la diffusion ou à de la diffusion brownienne avec une cinétique limitée par la réaction (Breton et al. en préparation). La protéinase K et la trypsine, deux sérines protéases, la thermolysine, une métalloprotéase, et la papaïne, une cystéine protéase, sont des endopeptidases à spectre large, présentant un nombre élevé de sites de coupure pour la gélatine. L' $\alpha$ -chymotrypsine avait été choisie du fait du nombre plus restreint de sites de coupure pour ce substrat.

Existe-il un ou plusieurs modèles de la dégradation enzymatique de gels de protéines pour différentes classes d'enzyme ? La fraction volumique pourrait-elle influencer le mécanisme de la solubilisation enzymatique ? Le mécanisme est-il dépendant du nombre de sites de coupure de l'enzyme sur le réseau de gélatine ?



## I. Etude de l' $\alpha$ -chymotrypsine

L' $\alpha$ -chymotrypsine présente des caractéristiques proches de celles de la trypsine, elles font partie de la même classe d'enzyme et ont les mêmes sites de coupures. Leur différence vient de la spécificité des acides aminés précédant le site de coupure qui est plus élevée pour l' $\alpha$ -chymotrypsine. Ainsi le principal paramètre variant entre les deux enzymes est le nombre de sites de coupure sur le réseau gélatine, 94 pour l' $\alpha$ -chymotrypsine contre 265 pour la trypsine. Selon le modèle de continuum percolation, lorsque l'enzyme présente de nombreux sites de coupure sur le gel (substrat), le mécanisme de dégradation serait de type « Swiss cheese ». Cependant lorsqu'elle présente peu de sites de coupure, le mécanisme serait de type « Pacman Percolation » avec  $1/\beta=1$  (Abete et al 2004, Lairez et al, 2007). Le comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine étudié dans les mêmes conditions expérimentales que la trypsine (gélatine 1%, tampon TRIS 200mM, pH=7.4) avait donné un résultat inattendu (Breton et al, en préparation) que nous avons voulu vérifier et comprendre.



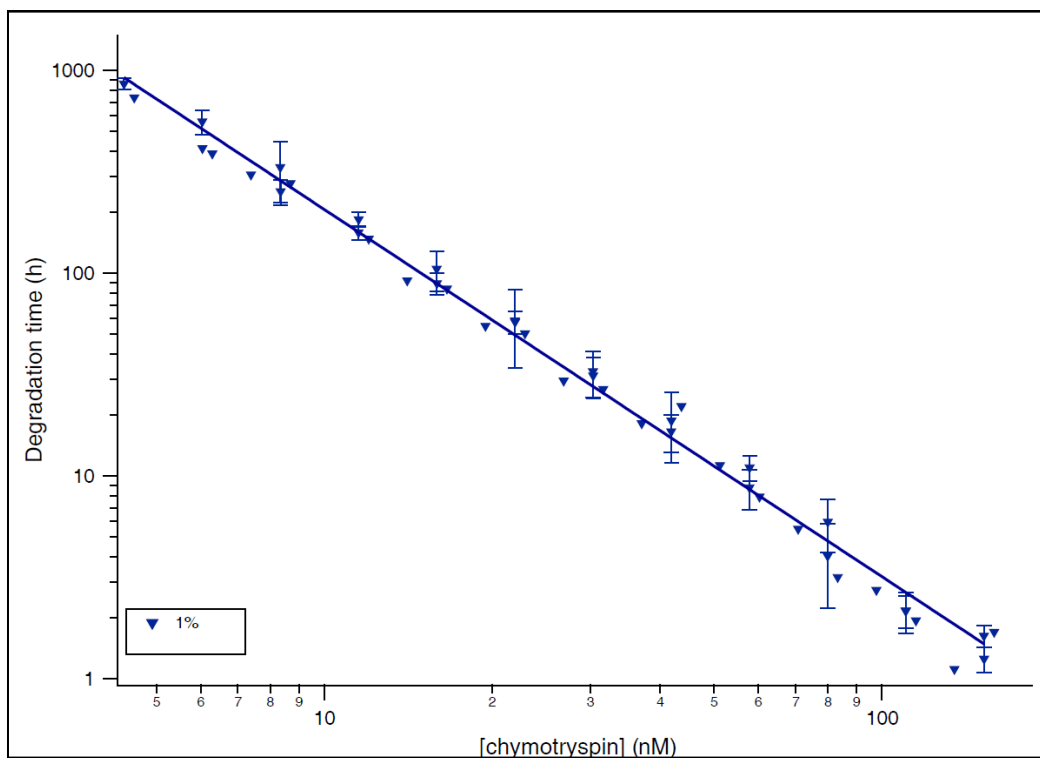


Figure 65 : Dégradation d'un gel de gélatine à 1% par l' $\alpha$ -chymotrypsine. (n=17)

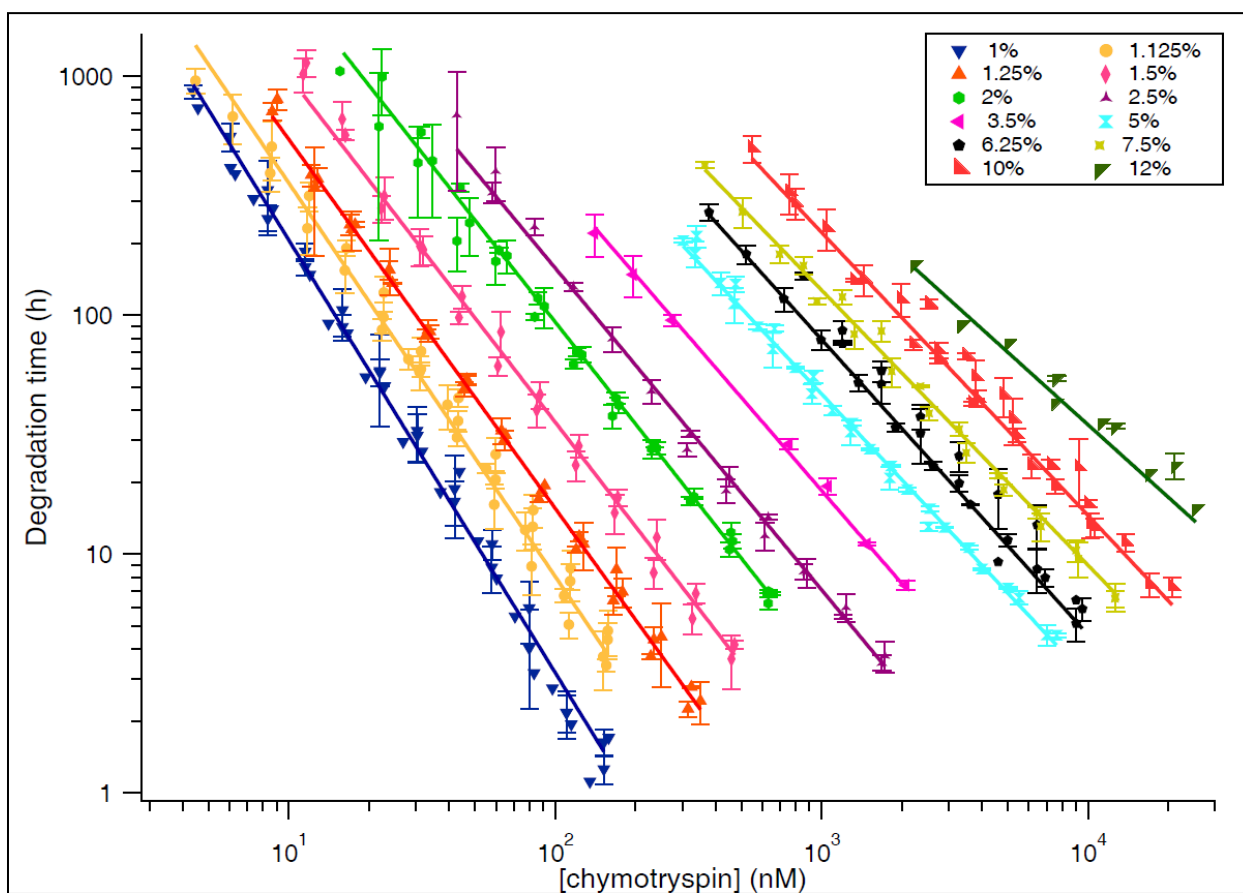


Figure 66 : Temps de dégradation de gels de gélatine par l' $\alpha$ -chymotrypsine en fonction de la fraction volumique de gel.

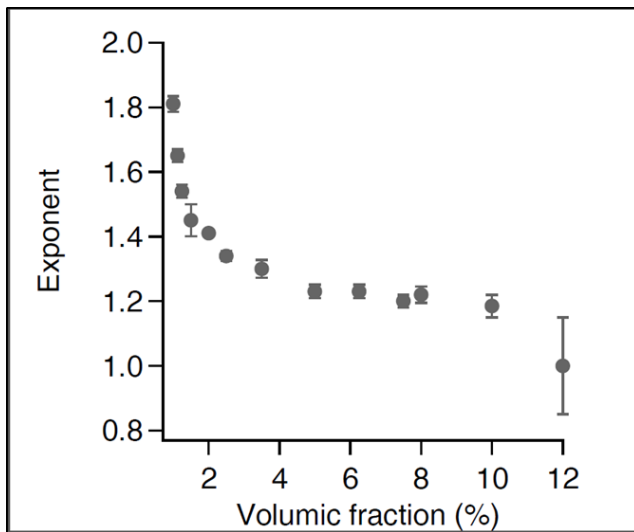
## **1. Confirmation pour la dégradation enzymatique de gels de gélatine d'un mécanisme de diffusion anormale.**

Les temps de dégradation ( $t_c$ ) de gels de gélatine à une fraction volumique de 1% ont été mesurés pour des concentrations en chymotrypsine qui varient de 4 nM à 186 nM, correspondant toujours à moins d'une enzyme par maille. Dans la Figure 65, le temps de dégradation est tracé en fonction de la concentration en  $\alpha$ -chymotrypsine [Chymotrypsine] en représentation double logarithmique.

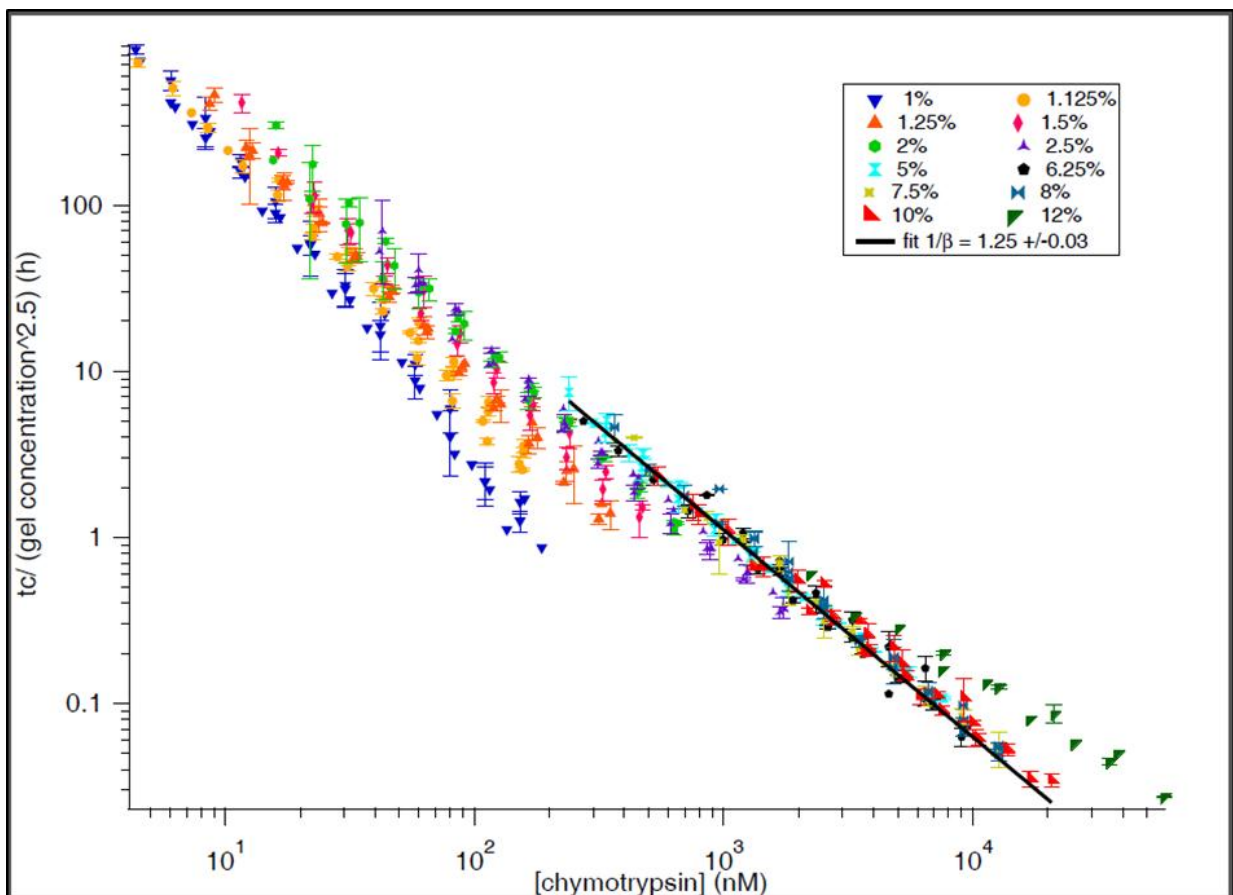
Les temps de dégradation de gels de gélatine par cette enzyme s'expriment sous la forme d'une loi de puissance de la forme  $t_c \propto [E]^{-1/\beta}$  et confirme les résultats précédents. L'exposant  $1/\beta$  reflète le comportement diffusif de l'enzyme (Lairez et al 2007). Nous rappelons que  $1/\beta$  est inversement proportionnel à l'exposant de diffusion anormale qui relie le déplacement carré moyen au temps en loi de puissance,  $\langle x^2 \rangle \propto t^\alpha$ . Nous retrouvons avec l' $\alpha$ -chymotrypsine un exposant  $1/\beta$  de  $1.8 \pm 0.024$  à  $\phi_{\text{gel}} = 1\%$  (w/v). Cet exposant est plus grand que la limite supérieure de  $5/3$ , prévue par le modèle du swiss-cheese et ne correspond pas au modèle de percolation précédemment décrit (Lairez et al 2007) pour expliquer la dégradation de gels de protéine par une protéase. L'objet du travail de cette thèse a donc été d'étudier quelle était l'influence de la concentration en gélatine sur le mécanisme de dégradation enzymatique et sur la valeur de cet exposant.

## **2. Changement du mécanisme de diffusion de l'enzyme en fonction de la fraction volumique de gel.**

Avec  $\phi_{\text{gel}}$  variant de 1 à 12 %, nous représentons de la même manière que précédemment les résultats des temps de dégradation des gels en fonction de la concentration en enzyme ( $t_c$  en fonction de  $[E]$ ) (Figure 66).



**Figure 67 : Effet de l'augmentation de la fraction volumique de gel sur le comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine.** Variation de l'exposant  $1/\beta$  en fonction de  $\phi_{gel}$  de 1 à 12% en tampon TRIS 200mM.



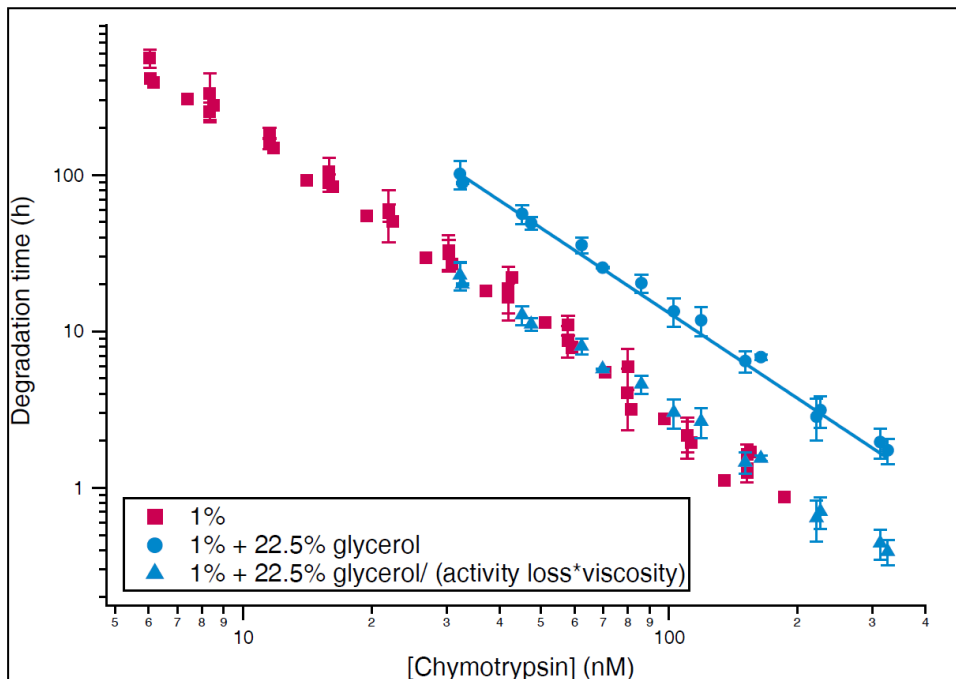
**Figure 68 : Un changement de mécanisme de dégradation du gel par l' $\alpha$ -chymotrypsine.** En tenant compte des variations d'activité enzymatique et de la concentration en gel pour superposer les courbes obtenues précédemment, toutes les courbes après 5% en gélatine se superposent.

Lorsque la fraction volumique en gel augmente, l'exposant  $1/\beta$  diminue. A partir de 1,125% de gélatine l'exposant initialement établi à  $1/\beta=1,8\pm0,024$  à  $\phi_{\text{gel}}=1\%$  devient  $1/\beta=1,65\pm0,02$ . Puis il continue à décroître jusqu'à  $1,2\pm0,021$  pour  $\phi_{\text{gel}}=5\%$ . Au-delà de cette fraction volumique en gel l'exposant reste stable à 1,2. Pour une fraction volumique supérieure, 12%, l'exposant atteint une valeur de 1 ( $1/\beta=1\pm0,15$ ) (Figure 67).

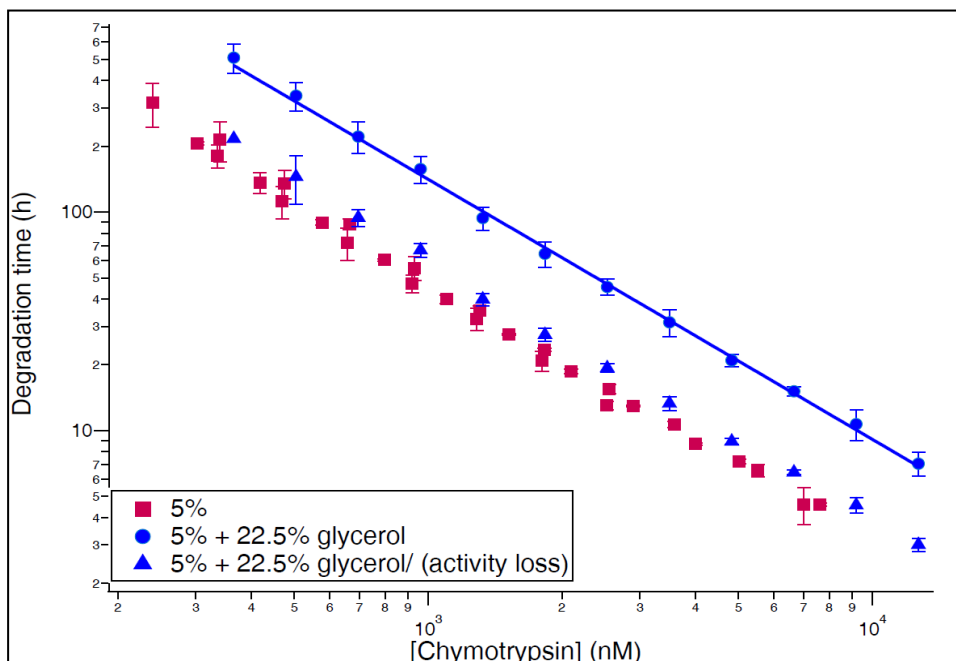
Ce changement d'exposant est également observé lorsqu'il est tenu compte de la variation de concentration en gel ainsi que des variations de l'activité relative de l'enzyme (Figure 68).

Toutes les courbes, à partir d'une concentration en gélatine de 5%, sont superposables montrant un seul comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine à ces concentrations. Cependant, il est impossible de superposer les courbes comprises entre 1% et 5% de gélatine. Il existe un décalage observable pour la courbe à 12% (probablement dû à un décalage de l'activité enzymatique) qui ne se superpose pas à l'ensemble de courbes allant de 5 à 10%. Ces résultats suggèrent un mode de diffusion différent selon le régime de concentration en gel.

Cette dépendance des temps de dégradation en fonction de la fraction volumique de gel est nouvelle ; reflète-t-elle des modes de diffusion de l'enzyme différents, anormal et brownien ? Dans ce cas, la cinétique est-elle limitée par la réaction, ou par la diffusion ?



**Figure 69 : Effet de l'augmentation de la viscosité du milieu sur les temps de dégradation par l'α-chymotrypsine pour une concentration en gélatine de 1%.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration enzyme pour une fraction volumique de gel de 1% avec ou sans glycérol. La superposition des courbes tient compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme et de l'augmentation de viscosité du milieu  $\Delta\eta$  en présence de glycérol.



**Figure 70 : Effet de l'augmentation de la viscosité du milieu sur les temps de dégradation par l'α-chymotrypsine pour une concentration en gélatine de 5%.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration enzyme pour une fraction volumique de gel de 5% avec ou sans glycérol. La superposition des courbes tient exclusivement compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme en présence de glycérol.

### **3. Cinétique limité par la réaction ou la diffusion.**

Il avait été précédemment mesuré les temps de dégradation du gel de gélatine à 1% en présence de 22,5% (w/w) de glycérol, augmentant ainsi la viscosité du milieu d'un facteur  $\Delta\eta=2,03$  (obtenu par diffusion quasi-élastique de la lumière). L'activité de l'enzyme en solution homogène sur substrat modèle (azocaséine et tampon TRIS 200mM seul) et en milieu visqueux a été vérifiée pour établir les facteurs de différences d'activités applicables à l'expérience en chute de billes. Ainsi la différence d'activité nommée activité relative, est  $Ar=2,42$ . En présence de glycérol, nous confirmons une augmentation des temps de dégradation des gels dans la gamme de concentrations utilisées dans nos expériences (Figure 69).

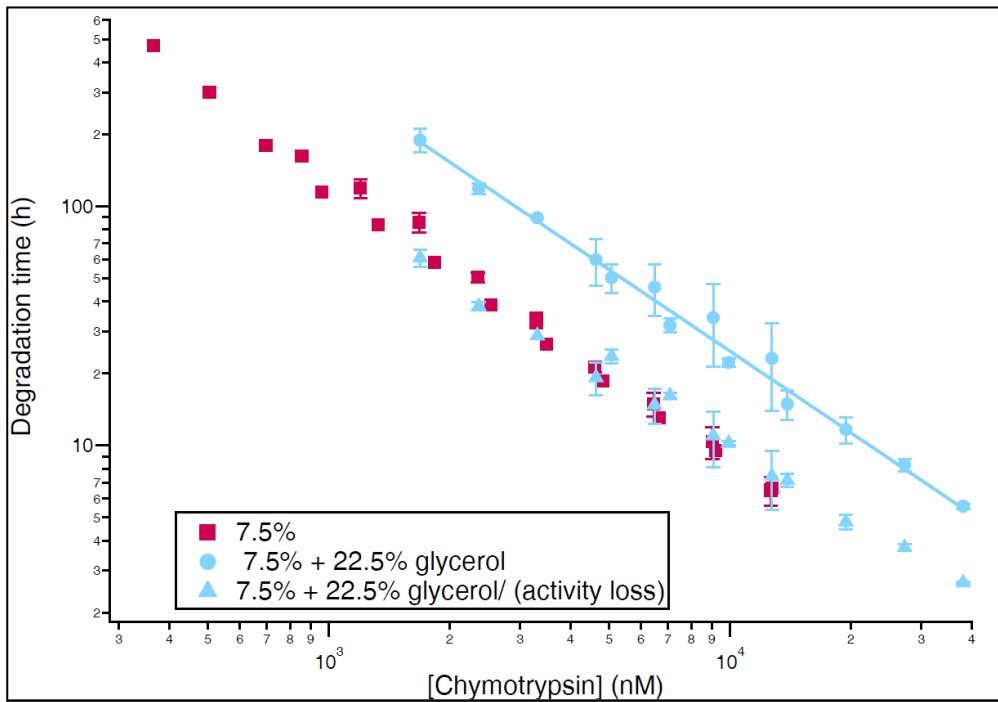
Ces temps évoluent également en loi de puissance de la concentration en enzyme avec le même exposant que celui sans glycérol, égal à  $1,8\pm 0,07$ . Lorsque l'on tient compte uniquement de la différence d'activité enzymatique il n'est pas possible de superposer les données obtenues avec et sans glycérol. En prenant en compte les différences à la fois d'activité et de viscosité les résultats sont parfaitement superposables. Ils confirment qu'à  $\phi_{gel}=1\%$ , lorsque  $1/\beta=1,8\pm 0,24$ , la diffusion de l' $\alpha$ -chymotrypsine est ralentie et que la cinétique est limitée par la diffusion.

Une augmentation de la concentration en gel a donc été réalisée afin de déterminer si ce mécanisme de dégradation pouvait être maintenu.

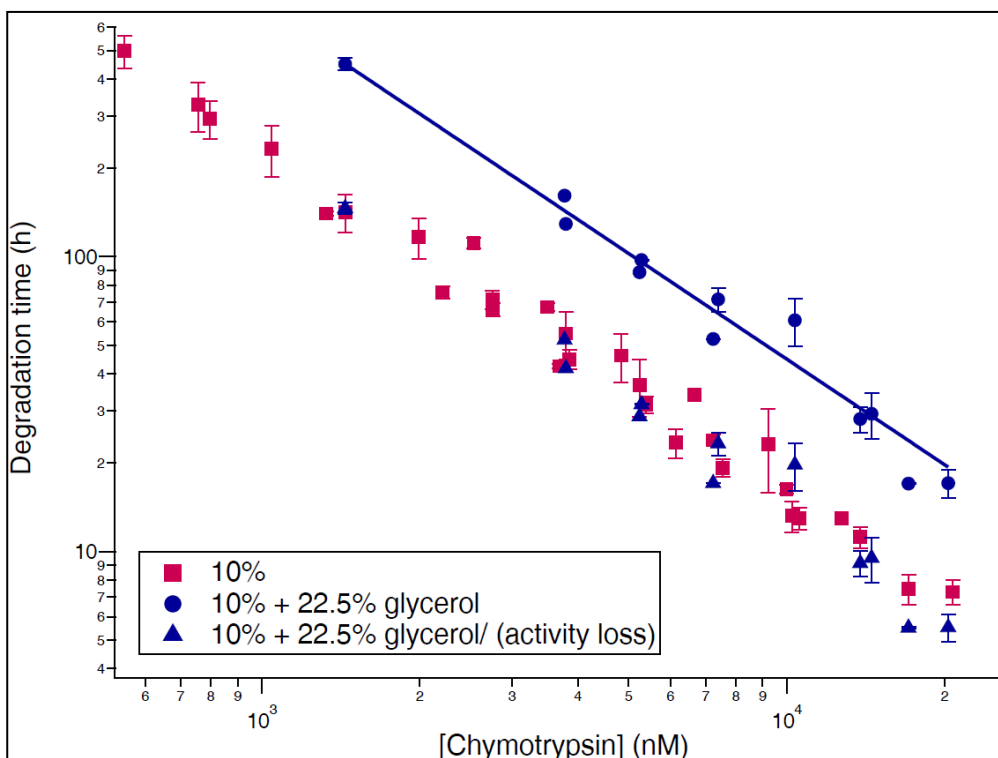
Pour  $\phi_{gel}=5\%$ , l'augmentation de viscosité du milieu conduit également à une augmentation des temps de dégradation (Figure 70). Nous trouvons un exposant égal à  $1/\beta=1,2\pm 0,032$  et identique à celui observé sans glycérol.

En prenant en compte essentiellement la différence d'activité de l' $\alpha$ -chymotrypsine dans le glycérol, les temps de dégradation obtenus, avec et sans glycérol, sont superposables. Le changement de viscosité du milieu ne modifie pas le temps de dégradation des gels et n'affecte pas le déplacement de l'enzyme dans son milieu. Ainsi, la cinétique devient limitée par la réaction.

Ce résultat traduit-il un changement de mode de diffusion de l'enzyme ? Quel est le sens de la valeur de cet exposant ? Pourrait-il refléter une diffusion brownienne de l'enzyme le long du réseau ?



**Figure 71 : Effet de l'augmentation de la viscosité sur le comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine pour une concentration en gélatine de 7.5%.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration enzyme pour une fraction volumique de gel de 7.5% avec ou sans glycérol. La superposition des courbes tient exclusivement compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme en présence de glycérol.

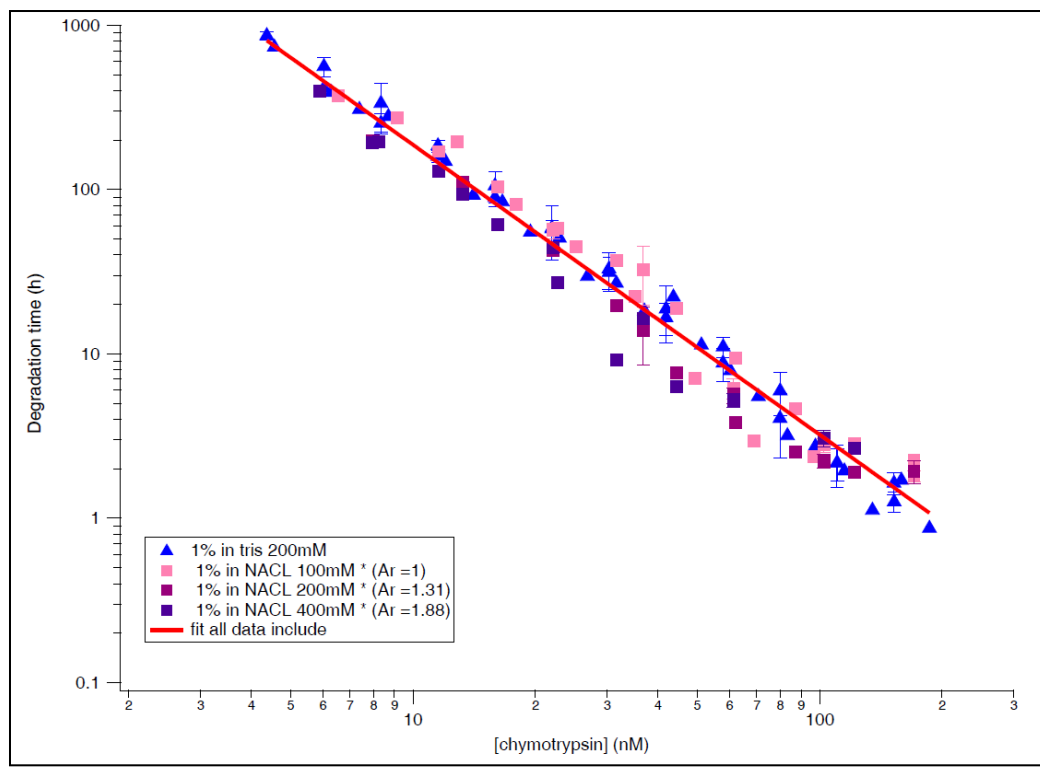


**Figure 72 : Effet de l'augmentation de la viscosité sur le comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine pour une concentration en gélatine de 10%.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration enzyme pour une fraction volumique de gel de 10% avec ou sans glycérol. La superposition des courbes tient exclusivement compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme en présence de glycérol.

Pour  $\phi_{\text{gel}}=7.5\%$  et  $\phi_{\text{gel}}=10\%$ , de la même manière que précédemment, la prise en compte de la différence d'activité permet de superposer les résultats avec et sans glycérol (Figures 71 et 72) et confirment que la présence de glycérol ne modifie pas la capacité de l'enzyme à diffuser.

L' $\alpha$ -chymotrypsine présente un mode de diffusion anormal dans un gel de gélatine à une concentration égale à 1% et la cinétique est limitée par la diffusion. Quand la valeur de  $1/\beta$  devient égale à 1,2 pour  $\phi_{\text{gel}}=5\%$ , nous avons observé une transition au niveau de la cinétique qui devient limitée par la réaction. La valeur attendue pour une diffusion brownienne serait de  $1/\beta=1$ . L'interprétation de cet exposant reste ouverte. L'enzyme doit se déplacer sur le réseau puisqu'elle est insensible au changement de la viscosité du solvant. Elle doit faiblement interagir avec des sites sur le réseau de gélatine pour la ralentir. Afin de comprendre le mode de diffusion de l'enzyme dans le gel, de nouvelles expériences vont être réalisées avec des conditions expérimentales pour lesquelles la force ionique sera modulée.





**Figure 73 : Effet de l'augmentation de la salinité sur le comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine pour une concentration en gélatine de 1%.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration en enzyme pour une fraction volumique de gel de 1% en TRIS 200mM ou en présence de tampon Hepes 20mM additionné de NaCl 100, 200 ou 400mM. La superposition des courbes tient compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme en présence des différentes concentrations de sel.

#### **4. Des interactions entre l'enzyme et le gel régissent-elles le changement de comportement diffusif de l'enzyme ?**

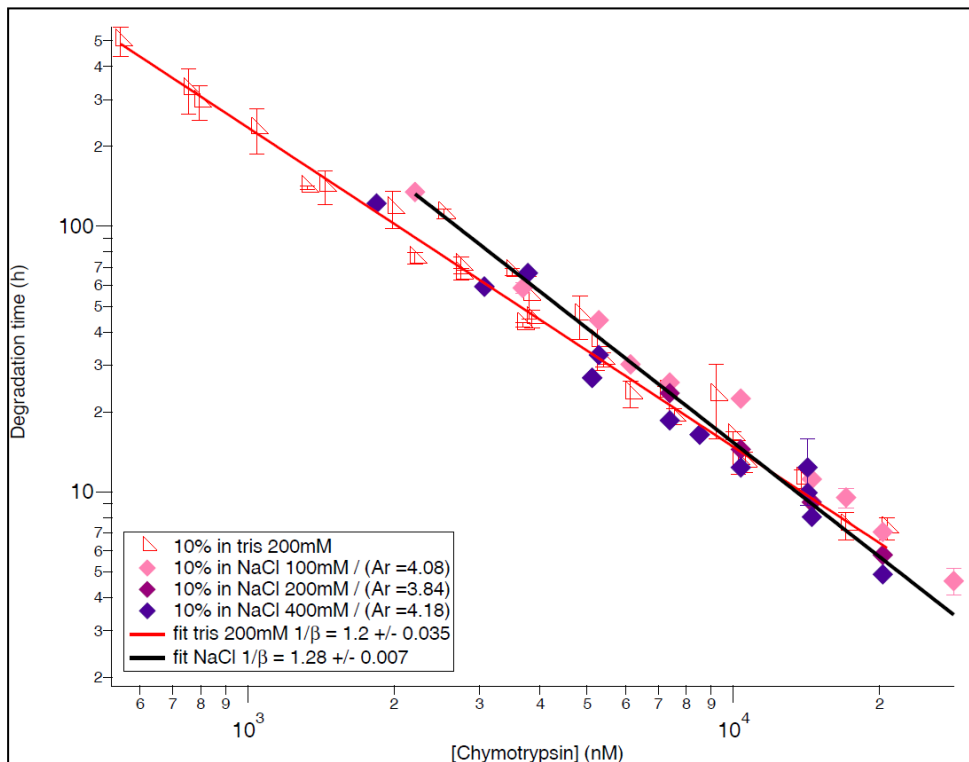
Nous avons étudié la possibilité que les interactions électrostatiques puissent influencer le mode de diffusion de l'enzyme. Afin de tester cette hypothèse, nous avons modifié la force ionique en changeant la concentration en sel dans la solution.

Nous avons donc augmenté la concentration en NaCl dans la solution afin de créer un écrantage des charges potentiellement responsables d'interactions attractives entre l'enzyme et le réseau de gélatine. Les tampons Hepes 20mM complétement en NaCl 100mM, 200mM, 400mM sont tamponnés à pH 7,4 tout comme le TRIS 200mM utilisé précédemment. A ce pH, l'enzyme est chargée positivement et la gélatine négativement. Les variations de l'activité enzymatique dues au changement de tampon ont été mesurées et prises en compte. Pour des gels de gélatine à 1%,  $1/\beta=1,81\pm 0,024$  en TRIS 200mM (Figure 73), et le changement de tampon entraîne une variation des  $t_c$  en fonction de la salinité du tampon. Ces différences sont dues essentiellement aux changements d'activité de l'enzyme (cf matériel et méthodes), nous n'observons pas de changement du comportement diffusif de l'  $\alpha$ -chymotrypsine. Ainsi, il est possible de superposer toutes les courbes et d'obtenir un exposant unique de 1,8.

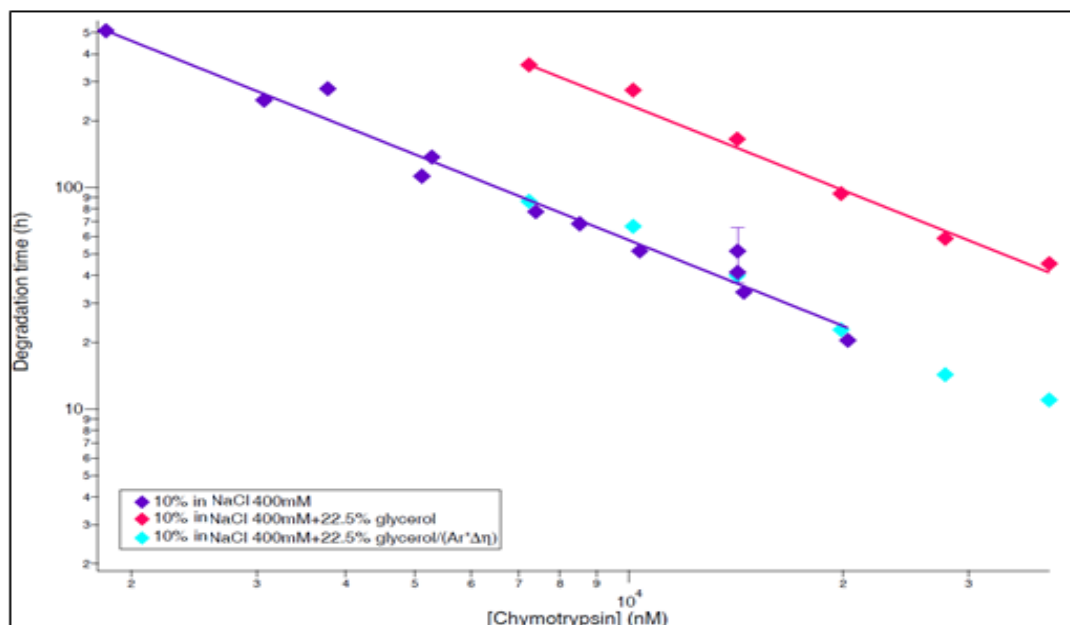
Nous pouvons supposer que les interactions qui régissent ce mode de diffusion de l'enzyme ne sont pas principalement électrostatiques.

tampon	longueur d'écran (nm)
Tris-Hcl 200mM	0,679
Hepes 20mM NaCl 100mM	0,961
Hepes 20mM NaCl 200mM	0,679
Hepes 20mM NaCl 400mM	0,48

Longueur d'écran ( $k^{-1}$ ) calculé avec la longueur de Bjerrum  $l_b=7.5 \text{ \AA}$  et  $I$ , la force ionique de la solution,  $k^{-1}=(4\pi l_b I)^{-1/2}$ .



**Figure 74 : Effet de l'augmentation de la salinité sur le comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine pour une concentration en gélatine de 10%.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration en enzyme pour une fraction volumique de gel de 10% en TRIS 200mM ou en présence de tampon Hepes 20mM additionné de NaCl 100, 200 ou 400mM. La superposition des courbes tient compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme en présence des différentes concentrations de sel.



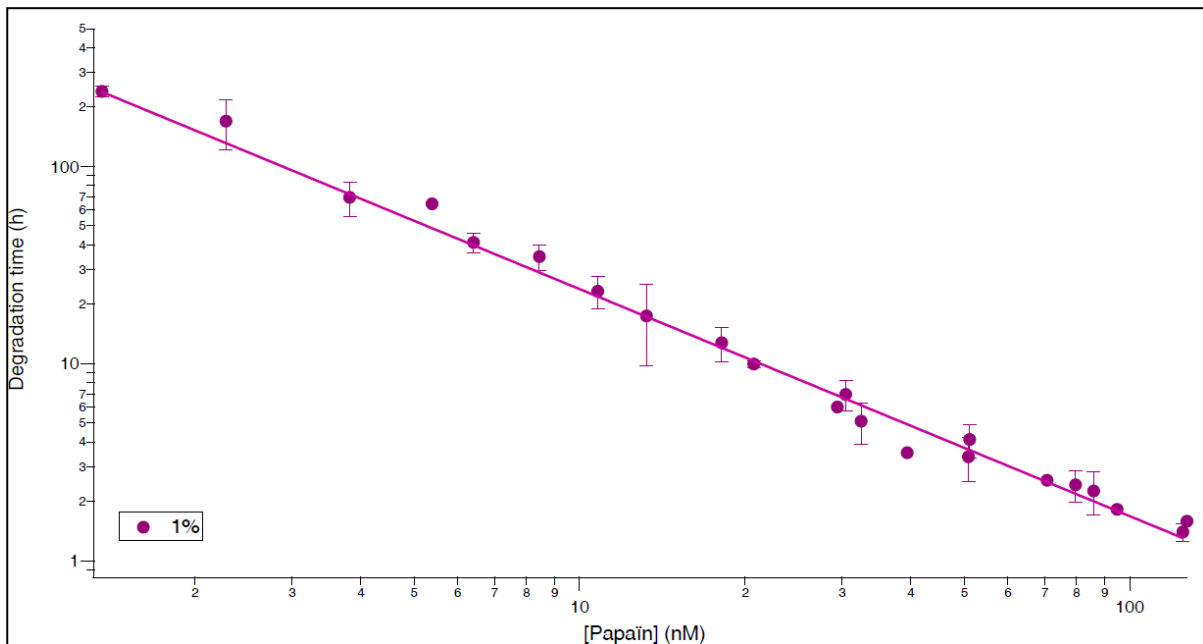
**Figure 75 : Augmentation de la viscosité sur le comportement de l' $\alpha$ -chymotrypsine dans un tampon à 400mM NaCl.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration en enzyme pour une fraction volumique de gel de 10% en présence de tampon Hepes 20mM NaCl 400mM en présence ou absence de glycérol. La superposition des courbes tient compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme et de la viscosité du milieu  $\Delta\eta$ .

A  $\phi_{\text{gel}} = 10\%$ , l'ajout de NaCl dans la solution, augmente l'exposant  $1/\beta$  (Figure 74).

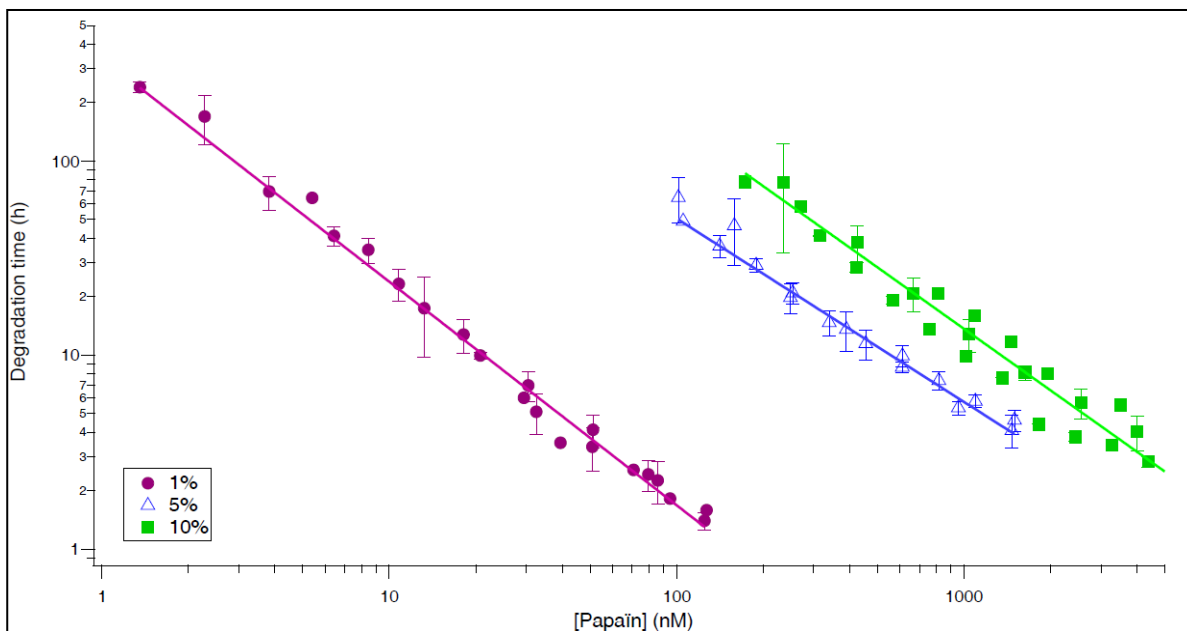
En tenant compte de la variabilité de l'activité dans tous les tampons, nous ne pouvons pas superposer l'ensemble des données pour des forces ioniques différentes. L'augmentation de l'exposant doit refléter des modifications des interactions électrostatiques entre l'enzyme et le gel et donc des modifications dans le mode de déplacement de l'enzyme sur le gel. En effet, lorsque  $1/\beta=1,2$ , le mode de diffusion de l'enzyme serait de type brownien ; or avec l'ajout de NaCl, donc une diminution de la longueur de Debye, l'exposant augmente avec  $1/\beta=1,28$  laissant supposer que l'enzyme ne se déplace plus sur le réseau exclusivement ; elle est donc sensible à viscosité du milieu. Afin de confirmer le changement de mode de diffusion passant d'une cinétique limitée par la réaction à une cinétique limitée par la diffusion nous avons augmenté la viscosité du milieu à 400mM NaCl.

Lorsque nous ajoutons 22,5% de glycérol en présence de 400mM de NaCl, nous observons un allongement des  $t_c$  (Figure 75).

Les courbes dans le même tampon avec et sans glycérol sont superposables s'il est tenu compte de la perte d'activité mais également du changement de viscosité. Ainsi, dans un tampon à 400mM de NaCl pour  $\phi_{\text{gel}}=10\%$ , l'enzyme ne se déplace pas uniquement sur le réseau de gélatine mais elle est en partie dans le solvant. Les interactions électrostatiques interviennent dans le mode de diffusion de l' $\alpha$ -chymotrypsine à  $\phi_{\text{gel}}=10\%$ .



**Figure 76 : Dégradation d'un gel de gélatine à 1% par la papaïne. L'exposant  $1/\beta$  est de  $1,15 \pm 0,02$ .**



**Figure 77 : Effet de l'augmentation de la fraction volumique de gel sur le mécanisme de la papaïne.**

A  $\phi_{\text{gel}}=1\%$  ,  $1/b=1,15 \pm 0,02$ .

A  $\phi_{\text{gel}}=5\%$  ,  $1/\beta=1,15 \pm 0,016$ .

A  $\phi_{\text{gel}}=10\%$  ,  $1/\beta=1,0526 \pm 0,059$ .

## **II. Etude de la papaïne**

La papaïne est une endopeptidase à large spectre tout comme la trypsine et la protéinase K. Cependant, elle appartient à une autre famille, les cystéines protéases et possède 1705 sites de coupures sur la gélatine, ce qui est largement supérieur au nombre de sites de coupures des autres enzymes étudiées jusqu'alors.

Tout comme l' $\alpha$ -chymotrypsine, nous avons étudié le mécanisme de dégradation de cette enzyme dans des gels de gélatine pour différentes fractions volumiques et la cinétique de la réaction en changeant la viscosité du milieu réactionnel.

### **1. Confirmation d'une diffusion Brownienne.**

Les temps de dégradations ( $t_c$ ) à 1% de gélatine ont été obtenus à des concentrations en papaïne variant entre 0.3nM et 43nM (Figure 76). Comme il a été précédemment démontré, l'exposant  $1/\beta$  est de  $1,15 \pm 0,02$  à cette concentration en gel. Cet exposant est inférieur à la borne basse ( $4/3$ ) prédite par modèle du « swiss-cheese ». Il est possible, comme pour l' $\alpha$ -chymotrypsine, que la diffusion de la papaïne se fasse le long du réseau de gélatine avec des sites collants de temps en temps.

Nous avons alors étudié l'influence de la concentration en gélatine sur le mécanisme de dégradation de la papaïne.

### **2. Influence de la fraction volumique de gel sur le mode de diffusion de la papaïne.**

Pour  $\phi_{gel}=5\%$ , l'augmentation de la fraction volumique permet d'observer un exposant  $1/\beta=1,15 \pm 0,016$  et à  $\phi_{gel}=10\%$ ,  $1/\beta=1,05 \pm 0,059$  (Figure 77).

Le temps de dégradation est trouvé inversement proportionnel à la concentration en enzyme pour  $\phi_{gel}=10\%$ , suggérant un mode de diffusion brownienne..

Afin de sonder si l'enzyme diffuse uniquement sur le réseau, ou sur le réseau et dans le solvant, nous avons étudié la dépendance des temps de dégradation en fonction de la viscosité du milieu.

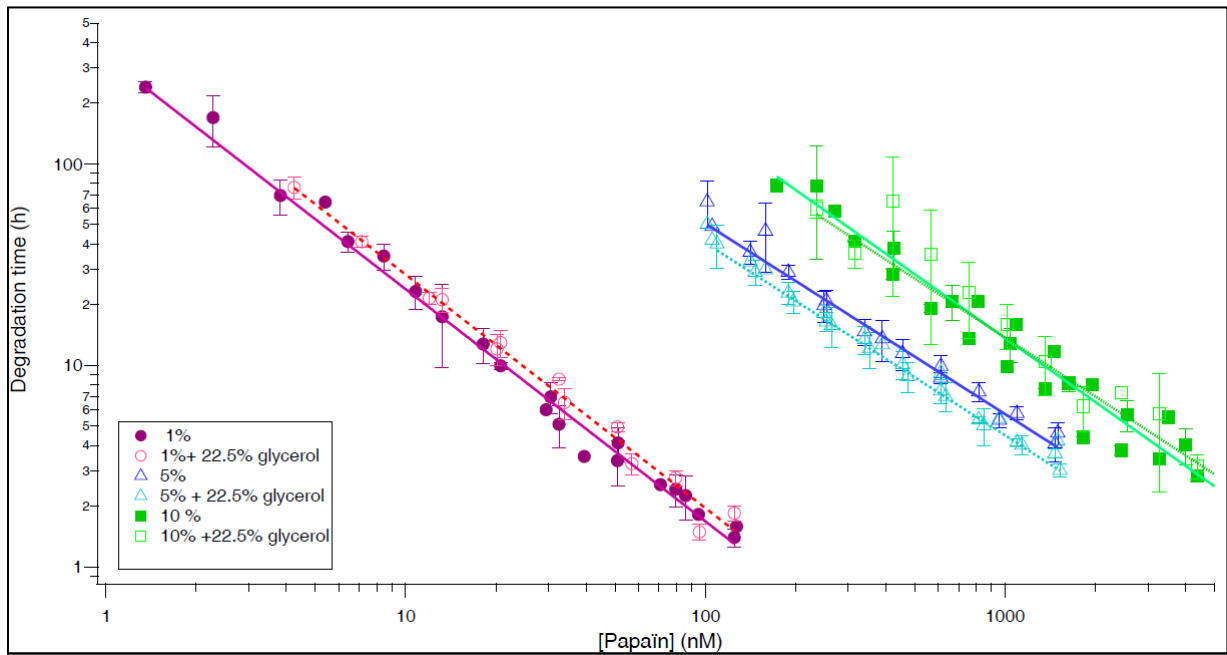


Figure 78 : Effet de l'augmentation de la fraction volumique de gel et de la viscosité du milieu sur la dégradation de gels de gélatine par la papaïne.

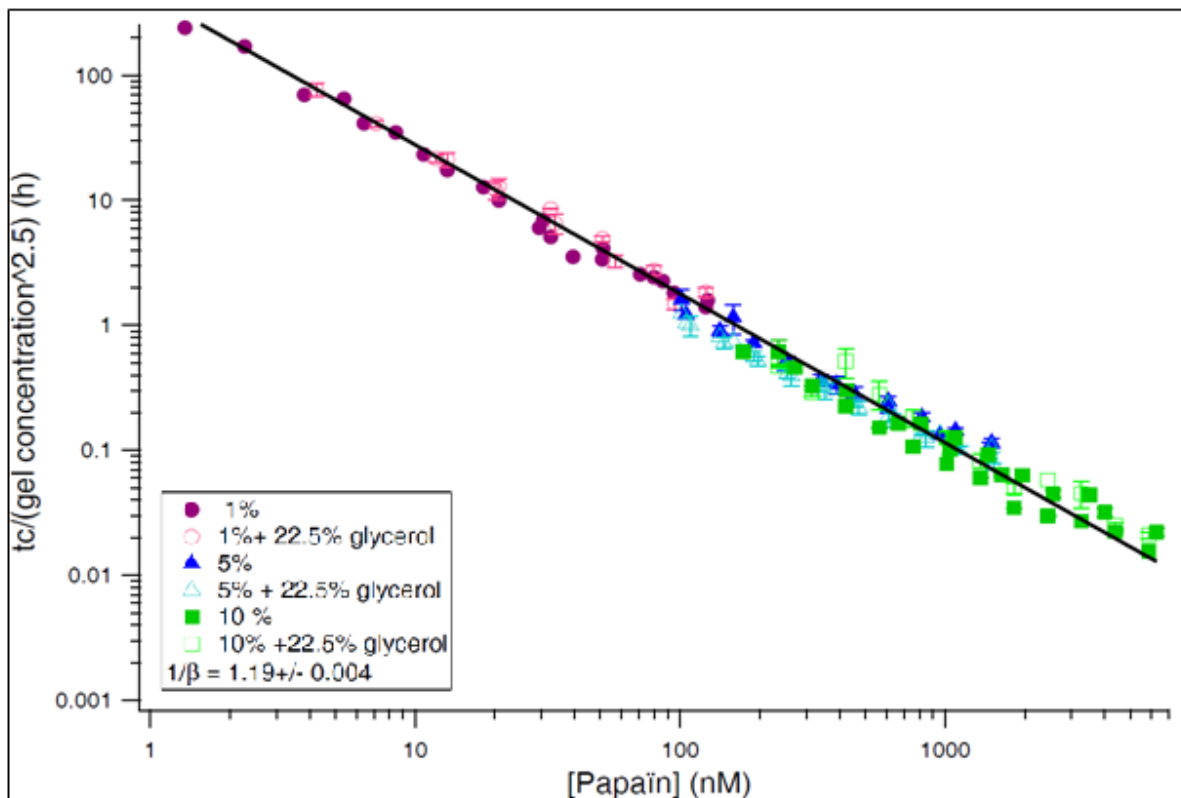


Figure 79 : Temps réduits de dégradation de gels de gélatine par la papaïne pour différents  $\phi_{\text{gel}}$  en présence ou en absence de glycérol.

### **3. Cinétique limitée par la réaction.**

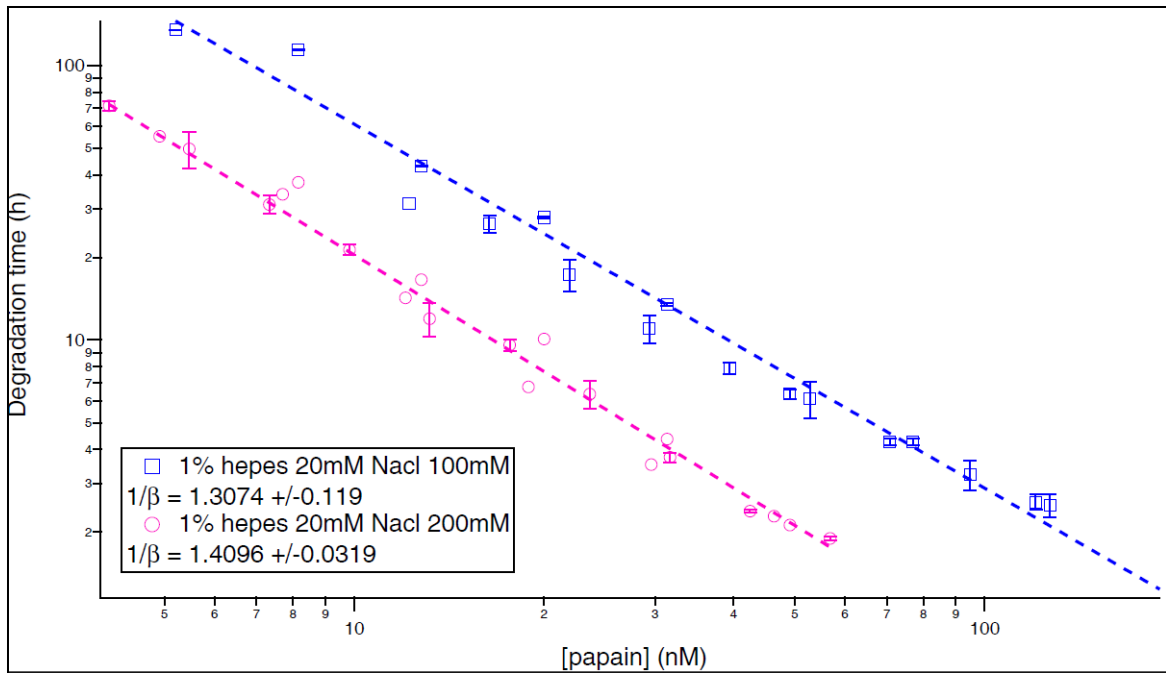
Comme démontré précédemment, en présence de glycérol (22,5%) pour  $\phi_{\text{gel}}=1\%$ , l'enzyme ne subit aucune perte d'activité et l'exposant déterminé expérimentalement,  $1/\beta$ , est de  $1^{\pm 0,048}$ . Dans ce cas, les courbes se superposent sans tenir compte d'une modification de l'activité de l'enzyme ni de la viscosité du milieu. Nous montrons également qu'en augmentant la concentration en gélatine, nous obtenons le même type de résultat. A  $\phi_{\text{gel}}=5\%$  et  $10\%$ , l'ajout de glycérol permet d'obtenir respectivement  $1/\beta=1\pm 0,04$  et  $1/\beta=1\pm 0,044$ . Les temps de dégradation se superposent sans modification (Figure 78).

Pour toutes les fractions volumiques de gélatine testées, l'enzyme ne subit aucune modification d'activité due à la présence de glycérol et est insensible à l'augmentation de la viscosité du milieu. La papaïne diffuse sur le réseau de gélatine et la cinétique est limitée par la réaction.

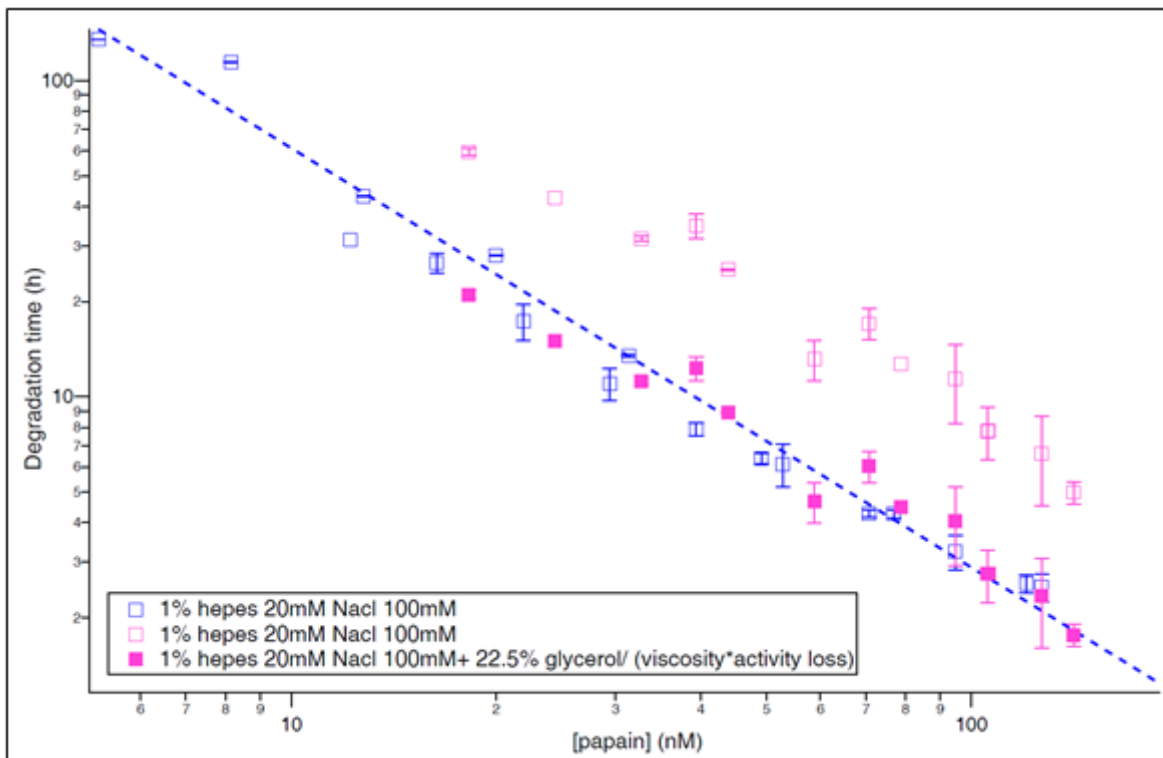
En tenant compte des différences d'activité de l'enzyme à chaque fraction volumique de gel, les courbes ont pu être superposées en présence et absence de glycérol, permettant d'établir un exposant unique de  $1.19^{\pm 0.004}$ . La cinétique de dégradation de gels de gélatine par la papaïne est donc limitée par la réaction à toutes les fractions volumiques de gel. La diffusion de l'enzyme est cependant ralentie, probablement à cause de l'existence de sites de collage de l'enzyme (Figure 79).

L'utilisation de NaCl nous permet de caractériser le type d'interaction qui régit la diffusion de la papaïne sur le réseau de gélatine.





**Figure 80 : Effet du changement de la force ionique sur les temps de dégradation de gels de gélatine à 1% par la papaïne.**



**Figure 81 : La cinétique de dégradation à  $\phi_{gel}=1\%$  par la papaïne en présence de 100mM de NaCl avec et sans glycérol est limitée par la diffusion.**

#### **4. Interactions entre l'enzyme et le gel.**

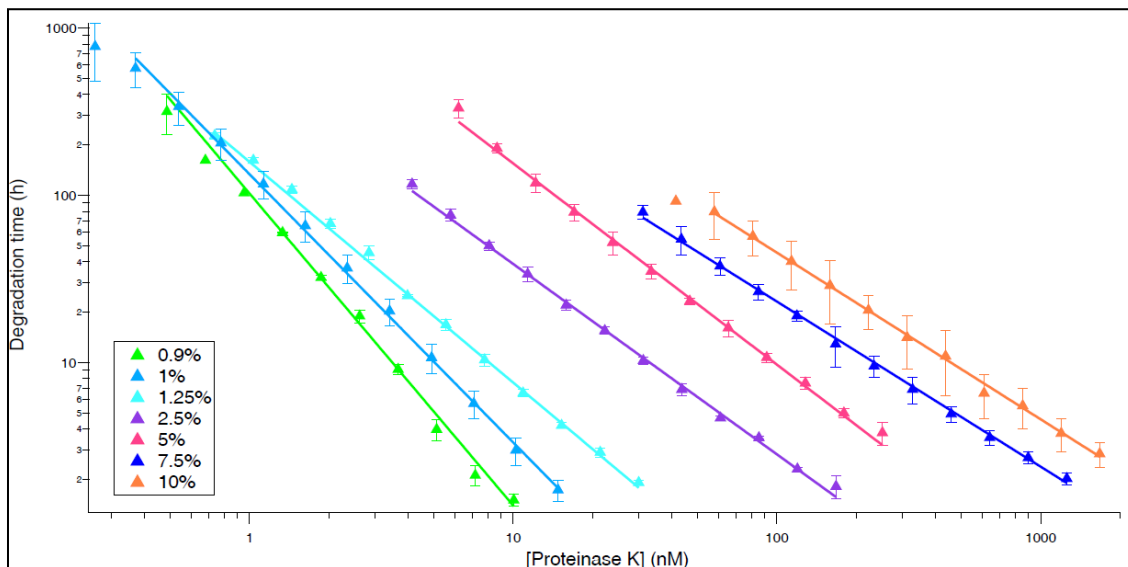
Lorsque la papaïne est mise en présence de tampon Hepes 20mM NaCl 100mM à  $\phi_{\text{gel}}=1\%$ , nous remarquons que  $1/\beta$  change ( $1/\beta=1,15$  en présence de TRIS 200mM) pour atteindre une valeur de  $1/\beta=1,3$ . En augmentant la salinité du tampon,  $1/\beta$  augmente également jusqu'à atteindre un exposant de 1,4 lorsque la concentration en NaCl atteint 200mM. (Figure 80)

La présence de sel permet-elle de changer le mécanisme de dégradation et la cinétique ?

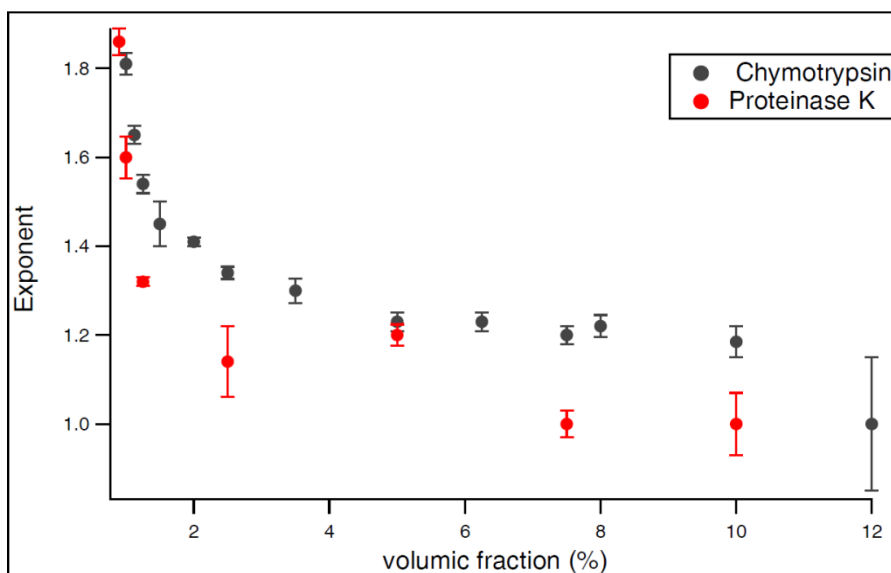
Pour vérifier cette hypothèse, la papaïne a été mise en présence de 22,5% de glycérol dans un tampon Hepes 20mM NaCl 100mM à une fraction volumique de gélatine de 1%. Dans ces conditions, l'enzyme perd de son activité et on observe un décalage des temps de dégradation vers des temps plus longs.  $1/\beta$  est alors égal à 1,24 (Figure 81).

En tenant compte de  $\Delta\eta$  et  $A_r$ , les courbes sont superposables. Ainsi, en présence de NaCl 100mM, le mécanisme de dégradation de gels de gélatine par la papaïne est sensible à la viscosité du milieu et la cinétique devient limitée par la diffusion.

Ainsi, en présence de Tris 200mM, la papaïne diffuse sur le gel et la cinétique est limitée par la réaction. En présence de sel, les interactions électrostatiques attractives, existant entre l'enzyme et le gel, sont écrantées, la diffusion devient anormale et la cinétique est limitée par la diffusion. A des concentrations en gélatine plus importantes, il nous a été impossible de moduler le mécanisme de dégradation de la gélatine par écrantage des charges électrostatiques.



**Figure 82 :** Effet de l'augmentation de la fraction volumique de gel sur le mécanisme de dégradation de la protéinase K. A une fraction volumique de 0,9% en gélatine l'exposant est de  $1,86 \pm 0,03$ . Il diminue jusqu'à atteindre un exposant de  $1 \pm 0,03$  à 7,5% de gélatine.



**Figure 83:** Effet de l'augmentation de la fraction volumique de gel sur le comportement de la protéinase K en comparaison de l' $\alpha$ -chymotrypsine.

### **III. Etude de la protéinase K**

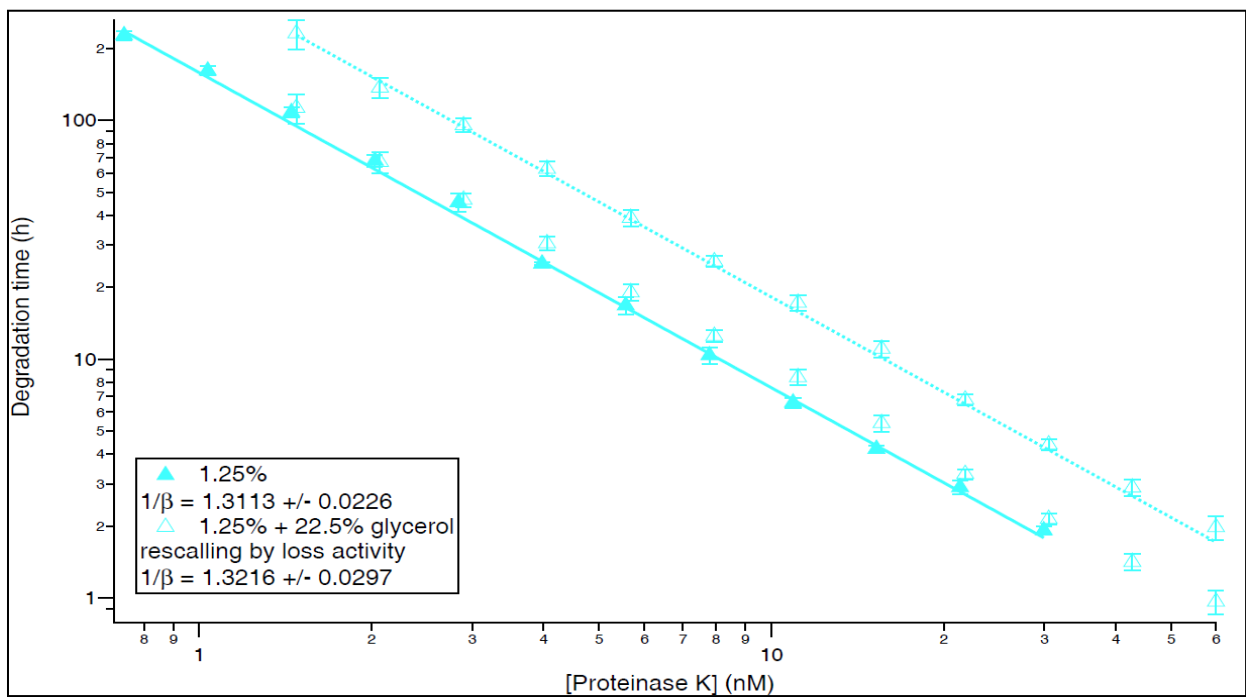
La protéinase K est une endopeptidase à large spectre appartenant à la famille des sérines protéases. Possédant 860 sites de coupures sur la gélatine (sans prendre en compte la conformation partielle en triple hélice de la gélatine gélifiée). Elle avait été choisie pour valider le modèle de continuum percolation établi pour la transition gel-sol catalysée par la thermolysine, en l'appliquant à une autre classe d'enzyme. En effet, les sérines protéases sont des enzymes importantes dans les processus physiologiques (réparation tissulaire...) mais également dans la dissémination cancéreuse.

#### **1. Un mécanisme de dégradation de la gélatine similaire à l' $\alpha$ -chymotrypsine**

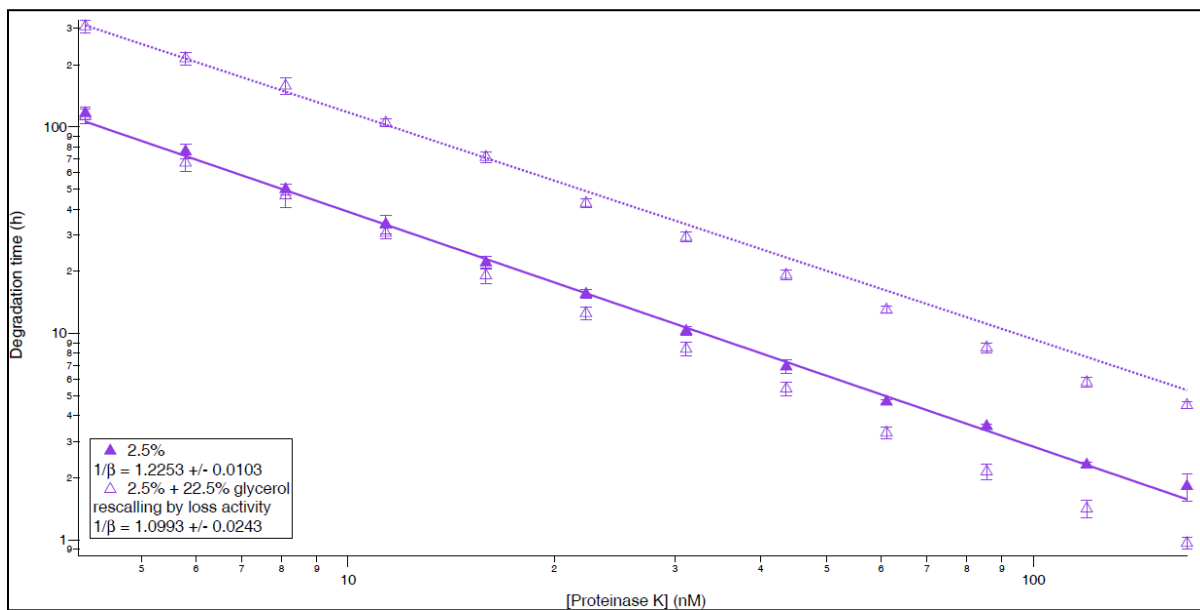
Nous représentons les temps de dégradation en fonction de la concentration en protéinase K ([Proteinase K]) pour des fractions volumiques de gel de 0,9% à 10%. A  $\phi_{gel}=0,9\%$ ,  $1/\beta=1,86\pm 0,03$ . Cet exposant est similaire à celui observé pour la dégradation de gels de gélatine à 1% par l' $\alpha$ -chymotrypsine. Ce résultat reflète un mécanisme de diffusion ralenti. Nous avons ensuite étudié l'influence du changement de concentration en gélatine sur le mécanisme de dégradation enzymatique (Figure 82).

Lorsque  $\phi_{gel}=1\%$ ,  $1/\beta$  décroît pour atteindre la valeur de  $1,6^{\pm 0,04}$ . Il continue à décroître jusqu'à atteindre  $1/\beta=1\pm 0,03$  à  $\phi_{gel}=7,5\%$ .  $1/\beta$  se maintient alors à cette valeur à  $\phi_{gel}=10\%$  ( $1/\beta=1\pm 0,07$ ). Lorsque les exposants sont représentés en fonction de la concentration en gélatine pour l' $\alpha$ -chymotrypsine et la protéinase K, nous observons un changement de comportement similaire entre les deux enzymes (Figure 83).

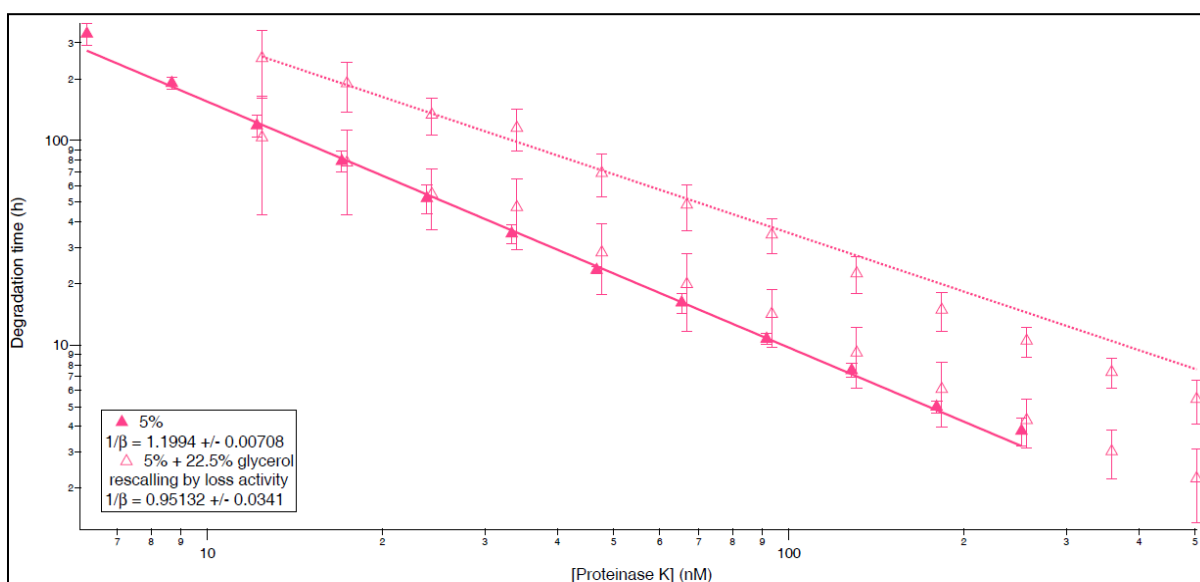
La transition d'exposant  $1/\beta$  semble se faire sur des variations de  $\phi_{gel}$  plus faibles pour la protéinase K que pour l' $\alpha$ -chymotrypsine. Cette variation de  $1/\beta$  est significative d'un changement du mécanisme de dégradation pour l' $\alpha$ -chymotrypsine. En effet, à de faibles concentrations en gélatine ( $\phi_{gel}=1\%$ ), l' $\alpha$ -chymotrypsine à un mécanisme de dégradation associé à une diffusion anormale et la cinétique est limitée par la diffusion ( $1/\beta=1,8$ ), l'enzyme passe une partie de son temps dans le solvant, puis à  $\phi_{gel}=10\%$ , l'enzyme diffuse uniquement sur le gel et la cinétique est limitée par la réaction ( $1/\beta=1,2$ ). Ce changement est-il vrai pour la protéinase K et valide-t-il un mécanisme général de la dégradation enzymatique de gels de protéine?



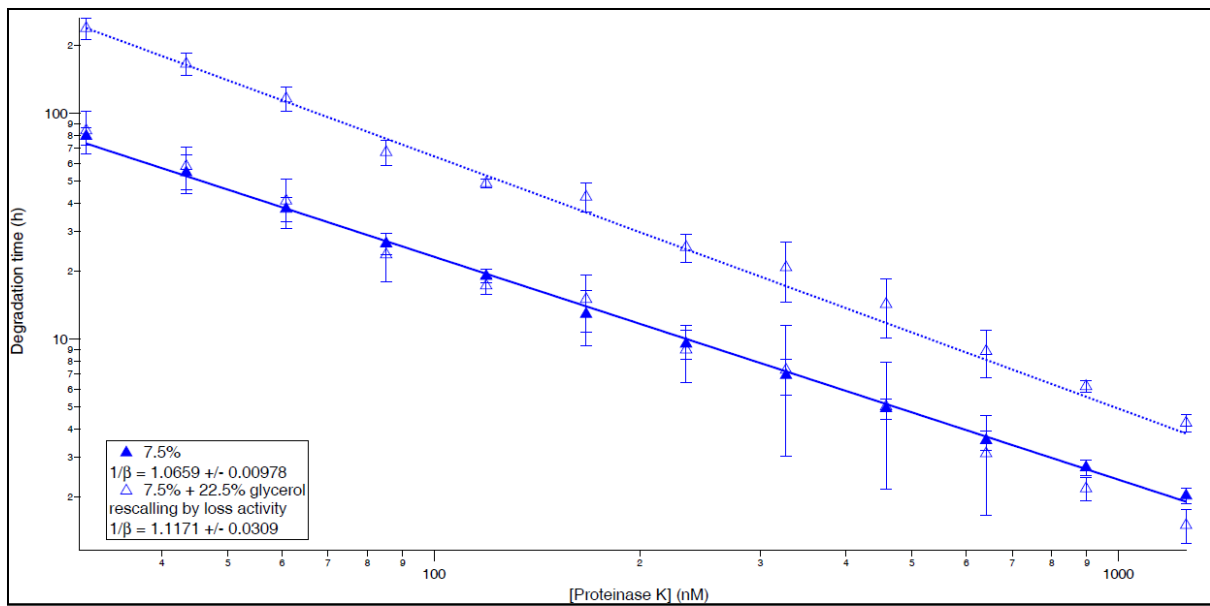
**Figure 84 : Effet de l'augmentation de la viscosité sur le comportement de la protéinase K pour une concentration en gélatine de 1,25%.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration enzyme pour une fraction volumique de gel de 1,25% avec ou sans glycérol. La superposition des courbes tient exclusivement compte de l'activité relative (Ar) de l'enzyme en présence de glycérol.



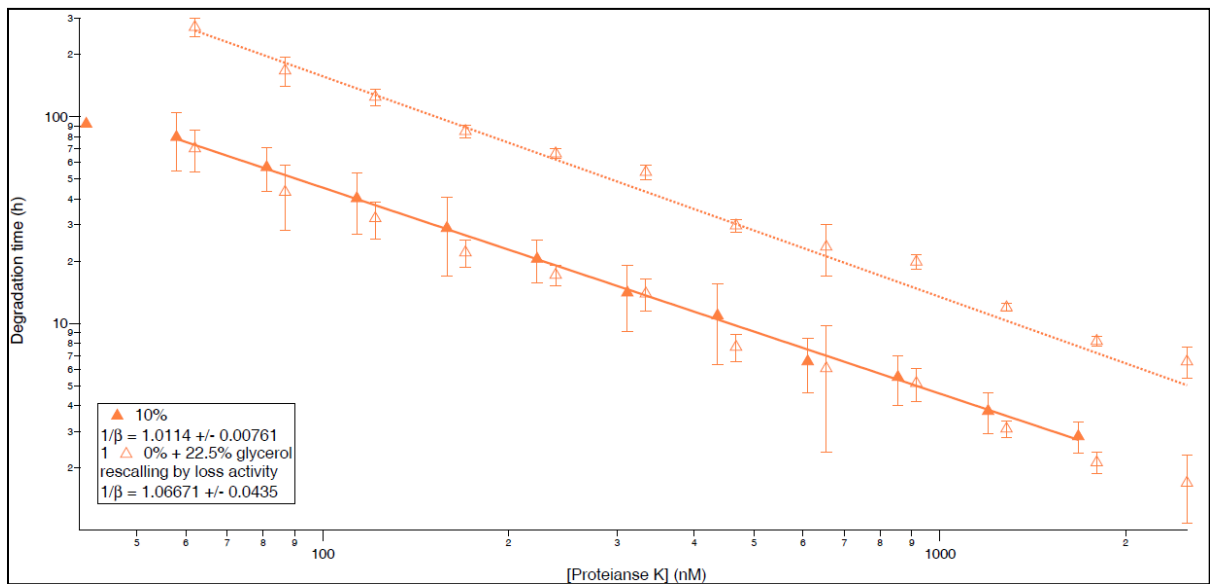
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figure 85 : Effet de l'augmentation de la viscosité sur le comportement de la protéinase K pour diverses concentrations en gélatine.** Temps de dégradation de la gélatine en fonction de la concentration en enzyme pour une fraction volumique de gel de 2,5% (A), 5% (B), 7,5% (C), 10% (D) avec ou sans glycérol. La superposition des courbes tient exclusivement compte de l'activité relative ( $A_r$ ) de l'enzyme en présence de glycérol.

## **2. Sensibilité de la protéinase K au milieu.**

Nous avons étudié la dépendance des temps de dégradation dans un milieu plus visqueux ( $\Delta\eta=2.03$ ) pour différentes fractions volumiques de gel. A  $\phi_{\text{gel}}=1.25\%$  l'ajout de glycérol permet d'observer un décalage des  $t_c$  vers des temps plus longs. Lorsqu'il est tenu compte de la perte d'activité de l'enzyme, les courbes avec et sans glycérol se superposent. La protéinase K a donc une cinétique limitée par la réaction (Figure 84).

A  $\phi_{\text{gel}} = 2,5\%, 5\%, 7,5\%$  et  $10\%$ , le même phénomène est observé (Figure 85).

Les temps de dégradation sont superposables uniquement en tenant compte de la perte d'activité enzymatique due à la présence de glycérol et sans tenir compte de la différence de viscosité du milieu.

Dans l'article en préparation de Breton et al, la cinétique de dégradation de la gélatine à  $1\%$  en présence de glycérol est testée pour la protéinase K. Il est alors montré que, dans ces conditions, l'enzyme a une cinétique limitée par la diffusion. Afin de caractériser le type d'interactions qui régissent le mécanisme de dégradation et la cinétique limitée par la réaction de la protéinase K, le changement du tampon Tris  $200\text{mM}$  pour un tampon salin a été testé. Il nous a été impossible de changer le mécanisme de dégradation de cette enzyme à  $2,5\%$  et  $7,5\%$  de gélatine (données non montrées). Soit les interactions entre le gel et la protéinase K ne sont pas électrostatiques soit elles sont bien trop importantes pour être écrantées.



<b>Enzyme</b>	<b>Poids moléculaire (Da)</b>	<b>Diamètre hydrodynamique (nm)</b>
Thermolysine	34600	8,79±0,5
Trypsine	23300	8,90±0,5
α-Chymotrypsine	25000	6,07±0,03
Papaïne	23406	7,49±0,2
Protéinase K	28930	8,88±0,09

**Figure 86 : Détermination des diamètres hydrodynamiques des protéases.**

#### **IV. Existe-t-il des interactions stériques ou électrostatiques responsables de ces mécanismes de dégradation ?**

Nous avons déterminé le diamètre des différentes enzymes pour le comparer à la taille de la maille des gels de gélatine afin de discuter le changement de mécanisme de l' $\alpha$ -chymotrypsine et de la protéinase K, ainsi que le comportement brownien de la papaine qui pourrait être dû à un effet d'encombrement stérique. En effet, quand les diamètres hydrodynamiques des enzymes sont supérieurs ou égaux à la taille de la maille, il devient presque impossible pour l'enzyme de se déplacer dans le milieu. Les différentes enzymes qui ont été étudiées dans notre laboratoire ont des poids moléculaires compris entre 23,3kDa et 34,6kDa respectivement pour la trypsine et la thermolysine. Par mesure à l'aide du zetasizer (cf matériel et méthodes) en Tris 200mM, nous avons pu déterminer les diamètres hydrodynamiques de nos protéines. La thermolysine a un diamètre hydrodynamique de  $8,8 \pm 0,5$  nm, cette valeur est similaire à celui de la protéinase K  $8,9 \pm 0,09$  nm (Figure 86).

Les diamètres des divers enzymes sont compris entre  $6,07 \pm 0,03$  nm et  $8,9 \pm 0,5$  nm. Avec des variations de taille aussi faibles devant la taille de la maille (70 nm, 62,2 nm et 56 nm à 1%, 1,125% et 1,25% de gélatine respectivement), les différences de diamètre hydrodynamique des protéases ne permettent pas d'expliquer les changements des valeurs d'exposants qui relient le temps de dégradation et la concentration en enzyme et en particulier la différence observée pour la protéinase K et l' $\alpha$ -chymotrypsine.

Nous avons pu observer expérimentalement l'implication des interactions électrostatiques dans le mécanisme de diffusion lorsque l'enzyme se déplace sur le réseau puisque l'écrantage des charges de surface des protéines (gel et protéases) permet de moduler le comportement de l'enzyme.

<b>Enzyme</b>	<b>mobilité électrophorétique (<math>\mu\text{mcmvolt/seconde}</math>)</b>	<b>Potentiel zeta (mV)</b>
Thermolysine	-0,15	-1,908
Trypsine	+ 0,25	+ 3,18
$\alpha$ -Chymotrypsine	+ 0,11	+ 1,3
Papaïne	+ 1,47	+ 18,8
Protéinase K	+ 0,08	+ 1,018

**Figure 87 : Détermination des potentiels zêta par la mobilité électrophorétique des protéases.**

Les interactions électrostatiques générées par les charges de surface des protéines semblent être à l'origine du passage d'une diffusion de l'enzyme le long du réseau de gélatine à une diffusion dans le solvant. Les interactions de charges les plus fortes doivent correspondre aux enzymes qui entrent en interaction avec le réseau pour les plus faibles concentrations en gélatine. Sachant que le réseau de gélatine B est globalement chargé négativement dans nos conditions expérimentales (différence de charges acides aminées = -98), nous avons donc déterminé les charges de surface pour chacune des protéases étudiées, afin d'évaluer le lien possible entre les charges de surface des protéases et les interactions avec la gélatine, et le déplacement d'une enzyme le long du réseau.

Dans nos conditions expérimentales (Tris 200mM pH=7.4), la gélatine est globalement chargée négativement. A partir des points isoélectriques (pHi) des protéases, nous avons pu déterminer que la seule des enzymes testées qui était chargée négativement est la thermolysine, les autres étant chargées positivement. Afin d'estimer plus précisément les charges de surface de chacune d'entre elles, des mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées (cf matériel et méthodes).

D'après ces mesures préliminaires (Figure 87), la seule enzyme chargée négativement est bien la thermolysine, et l'enzyme avec la plus grande charge de surface positive est la papaïne. La papaïne est la seule de toutes les enzymes que nous avons étudié pour laquelle la réaction de dégradation de 1% à 10% de gélatine correspond à une diffusion brownienne et limitée par la réaction. Elle maintiendrait un contact avec le réseau par interactions électrostatiques attractives entre la surface de charges positives et les charges négatives de la gélatine. L' $\alpha$ -chymotrypsine et la protéinase K ont des modes de dégradation du réseau de gélatine similaires et des charges de surface très proches et faiblement positives. Leur capacité à interagir avec le réseau via leurs charges de surface est donc plus faible que la papaïne. La thermolysine, seule enzyme chargée négativement et également la seule qui, entre 1 et 10% de gélatine, n'a jamais montré de cinétique de dégradation limitée par la réaction. Le réseau est chargé négativement empêchant ainsi l'enzyme d'interagir avec celui-ci.



## DISCUSSION DE LA PREMIÈRE PARTIE

Les résultats obtenus avant ma thèse (Lairez et al 2007, Fadda et al 2003) sur la solubilisation enzymatique de gels de gélatine par la thermolysine ont montré, un mécanisme de dégradation dépendant de la diffusion, qui s'explique par une diffusion anormale de l'enzyme. Ainsi, les temps de dégradation diminuent en loi de puissance de la concentration en enzymes. Il a été proposé une diffusion ralentie dans les gels pour laquelle l'enzyme visitait des sites déjà explorés avec une plus grande probabilité que de visiter des sites vierges conduisant à un exposant  $1/\beta$  pouvant être compris entre  $4/3$  et  $5/3$ . Il a été observé expérimentalement  $1/\beta=1.46\pm 0.07$  dans ce cas, la cinétique est limitée par la diffusion, et la diffusion de l'enzyme ne dépendait pas de la fraction volumique en gel. Ce résultat avait été confirmé pour la protéinase K et la trypsine à 1% de gélatine. A cette même fraction volumique, la papaine et la chymotrypsine donnent des dépendances différentes des temps de dégradation associée à la diffusion en fonction de la concentration en enzyme, montrant un mécanisme de dégradation respectivement anormal limité par la diffusion pour l' $\alpha$ -chymotrypsine et brownien limité par la réaction pour la papaine (Breton et al, en préparation).

Dans le cadre de ma thèse nous avons tenté de comprendre les mécanismes pouvant expliquer de telles différences mais plus généralement la cinétique de dégradation de gels de protéines.

En particulier, nous avons confirmé qu'avec l' $\alpha$ -chymotrypsine, à une fraction volumique de gels (1%) l'exposant trouvé,  $1/\beta=1,8\pm 0.024$ , est au-dessus de la limite supérieure ( $5/3$ ) décrite dans le modèle du « Swiss cheese ». Cet exposant reflète une diffusion plus ralentie de l' $\alpha$ -chymotrypsine par rapport à la thermolysine. L'hypothèse qui pourrait expliquer ce mode de diffusion est que l'enzyme resterait immobilisée soit sur un site de coupure soit sur un autre site du réseau de gélatine durant la réaction de dégradation. Dans le cas de l' $\alpha$ -chymotrypsine, ce temps serait non négligeable (supérieur au temps d'hydrolyse) et ralentirait donc la diffusion de l'enzyme entre deux sites de coupure. Le temps de dégradation est dépendant de la viscosité du milieu donc elle ne peut pas être seulement sur le réseau mais doit nécessairement sauter, passer dans le solvant pour aller d'un site à l'autre pour se déplacer. Le temps de résidence de l'enzyme sur les sites à hydrolyser qui ralentit fortement sa diffusion n'est pas dû à des interactions de types électrostatiques entre la gélatine et l'enzyme puisque l'écrantage des charges ne modifie pas son comportement.

gélatine %	taille de la maille nm
1	70
1,125	62,2
1,25	56
1,5	46,6
2	35
2,5	28
5	14
6,25	11,2
7,5	9,3
8	8,75
10	7

**Figure 88 : taille de la maille de gélatine** calculée avec  $\xi_0 = a\phi_{gel}^{-1}$  avec  $a=0.7$  nm (taille d'un monomère (Lairez et al 2003)) et  $\nu_f=1/2$ .  $\xi_0 = a\phi_{gel}^{-\nu_f/3\nu_f-1}$   $\nu_f$ , l'exposant de Flory. La gélatine à haute température se comporte en chaîne de polymère gonflé,  $\nu_f=3/5$ . A faible température, la gélification est due à la formation de triples hélices partielles entre chaînes,  $\nu_f=1$ . Les triples hélices impliquent 50% des chaînes de polymère. Le gel peut alors être assimilé à des tiges rigides fines reliées par des bobines aléatoires,  $\nu_f=1/2$ . (Lairez et al 2007)

Si les charges de surface de l'enzyme ne sont pas responsables de la diffusion anormale ralentie, à 1% de gélatine, les interactions existantes entre l'enzyme et le réseau sont probablement hydrophobes. L'augmentation de la température de la réaction pourrait limiter ces interactions tout comme l'utilisation de détergents. L'augmentation de température modifierait l'activité enzymatique. L'utilisation de détergents permettrait de conserver les mêmes conditions expérimentales tout en mettant en évidence la présence d'interactions hydrophobes (en travaillant en dessous de la concentration micellaire critique).

Les changements de l'exposant, qui relie les temps de dégradation en fonction de la concentration en enzyme, pour différentes fractions volumiques en gel de gélatine, indiquent un changement du mécanisme de diffusion. Il est influencé par de très faibles variations de la concentration en gélatine alors que la variation estimée de la taille de la maille est faible, de 70nm à  $\phi_{gel}=1\%$  et de 62nm à  $\phi_{gel}=1,125\%$  (Figure 88).

L' $\alpha$ -chymotrypsine possède un diamètre hydrodynamique, de  $6,1 \pm 0,15$  nm, inférieur à la taille de la maille. Ce changement d'exposant ne reflète donc pas un effet d'encombrement stérique de l'enzyme dans la maille du gel.

A partir de 5% de gélatine, les temps de dégradation ne dépendent plus de la viscosité du milieu. Pour 12% en gélatine, la dépendance pour les temps de dégradation en fonction de la concentration en enzyme,  $1/\beta=1\pm 0,15$ , montrent de façon indirecte un mode de diffusion brownien.

L'enzyme doit se déplacer de sites de coupure en sites de coupure en glissant le long du réseau de gélatine. Cependant quand l'exposant n'atteint pas encore la valeur  $1/\beta=1$ ; il est impossible d'affirmer qu'il s'agit d'un mouvement brownien. Cependant, la cinétique est limitée par la réaction lorsque l'exposant varie de 1,2 à 1.

Il est possible que l'enzyme se déplace sur le réseau avec parfois des sites peu collants l'empêchant d'avancer.

Si les sites responsables de ce ralentissement sont impliqués dans la formation du gel, nœuds de réticulation, l'augmentation de gélatine, permettant d'augmenter le nombre de nœuds et le rétrécissement de la taille de la maille, diminue le nombre de ces sites pouvant être perçus par l'enzyme. Ainsi la diminution du nombre de sites collants permettrait à l'enzyme de ne plus avoir une diffusion anormale, ralentie, mais une diffusion brownienne.





L'étude de la solubilisation de gels de gélatine à 1% par la protéinase K montre que la dégradation suit le modèle du « Swiss-Cheese ». En effet, nous confirmons que l'exposant  $1/\beta$  à cette fraction volumique de gel est de  $1,6 \pm 0,04$ , et qu'il est compris dans les bornes prédites par ce modèle. Cependant lorsque nous varions les concentrations en gélatine, la protéinase K a montré un comportement similaire à celui de l' $\alpha$ -chymotrypsine. Pour de faibles variations de la taille de la maille entre  $\phi_{\text{gel}} = 1\%$  et à  $\phi_{\text{gel}} = 1,25\%$ , soit entre 70nm et 56nm,  $1/\beta$  varie de  $1,6 \pm 0,04$  à  $1,32 \pm 0,01$ . Cette variation reflète un changement de mécanisme de diffusion puisque la cinétique qui était limitée par la diffusion à 1% de gélatine, devient limitée par la réaction à 1,25% de gélatine. De plus, lorsque la concentration en gélatine diminue pour atteindre 0,9% l'exposant de la protéinase K est équivalent à celui de la chymotrypsine à 1% de gélatine. La variation de l'exposant de la protéinase K atteint  $1/\beta=1$  pour une fraction volumique de gel de 7,5%. Les mêmes hypothèses concernant l'explication du mécanisme de dégradation de l' $\alpha$ -chymotrypsine et les changements observés sont alors applicables au comportement de la protéinase K. Lors de son déplacement l'enzyme rencontre de nombreux sites collants, la ralentissant dans sa cinétique de dégradation du gel à faible concentration.

L'étude de la dégradation de gels de protéine à différentes concentrations par la papaïne a mis en évidence un mécanisme différent. Les temps de dégradation sont globalement inversement proportionnels à la concentration en enzyme. Avec cette enzyme, la cinétique de dégradation de gels n'est toujours limitée que par la réaction. Ces données impliquent un glissement libre de l'enzyme le long du réseau de gélatine, compatible avec un récent modèle présenté par Chatterjee 2000. Ainsi, l'enzyme n'est plus sensible à la viscosité du milieu qui l'entoure. Elle se déplace sur le réseau de gélatine avec des interactions suffisamment faibles pour ne pas coller. Tout comme pour l' $\alpha$ -chymotrypsine, ce comportement ne peut pas être expliqué par des effets stériques poussant l'enzyme à interagir avec le réseau puisque cette dernière est petite devant la taille de la maille à 1% et que le mécanisme de dégradation de gels de protéine par la papaïne est identique peu importe la fraction volumique de gel.

Les mécanismes différents observés pour ces trois protéases et comparés à ceux de la thermolysine et de la trypsine ne peuvent pas être expliqués par des effets d'encombrement stérique. Les diamètres hydrodynamiques de toutes les protéases sont compris entre  $6,07 \pm 0,03$  nm pour la plus petite et  $8,9 \pm 0,5$  nm pour la plus grande. La thermolysine, la trypsine et la

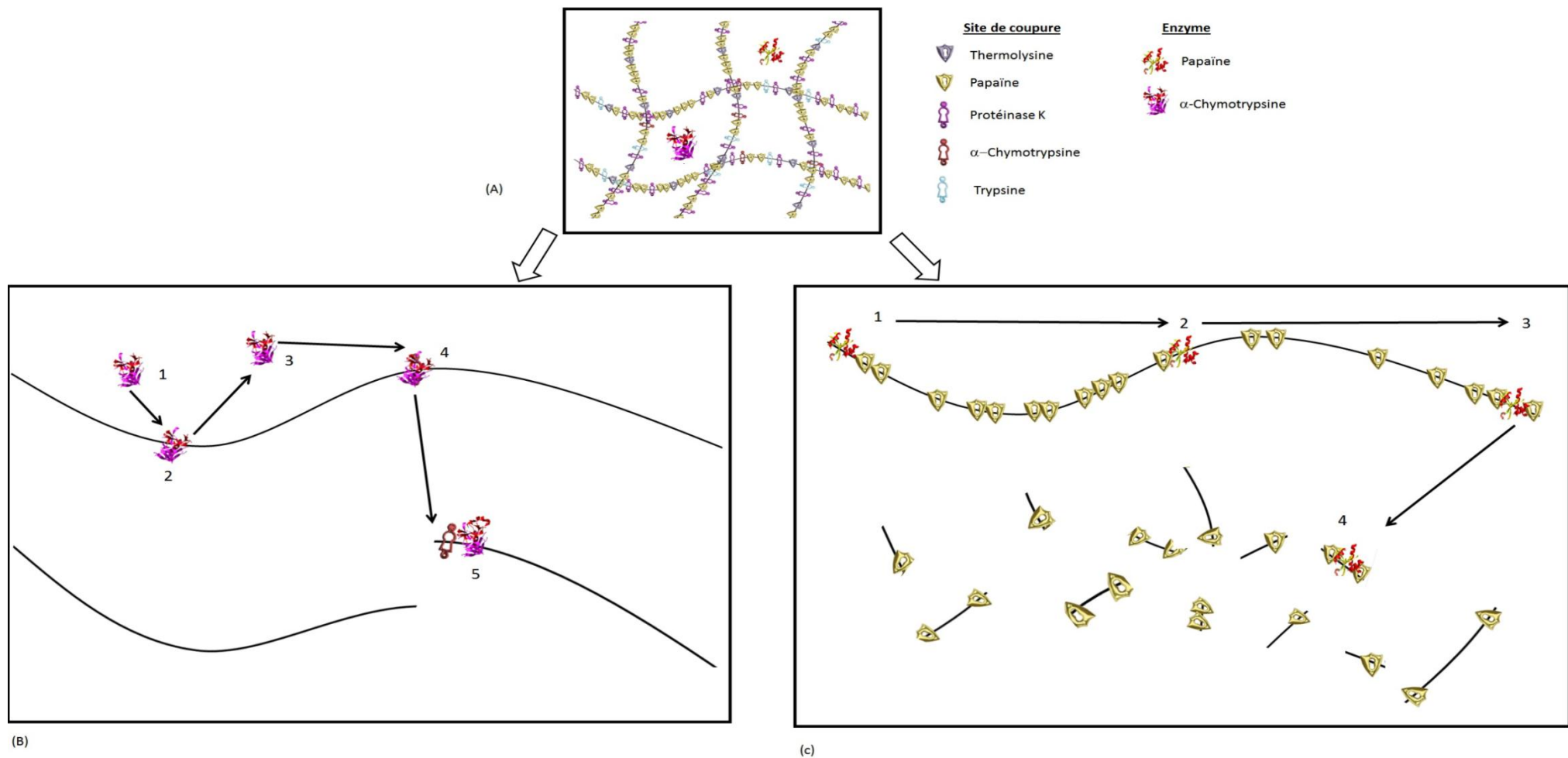


protéinase K ont des diamètres hydrodynamiques très similaires, mais les variations d'exposant de la thermolysine et de la protéinase K en fonction de la variation de la fraction volumique en gel sont différentes. En effet, la thermolysine a un exposant stable compris entre  $4/3$  et  $5/3$  à toutes les fractions volumiques de gel alors que la protéinase K montre un exposant qui varie entre  $1,86 \pm 0,03$  et  $1 \pm 0,07$  lorsque la fraction volumique en gel varie de 0,9% à 10%.

En revanche, lorsque nous comparons les charges de surface des diverses enzymes, nous pouvons observer que la seule enzyme chargée négativement est également la seule à maintenir un exposant différent de 1 lorsque  $\phi_{\text{gel}}$  varie de 1% à 10%. L'existence de charges négatives à la surface de la thermolysine, pourrait entraîner de la répulsion entre l'enzyme et le gel. En revanche l'enzyme dont la surface est la plus fortement chargée positivement est la papaïne. Avec un potentiel zêta de +18,8mV, elle est environ 15 fois plus chargée positivement que la protéinase K et l' $\alpha$ -chymotrypsine. Cette forte charge nette positive pourrait être à l'origine des interactions électrostatiques attractives qui permettraient à la papaïne d'avoir un mécanisme de diffusion brownienne dont la cinétique est limitée par la réaction. La protéinase K et l' $\alpha$ -chymotrypsine ont des charges de surfaces équivalentes et faiblement positives. Les similitudes de leur comportement en présence de différents pourcentages de gélatine dans les gels et la similitude de leurs potentiels zêta, indiquent que leurs charges de surface doivent être à l'origine des interactions avec le réseau. Bien que ses résultats soient préliminaires, les charges de surfaces pourraient expliquer qu'il existe trois catégories d'enzymes.

La première catégorie, chargée négativement, ne peut pas entrer en interaction avec le réseau à cause des forces de répulsion qui existent entre eux. Le mécanisme de dégradation des gels sera lié à la diffusion anormale et à une cinétique limitée par la diffusion puisque l'enzyme sera contrainte de se déplacer dans le solvant pas uniquement sur le réseau.

Dans la seconde catégorie, les enzymes sont faiblement chargées positivement. À de faibles concentrations en gélatine, lorsque la maille du réseau est la plus grande, ces enzymes ont également un comportement anormal pour lequel la diffusion de l'enzyme est ralentie en raison des interactions entre le réseau de gélatine et l'enzyme sur des sites de « collage » du gel. La cinétique de dégradation est limitée par la diffusion. Lorsque la taille de la maille diminue les enzymes entrent d'avantage en interaction avec le réseau et la diminution



**Figure 89 : Représentation schématique des modes de dégradation de la chymotrypsine et de la papaïne à une concentration en gélatine de 1%.** (A) : Schéma d'un maillage de gélatine dans lequel se trouve une molécule de papaïne ou une molécule de chymotrypsine. (B) Dégradation d'une chaîne de gélatine par la chymotrypsine. 1 : l' $\alpha$ -chymotrypsine est en diffusion dans le milieu. 2 : Elle entre en interaction avec un site de collage sur la gélatine (ici l'hypothèse est que ce site soit différent du site d'hydrolyse). 3 : L'enzyme se détache du site de collage. 4 : Elle reconnaît son site d'hydrolyse. 5 : L' $\alpha$ -chymotrypsine dégrade la chaîne de gélatine sur une des 94 sites. (C) Dégradation d'une chaîne de gélatine par la papaïne. 1 : L'enzyme entre en interaction avec la gélatine. 2 et 3 : Elle se déplace de long de la maille coupant la chaîne à chaque site. 4 : Elle a dégradé l'ensemble de la chaîne et reste fixée sur la gélatine.

progressive des sites de « collage » permet à l'enzyme d'adopter un mécanisme de diffusion brownien dont la cinétique devient limitée par la réaction.

La troisième catégorie d'enzyme concerne celles qui sont fortement chargées positivement à leur surface. Elles entrent en contact avec le gel et ont un mécanisme unique de déplacement sur le réseau à toutes les concentrations en gélatine. La diffusion de l'enzyme est brownienne, la cinétique est limitée par la réaction et indépendante de la concentration en gélatine.

La modélisation, « Swiss-Cheese » qui avait été précédemment expliquée (cf chapitre 3) permet de rendre compte des enzymes qui ont un exposant  $1/\beta$  anormal ( $>1$ ) et compris entre  $4/3$  et  $5/3$ . Elles ont une marche aléatoire avec des sites de collage et entrent en interaction avec le réseau puis s'en détachent de façon aléatoire jusqu'à ce qu'elles trouvent des sites de coupure, hydrolysent la gélatine puis se détachent à nouveau, avec une probabilité plus importante de visiter un site déjà exploré qu'un site vierge (Figure 89).

Des études (Ehbrecht et al 1985, Rau et Sidorova 2010) portant sur le mécanisme de dégradation de l'ADN par des enzymes de restriction montrent une diffusion le long de l'ADN de ces dernières et pourraient permettre d'interpréter nos résultats sur la dégradation enzymatique de gels de protéine.

Dans un tampon donné, ce qui va déterminer la capacité de l'enzyme de restriction à dégrader son substrat est la longueur de l'ADN flanquant le site de restriction. Plus les séquences en aval et/ou en amont sont courtes plus la capacité à dégrader sera limitée. En effet, l'endonucléase diffuse le long du brin d'ADN après association non-spécifique avec celui-ci. Elle diffuse au hasard jusqu'à se dissocier. Dans le cas d'ECOR1, la distance effective de recherche de son site de coupure est de 1000 paires de base avant dissociation substrat-enzyme. La probabilité pour ECOR1 de glisser le long d'une paire de base est  $7.3 \cdot 10^6$  fois plus importante que la dissociation. L'efficacité de la diffusion linéaire pour trouver un site spécifique dépend de la constante de dissociation non spécifique et du coefficient de diffusion le long du réseau (Ehbrecht et al 1985). Trois mécanismes pour le mouvement des enzymes le long de l'ADN ont été proposés. Le glissement (« sliding ») de paires de base en paires de base le long de l'ADN, où la protéine reste en contact avec l'hélice. Le mouvement est fluidifié par la présence d'eau à l'interface ADN-Protéine. Le « hopping », qui devrait être sensible à la salinité du milieu puisque des dissociations de courtes durées rompent les interactions ADN –protéines. Et le transfert direct consiste en un déplacement de la protéine

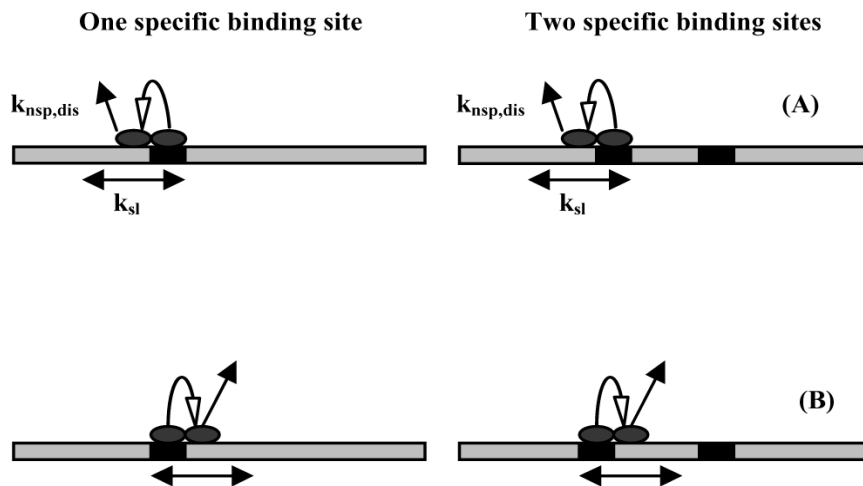


Figure 90 : Représentation schématique de la méthode de base pour mesurer les taux de glissement. (Rau et Sidorova 2010).

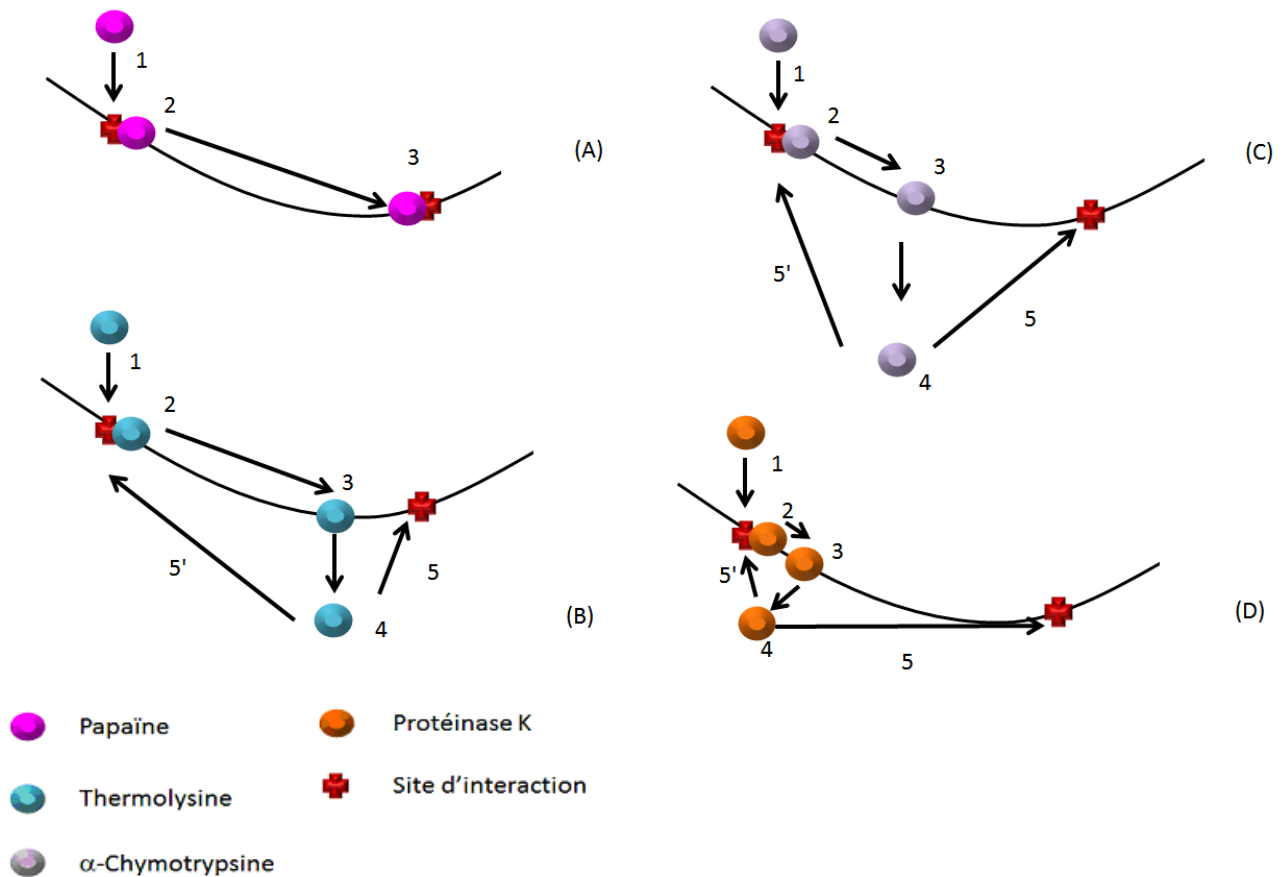


Figure 91 : Proposition du mode de diffusion pour chaque enzyme. (A) la papaine ne se détache pas du réseau, la constante de diffusion de l'enzyme étant plus rapide que la constante de dissociation. (B) La thermolysine se détache après un temps passé sur le réseau inférieur à celui de la papaine. La probabilité qu'elle trouve le second site ( $P_5$ ) est inférieure à la probabilité qu'elle reparte sur le premier site d'interaction ( $P_5'$ ). (C) La chymotrypsine a une constante de dissociation supérieure à celle de la thermolysine. (D) la protéinase K se détache très rapidement du réseau donc  $P_5 < P_5'$ .

d'une hélice à l'autre. Le taux de dissociation d'ECOR1 peut être divisé en deux processus avec transition entre mode de liaison spécifique et non spécifique.

Les enzymes avec un coefficient de diffusion presque équivalent en 1D et en 3D sont insensibles ou très peu à la variation de la salinité du milieu. Alors que les enzymes, qui sont plus lentes en diffusion 1D qu'en diffusion 3D, sont très sensibles à la présence de NaCl (Rau et Sidorova 2010).

Il est possible d'établir un parallèle entre les résultats obtenus pour la diffusion linéaire des enzymes de restriction sur l'ADN et la diffusion de nos enzymes sur le réseau de gélatine. En effet, la constante de dissociation entre l'enzyme et le substrat semble être la clé de l'explication dans les deux cas. Dans le cas d'EcoR1, il a été mis en évidence que l'enzyme diffuse le long de l'ADN tout d'abord en entrant en interaction non spécifique avec son substrat puis en glissant sur ce dernier, avec une limite de déplacement (nombre de paires de base) établie en fonction du tampon avant de se détacher ou de trouver un site spécifique pour la dégradation. La réaction de dissociation commence par une transition entre mode de liaison non spécifique et spécifique au site de reconnaissance (coupure) (rectangle noir sur la Figure 90), suivie par un mouvement de glissement à gauche (A) ou à droite (B). Si le site de reconnaissance est considéré comme une barrière d'absorption et si la marche démarre à gauche, les probabilités qu'EcoR1 se dissocie d'un ou deux sites de reconnaissance, sont les mêmes. En commençant la marche à droite, les probabilités seront les mêmes uniquement si la constante de dissociation est plus importante que la vitesse de diffusion linéaire (déplacement le long du brin d'ADN) de l'enzyme. Si la vitesse de diffusion est plus rapide que la vitesse de dissociation, l'enzyme trouvera le second site avant de se dissocier.  $P_{\text{diss,1-site}}/P_{\text{diss,2-sites}}=1$  avec  $P_{\text{diss,1-site}}$ , la probabilité que l'enzyme se dissocie de l'ADN en se déplaçant et  $P_{\text{diss,2-sites}}$  la probabilité que l'enzyme se dissocie de l'ADN en se déplaçant en direction d'un second site, lorsque  $K_{\text{dissociation}} > K_{\text{diffusion}}$ .  $P_{\text{diss,1-site}}/P_{\text{diss,2-sites}} > 1$  (allant jusque 2), lorsque  $K_{\text{dissociation}} \leq K_{\text{diffusion}}$  (Figure 91).



Enzyme	nombres de sites de coupure sur une chaîne de gélatine $\beta$
Thermolysine	407
$\alpha$ -Chymotrypsine	94
Papaïne	1705
Protéinase K	860

**Figure 92 : Nombre de sites de coupure estimé pour chaque enzyme sur une chaîne de gélatine B.** Les résultats ont été obtenus par simulation sur Expasy.org sauf pour la papaïne (estimation personnelle en fonction de la spécificité de coupure de l'enzyme). Les simulations sur Expasy ont été générées à l'aide de la séquence des trois chaînes de gélatine bovine  $\alpha 1$  et 2  $\alpha 2$  en incluant les modifications de séquence en acides aminés produites par la purification en base forte lors de son extraction. Les glutamines et les asparagines deviennent respectivement de l'acide glutamique et de l'acide aspartique. Le choix a été fait de modifier l'entièreté de la séquence.

Donc la papaine avec un exposant  $1/\beta=1$  reflèterait, dans cette analogie, une enzyme se déplaçant exclusivement sur le réseau entre les sites d'interaction (hydrolyse) car sa constante de dissociation est plus faible que sa constante de diffusion le long du réseau. La thermolysine, la chymotrypsine, et la protéinase K au contraire aurait des constantes de dissociation plus élevées. Pour expliquer les différences entre ces trois enzymes, il faut tenir compte du nombre de sites de coupure et du nombre de sites d'interaction non-spécifique, qu'elles possèdent sur la gélatine, et de leurs capacités à interagir avec le réseau. Une simplification qui ne tiendrait compte que du temps d'interaction est représenté sur la Figure 91.

Les interactions non spécifiques sont électrostatiques pour les enzymes de restriction en contact avec l'ADN. Si cela est le cas dans notre système également, la modélisation de ce phénomène doit tenir compte des constantes de dissociation et des temps de diffusion des enzymes mais également du nombre de sites de fixation permettant aux enzymes d'interagir avec le réseau. Par exemple, la thermolysine, chargée négativement, doit probablement interagir peu de temps avec le réseau (à cause des charges répulsives) mais fréquemment (donc posséder plus de sites d'interactions avec le réseau qu'une enzyme chargée positivement à même exposant).

Afin de tenter de rendre compte de l'ensemble des résultats nous allons faire des simulations d'une marche aléatoire d'une enzyme en une et deux dimensions en faisant varier le nombre de sites de coupure et le temps d'interaction entre l'enzyme et un site d'interaction, la taille de la maille, le nombre d'enzymes par maille. Ce travail est réalisé en collaboration avec Laurent Bacri. Ce type d'approche devait nous permettre de suivre l'évolution du déplacement carré moyen de la distance parcourue par l'enzyme au cours du temps. La diffusion anormale sera caractérisée par un déplacement carré moyen proportionnel au temps en loi de puissance,  $\langle x^2 \rangle \propto t^\alpha$  avec  $\alpha < 1$ , pour un régime sous-diffusif. Nous pourrons ainsi remonter à l'exposant de diffusion anormal que nous pourrons comparer aux valeurs obtenues par les expériences de dégradation enzymatique de gels de protéines avec  $1/\beta = \alpha$ . Dans le cas d'une diffusion brownienne, nous attendons  $\alpha = 1$ .

Pour valider expérimentalement l'hypothèse d'un marcheur, nous pourrions suivre le déplacement d'une enzyme marquée par fluorescence au cours de la dégradation d'un gel de gélatine. Nous pouvons également déterminer les constantes d'association de chaque enzyme



avec le substrat gélifié. Pour cela, nous pourrions suivre l'apparition de produits solubles par spectrométrie à différentes concentrations en substrat.

De plus, afin de déterminer si les sites d'hydrolyse des enzymes se trouvent impliqués dans la formation de la réticulation ou bien s'ils ont une répartition aléatoire le long de la maille, une expérience de digestion d'une solution de gélatine en faisant varier le temps pourrait être réalisée. Nous devrions observer une grande disparité des bandes lorsque les sites sont en répartition aléatoire, alors que le nombre de fragments générés sera plus faible et moins dispersé en taille si les sites de coupure enzymatique sont dans des nœuds.

Dans le même temps, pour établir les exposants critiques nécessaires à la caractérisation de la transition de phase gel-sol, des expériences de rhéologie sur gel en présence d'enzyme dans le cas d'un marcheur ( $1/\beta=1$ ) et d'un nageur ( $1/\beta>1$ ) seraient nécessaires afin de définir la classe d'universalité associée à la transition gel-sol catalysée par une enzyme. Nous pourrions également mesurer la fraction gel pour avoir un autre exposant et comparer les valeurs expérimentales aux modèles théoriques.

La présence de trois classes d'enzymes aboutissant pour au moins deux des classes, avec l'augmentation de la densité du réseau, à une insensibilité des enzymes au milieu présente un intérêt majeur dans la compréhension de la dissémination tumorale. L'augmentation de la rigidité matricielle péri-tumorale est un fait allant à contre sens de la progression métastatique. En effet, la cellule tumorale pour progresser et envahir de nouveaux tissus dégrade la matrice l'entourant à l'aide de diverses protéases ; l'augmentation de la densité du réseau augmente la probabilité que les enzymes physiologiques adoptent un mécanisme de dégradation brownien limité par la réaction, et donc augmente l'efficacité de dégradation pour une faible augmentation en enzyme. Par ailleurs, la probabilité d'interaction de l'enzyme « marcheur » avec des inhibiteurs solubles pourrait également être plus faible. Ces deux aspects pourraient conférer un avantage pour la formation de canaux jusqu'au système circulant par lesquels progresseront les cellules cancéreuses

Un premier modèle de matrice conjonctive, utilisant du collagène I dénaturé ou gélatine, nous a permis de comprendre d'avantage les mécanismes enzymatiques de la protéolyse et nous donne des clés pour appréhender la stromatogenèse. Un modèle de lame basale utilisé au laboratoire nous permet de complexifier nos études et d'aborder l'aspect cellulaire de la migration lors du processus métastatique et d'en ressortir de potentiels marqueurs de l'invasion tumorale.



## **Deuxième Partie**

**Migration de lignées issues de cancer du  
sein et caractérisation des MMPs  
majoritaires.**

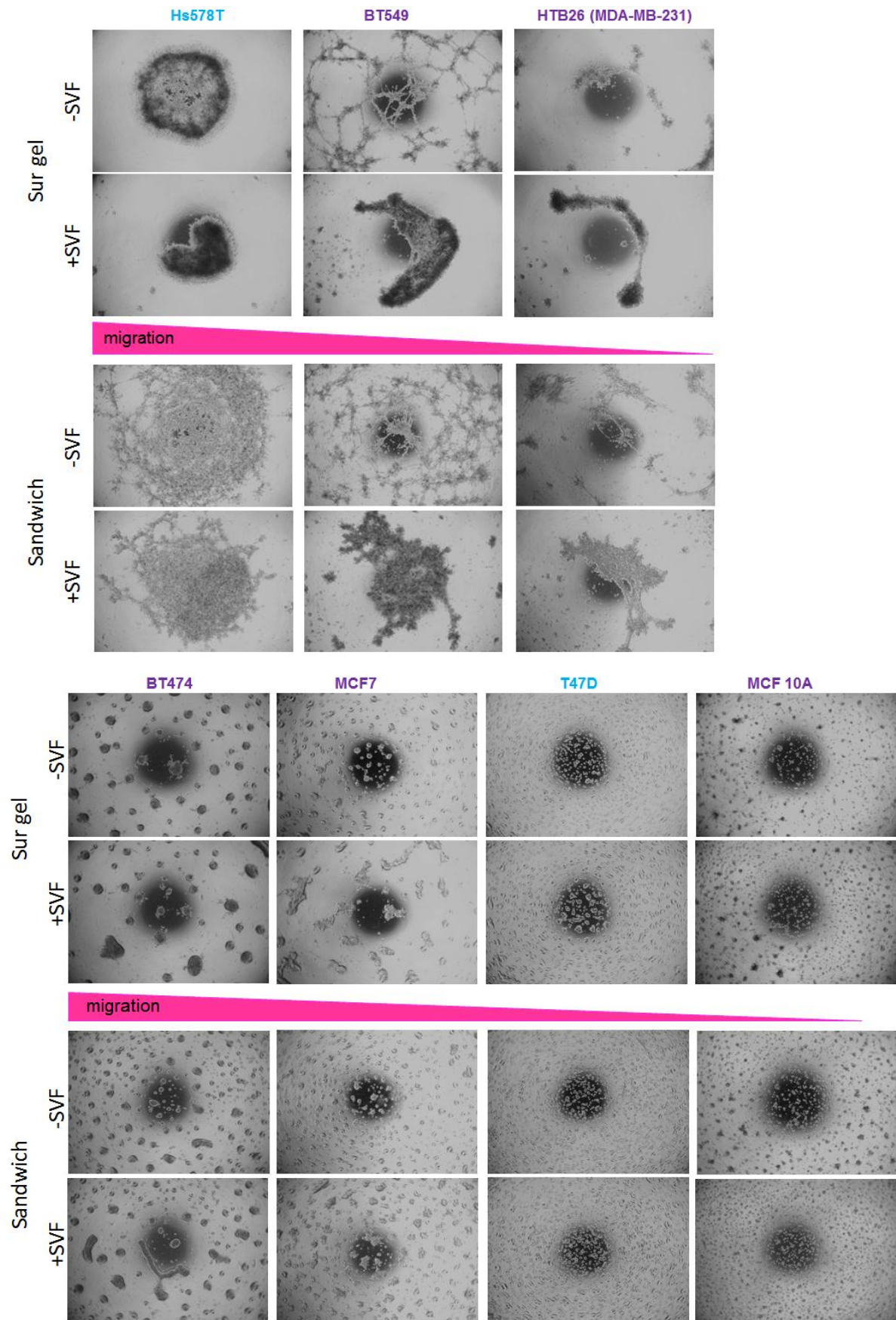


Figure 93 : Migration de lignées de cancer du sein en fonction de leurs invasivités sur gel ou en sandwich, en présence ou absence de sérum de veau foetal, après 24h d'incubation.

Après avoir exploré les mécanismes physiques de dégradation de gels de protéines mimant la matrice conjonctive par différentes protéases, nous avons complexifié notre système en utilisant un gel mimant la lame basale en présence de cellules épithéliales mammaires plus ou moins invasives. L'objectif de ce travail a été de déterminer si le modèle d'étude 3D développé au LAMBE peut permettre d'identifier de nouveaux marqueurs tumoraux. Nous nous sommes intéressés aux MMPs, compte tenu d'un travail antérieur dans le laboratoire, montrant que, à la surface et à l'intérieur du gel, la migration des cellules dépendait majoritairement des MMPs et non de sérines protéases, par l'utilisation d'inhibiteurs tels que le GM6001 ou l'aprotinine. L'approche, qui a été choisie dans un premier temps, consiste à n'ensemencer sur ou dans le gel que des cellules tumorales, en présence ou non de facteurs sériques. Elle ne prend pas en compte l'implication du stroma dans la production de protéases, qui sera développée ultérieurement. Nous cherchons donc à identifier une ou plusieurs MMPs dont le taux d'expression serait augmenté ou diminué selon le potentiel invasif des lignées tumorales utilisées. Ensuite, afin de déterminer si ce modèle d'étude en 3D est pertinent et reproduit en partie des conditions *in vivo*, nous comparerons nos résultats avec ceux de la littérature, obtenus soit avec des lignées tumorales en culture 2D, soit avec des biopsies de tumeurs de patientes.

## **I. Migration des cellules sur et dans un gel 3D de Matrigel**

Les 7 lignées cellulaires qui ont été choisies dans cette étude préliminaire, sont les cellules tumorales T47D, MCF7, BT474, MDA-MB-231, BT549, Hs578T dont le classement des potentiels invasifs a été précédemment réalisé en chambre de Boyden (Neve 2006), et les cellules MCF-10A, une lignée présentant les caractéristiques de cellules épithéliales mammaires normales (Soule et al, 1990). Ces différentes cellules ont donc été déposées sur ou incluses entre 2 couches de Matrigel, en présence ou en absence de facteurs sériques. La Figure 93 présente le regroupement des cellules après 24h d'incubation.

Nous observons ainsi, que ce sont les cellules Hs578T migrent le plus rapidement pour ne former qu'un seul amas après 24 heures d'incubation (Sur gel, -/+SVF). La présence de facteurs sériques leur permettent de former un amas plus compact. Quand elles sont piégées dans le gel (condition sandwich), la migration est ralentie permettant d'observer un réseau de cellules connectées plutôt qu'un amas compact (Sandwich, -/+SVF). En absence de SVF, le réseau cellulaire est plus étendu. Le comportement migratoire des BT549 et des MDA-MB-231 est





proche ; cependant, étant moins invasives par rapport aux Hs578T, les regroupements en plaque sur gel ou en réseau connecté en condition sandwich, sont moins importants.

Les cellules BT474 tout comme les cellules MCF7, en absence de SVF après 24h d'incubation, sur gel ou piégées dans le gel, présentent une capacité migratoire moyenne formant de plus petits amas cellulaires dispersés dans l'ensemble du puits. L'ajout de facteurs sériques favorisent le regroupement des amas, qui augmentent de taille. Nous observons que les BT474 montrent une capacité à se regrouper plus importante que les MCF7, traduisant un potentiel invasif supérieur.

Les cellules T47D ont la particularité d'être faiblement invasives. D'après nos résultats, seules les conditions sur gel avec facteurs sériques leur permettent de se regrouper clairement en amas compacts. Leur comportement migratoire se rapproche de celui des MCF-10A, lignée ayant des caractéristiques de cellules normales. Cependant, pour ces dernières, aucune condition ne permet un regroupement en amas compact ; les cellules se rapprochent entre elles formant des grappes hétérogènes de cellules, de petites tailles et très nombreuses. Ce comportement traduit une très faible capacité à se regrouper, lorsqu'elles sont mises en contact avec du Matrigel.

Ainsi, les conditions où les cellules migrent le plus, c'est à dire, sur gel et en présence de SVF, permettent aux moins invasives de se regrouper en amas multiples (MCF-10A, T47D, MCF7, BT474) et aux plus invasives de se regrouper en une plaque unique (MDA-MB-231, BT549, Hs578T). Les différences au sein de chaque groupe portent, pour les plus invasives sur le degré de compaction de la plaque unique, et pour les moins invasives, sur le nombre de cellules regroupées dans chaque amas et sur leur degré de compaction. L'absence de sérum, associé ou non au piégeage des cellules entre 2 couches de gel, ralentit la migration des cellules et met en évidence des formes de regroupement intermédiaires. Ces dernières peuvent également être observées lorsque les cellules sontensemencées sur gel en présence de SVF mais à des temps inférieurs à 24h (résultats non montrés). Nous pouvons donc constater que pour chacune des conditions testées, avec ou sans sérum, sur gel ou en sandwich, le classement des lignées est le même. L'ordre est le suivant, des moins invasives aux plus invasives: MCF710A<T47D<MCF7<BT474<MDA-MB-231<Hs578T<BT549.

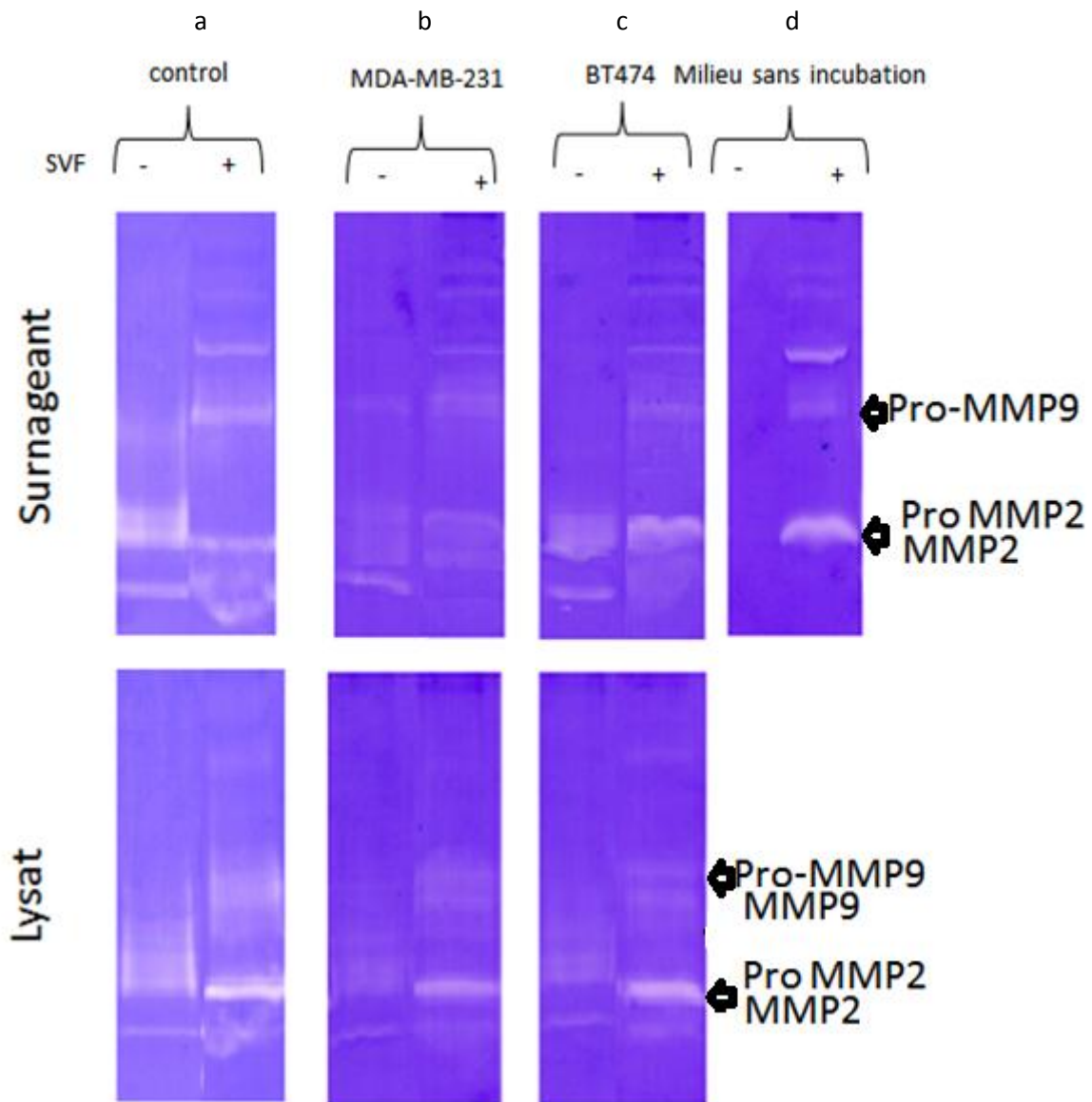


Figure 94 : Zymogramme en présence de gélatine issue de l'expérience de migration sur gel 3D de MDA-MB-231 et BT474, en présence et en absence de facteurs sériques. b, c : Après 48h les surnageants sont prélevés et le gel sur lequel repose les cellules est lysé. Les échantillons (surnageant ou extrait gel) sont analysés par zymographie. Différents contrôles ont été réalisés. d : dépôt sur gel de gélatine, du milieu de culture avec et sans SVF ; a : incubation de milieu +/- SVF sans cellules pendant 48h sur Matrigel, dans les mêmes conditions expérimentales que pour les MDA-MB-231 et BT474.

## **II. Caractérisation des MMPs produites sur et dans des gels 3D par zymographie**

Les cellules emprisonnées dans le gel se regroupent moins rapidement par rapport à celles migrant sur le gel, et sont sensibles à la présence de facteurs sériques. Comme il a été précédemment démontré l'implication majeure des MMPs dans notre modèle, nous avons cherché à déterminer si le taux de MMPs produit était modulé différemment selon le potentiel invasif des cellules et les conditions expérimentales.

Dans un premier temps, nous avons orienté notre étude au niveau protéique. Notre objectif était d'identifier les protéases majoritairement exprimées par les différentes lignées, et de déterminer les proportions en formes actives et inactives pour les MMP sécrétées. Des zymogrammes avec comme substrats, la gélatine, le fibrinogène ou la caséine ont été réalisés. La gélatine permet de mettre en évidence principalement les MMP-9 et -2 (gélatinases) avec la possibilité d'observer les MMP-1 et -8 bien que plus faiblement car non spécifique de ce type de substrat. Le fibrinogène permet d'observer l'activité de dégradation de la plasmine, du tPA et uPA, des MMP-3 et -14. La caséine permet quant à elle l'observation des MMP-1, -3, -7, -12, -13. Tout d'abord, nous devons vérifier si nos conditions expérimentales (présence de SVF et du Matrigel dans nos échantillons) permettaient d'obtenir des résultats exploitables avec l'utilisation de cette technique ; le SVF contient des protéases telles que la plasmine, MMP-2, MMP-9, et le Matrigel contient de la MMP-2, de la MMP-9, de l'urokinase et du tPA (Benton et al, 2011) ; une évaluation de leurs taux par zymographie a donc été réalisée sur les échantillons suivants : du milieu de culture avec ou sans SVF, le surnageant et le gel solubilisé après une incubation de 48h d'un gel 3D avec du milieu contenant ou non du SVF, le surnageant et le gel solubilisé d'un gel 3D cultivé pendant 48h avec des cellules (MDA-MB-231 ou BT474) en présence ou non de SVF.

Dès les premiers tests, nous avons observé que l'ajout de SVF au milieu apporte une quantité de protéases non négligeable, visualisée aussi bien sur gélatine, révélant la présence de pro-MMP-9 (92 kDa) et pro-MMP-2 (72 kDa) (Figure 94d), que sur les autres types de substrats (non montrés). Lorsque l'on incube le milieu sans SVF en présence de Matrigel (Figure 94a), nous observons un apport supplémentaire en protéases que l'on retrouve dans le surnageant et sur l'extrait Matrigel : la MMP-2 active (60 kDa) et une bande à un PM inférieur, que nous n'avons pas identifiée mais qui pourrait correspondre à de la MMP-1 active (45 kDa).



Nous pouvons par ailleurs constater que les protéases apportées par le Matrigel diffusent dans le surnageant. Afin de s'affranchir de cet apport, nous avons tenté d'éliminer les protéases du gel par diffusion. Le gel 3D de Matrigel a été lavé avec du milieu sans sérum toutes les deux heures, incubé toute la nuit avec du milieu neuf, suivi d'un lavage supplémentaire à 24h. Ces lavages successifs n'ont pas permis d'éliminer les protéases piégées dans le gel. Or il a été démontré, que les MMPs -1, -2, -7, -8, -9 et -13 se lient aux chaînes d'héparane sulfate des protéoglycanes de la MEC (Groth et al, 2009). Des expériences sont envisagées en augmentant la force ionique du milieu pour décrocher ces protéases. L'incubation du gel avec le milieu + SVF, permet de retrouver en plus des protéases apportées par le gel, la pro-MMP-9 et la pro-MMP-2, provenant du SVF. Malgré la présence importante de protéases, nous avons incubé les BT474 et les MDA-MB231 sur Matrigel pendant 48h avec et sans SVF, récupéré les surnageants et les extraits gel, puis réalisé une zymographie en présence de gélatine (Figure 94b et c). Les quantités de protéases produites par les cellules ne sont pas dissociables de celles apportées par nos conditions de culture (+ SVF et liées à la présence du réseau 3D de Matrigel), et ne permet pas d'exploiter les résultats obtenus.

Étant dans l'incapacité d'éliminer les apports de protéases liées à nos conditions de travail, observés sur zymogrammes, nous étions également dans l'incapacité d'effectuer des analyses par Western Blot et donc d'identifier au niveau protéique les MMPs impliquées dans le processus de migration. Nous avons donc testé un ensemble de MMPs au niveau leur expression d'ARNm par RT-PCR quantitative.

### **III. Expression des MMPs produites sur et dans des gels 3D par RT-PCRq**

La RT-PCR semi-quantitative nous permet de visualiser les taux d'expression d'un ensemble de 12 MMPs (MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14 et -15) exprimées ici en quantité relative par rapport à deux gènes de référence, la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et la  $\beta$ -actine. Les valeurs de Ct obtenues nous permettent de s'assurer de la quantité de matériel déposée pour chaque lignée ; et la normalisation des résultats par ces gènes de référence permet de comparer les différentes lignées cellulaires entre-elles, puisque se sont des gènes à expression constante et quasiment équivalente dans tous les types cellulaires. Dans la Figure 95, les taux d'expression relatifs des MMPs, de cellules cultivées sur gels avec SVF, sont présentés de la plus exprimée à la moins exprimée.

DMEM- SVF

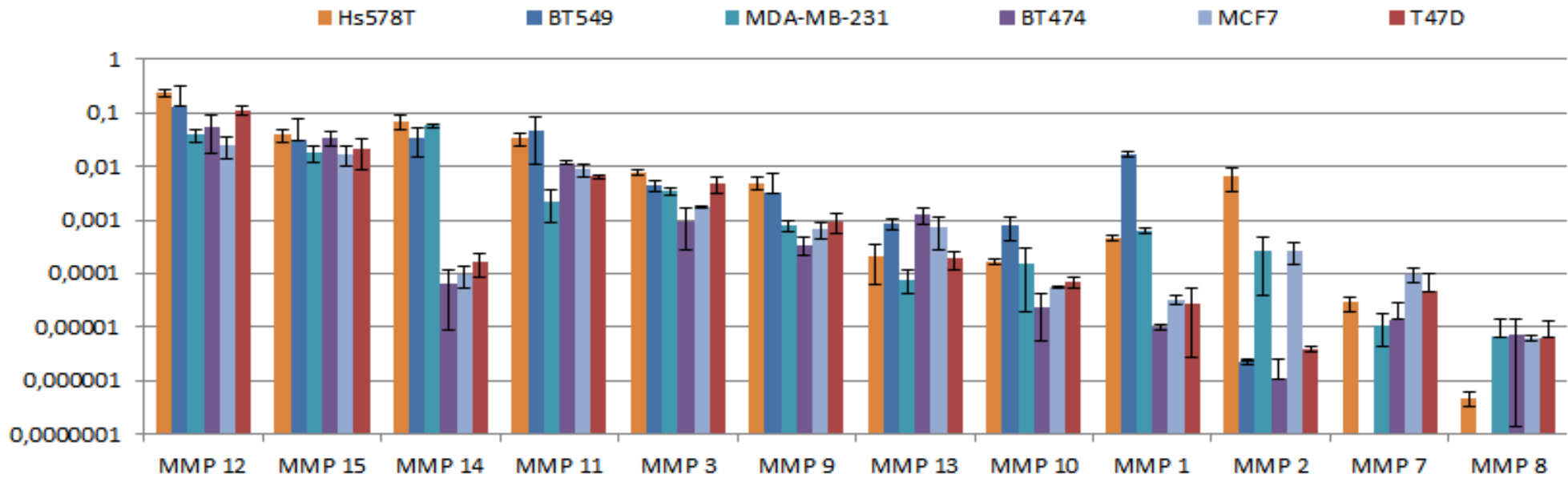
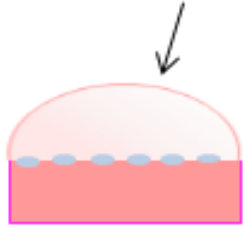


Figure 95 : Variation d'expression relative (GAPDH/ $\beta$ -actine) des MMPs de 6 lignées issues de carcinome mammaire lors du test de migration en condition sur gel et en absence de facteurs sériques. Les expériences ont été effectuées en trois fois. Les écarts types sont issus de l'écart à la moyenne des triplets. Cependant, des variations notoires entre groupes de cellules moyennement invasives et groupe de cellules très invasives sont à noter, montrant une diminution de l'expression de MMP-14,-10,-1.

Le tableau ci-dessous résume l'ordre d'expression relative des MMPs pour chacune des lignées présentées dans la Figure 95.

HS578T	12	14	15	11	3	9	2	1	13	10	7	8
BT549	12	11	15	14	1	3	9	13	10	2	7	8 (NE)
MDA-MB-231	12	14	15	11	3	2	9	1	13	10	7	8
BT474	12	15	11	13	3	9	14	10	7	1	8	2
MCF7	12	15	11	3	13	9	2	7	14	10	1	8
T47D	12	15	11	3	9	13	14	10	7	1	8	2

(NE= non exprimée)

Un groupe de MMPs très exprimé par tous les types cellulaires, telles que les MMP-12, -15, -11 mais également -3, -9, présente des taux d'expression relatifs non corrélés au potentiel invasif des différentes lignées. L'expression au niveau ARNm de ces MMPs ne semble pas régulée par la capacité migratoire des cellules.

En revanche, les MMP-14, -10 et -1 ont un taux d'expression relatif plus élevé dans le groupe de cellules à fort potentiel invasif (Hs578T, BT549 et MDA-MB-231) par rapport au groupe de cellules à potentiel invasif moyen à faible (BT474, MCF7 et T47D). Ce résultat suggère une régulation de l'expression de ces MMPs qui dépendrait du potentiel invasif des cellules.



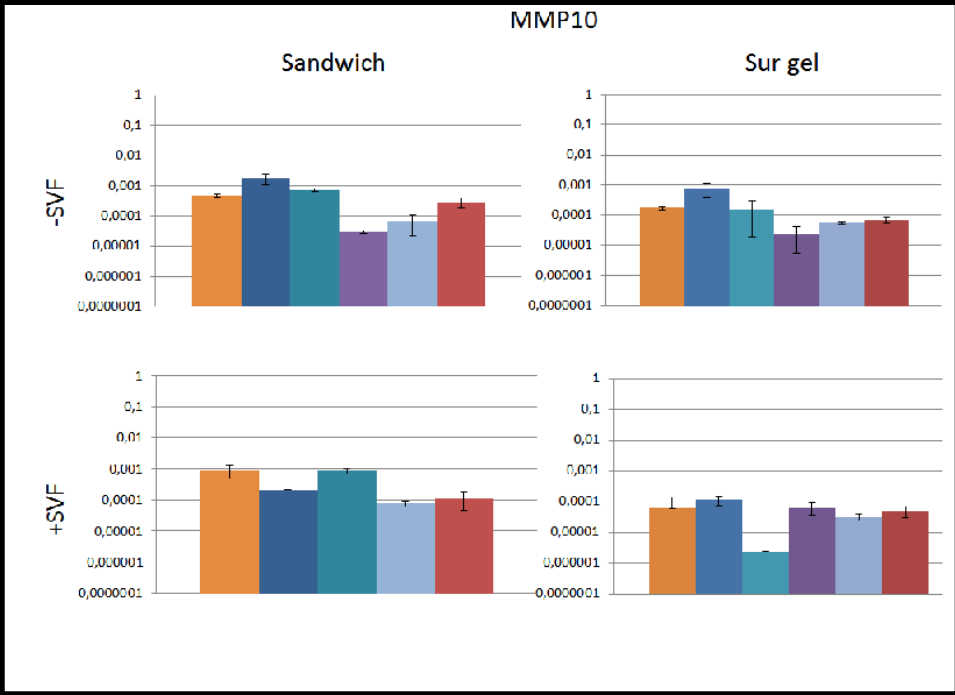
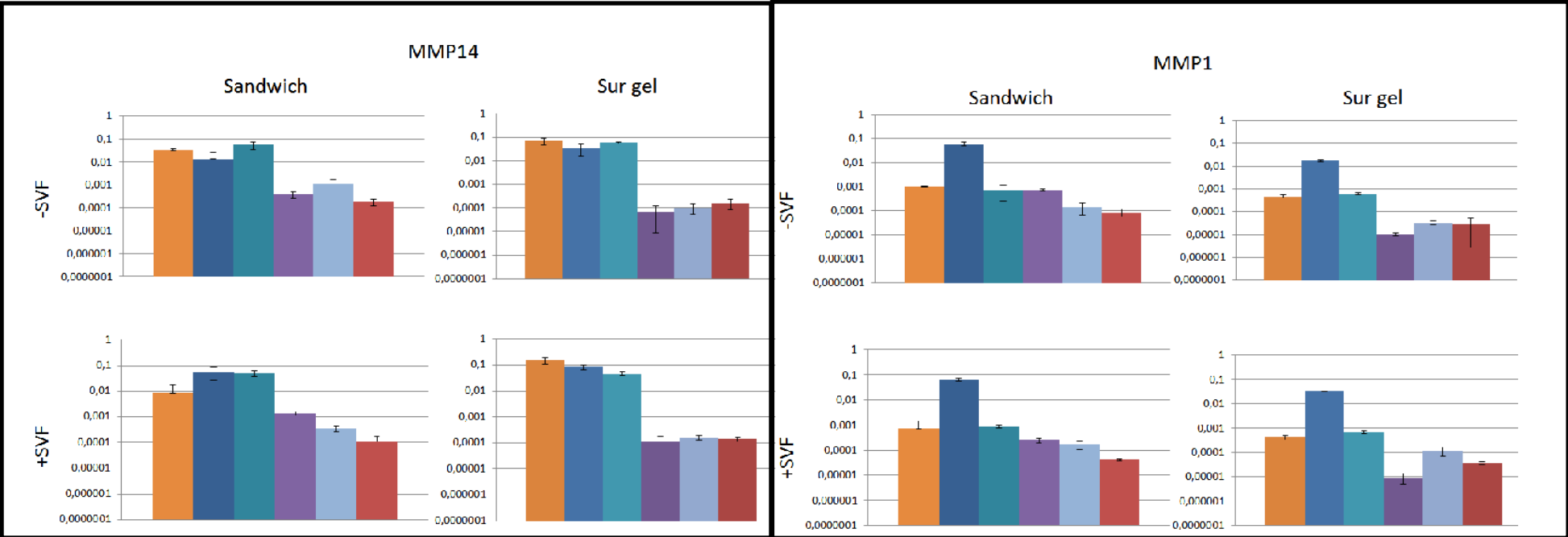


Figure 96: Variation de l'expression relative des MMP-14,-1,-10 et -8 en fonction des conditions expérimentales

■ Hs578T  
 ■ BT549  
 ■ MDA-MB-231  
 ■ BT474  
 ■ MCF7  
 ■ T47D

La Figure 96 présente la variation d'expression en fonction des conditions expérimentales, sur gel ou sandwich, avec ou sans sérum. Lorsque les lignées sont incluses dans le gel ou déposées sur celui-ci, nous avons pu observer que le classement en fonction de leur potentiel invasif reste inchangé, bien que la migration soit ralentie par l'emprisonnement des cellules dans le gel et par l'absence de SVF.

Dans la condition sandwich ou sur gel, avec ou sans SVF, la différence d'expression la plus nette entre le groupe des cellules très invasives et moyennement invasives, est obtenue pour la MMP-14 (facteur 100). Pour la MMP-1, trois conditions sur quatre testées montrent également une différence d'expression selon le potentiel invasif, mais les écarts d'expression obtenus sont de moindre amplitude que ceux obtenus pour la MMP-14. Les écarts obtenus sur gel, avec et sans SVF sont très nets, par rapport à ceux obtenus en conditions sandwich, en présence de SVF. En ce qui concerne la MMP-10, les taux exprimés de MMPs sont globalement plus faibles, et les différences d'expression entre les lignées invasives et non invasives cultivées sont également moins nettes. Nous souhaitons conforter l'ensemble de ces résultats préliminaires en augmentant le nombre d'expériences. Cependant, nous montrons clairement une différence d'expression de la MMP-14, et de façon moins marquée, mais retrouvée dans plusieurs conditions pour la MMP-1 et la MMP-10, entre le groupe de cellules invasives et moyennement invasives. Des expériences complémentaires sont également envisagées avec des groupes de lignées peu et non invasives.



## DISCUSSION DE LA DEUXIÈME PARTIE

*In vivo*, la matrice extra-cellulaire est une barrière à franchir lors du processus d'invasion par des cellules cancéreuses. Cette charpente protéique est variable, dans sa composition et son organisation, en fonction des types cellulaires qu'elle soutient. Le laboratoire a choisi de s'intéresser à un processus de remaniement non physiologique, le cancer, se focalisant plus particulièrement sur les carcinomes. Les cellules épithéliales à l'origine de ces cancers reposent sur une lame basale, qu'elles doivent franchir pour ensuite coloniser le stroma conjonctif. Le test développé au laboratoire est basé sur l'utilisation d'une matrice reconstituée, le Matrigel, mimant la lame basale. Il s'est avéré qu'il permet de classer 22 lignées tumorales de carcinomes, appartenant à différents types de cancers, en fonction de leur potentiel invasif (dépôt de brevet en cours). L'objectif de ce travail de thèse est de déterminer s'il peut être utilisé pour identifier de nouveaux marqueurs diagnostic/pronostic du cancer, et plus particulièrement si les MMPs étaient différemment exprimées par un ensemble de 7 lignées tumorales mammaires de potentiels invasifs différents.

Les cellules ont été déposées, à raison de 35000 cellules par puits, sur ou incluse le réseau gélinifié, en présence et en absence de SVF. L'étude comparative de 7 lignées cancéreuses, Hs578T, BT548, MDA-MB-231, BT474, MCF7, T47D, et d'une lignée « normale », MCF-10A a montré des réponses différentes en termes de capacités migratoires. Le classement établi est inchangé quelles que soient les conditions expérimentales, piégées ou non, avec ou sans SVF, mais également pour différents temps (de 3h à 48h) et à différentes densités cellulaires (résultats non montrés). Le regroupement permettant de classer le plus rapidement les lignées est obtenu sur gel, après 24h d'incubation en présence de facteurs sériques. L'ordre de classement en fonction du potentiel invasif que nous obtenons est proche de celui obtenu sur chambre de Boyden par Neve et al (2006). Ils montrent que les 3 lignées très nettement plus invasives, classées dans l'ordre, sont les suivantes: Hs578T<BT549<MDA-MB-231 ; les moins invasives, d'un facteur 2 à plus de 6 fois moins, sont les suivantes : MCF-10A<MCF7<BT474<T47D. Des variations par rapport à notre classement sont observées entre les plus invasives et pour la position des T47D dans le groupe des moins invasives. Ces différences peuvent être dues à la dérive des lignées, par accumulation successive de mutations, lorsqu'elles sont cultivées depuis longtemps dans les laboratoires avec des passages multiples. Nous envisageons de classer nos propres lignées par des analyses en chambre de Boyden pour les comparer à notre test.



Le laboratoire de Bissel a développé un modèle proche du nôtre, en cultivant leurs cellules sur un réseau 3D de Matrigel enrichi en laminine, et contenant une fraction soluble diluée de ce gel dans le surnageant. Il a centré son étude sur la morphologie des amas cellulaires, en ajustant le nombre de cellules ensemencées pour obtenir des amas de taille comparable et dans des proportions de 3 à 10 fois inférieures aux nôtres. Notamment, une étude portant sur 25 lignées de cellules de carcinome mammaire leur a permis d'établir 4 types de morphologie d'amas : « ronds », « en masse », « grappe-like » et « stellaires » (Kenny et al, 2007). Le type "rond", regroupé dans une étude ultérieure avec le type organisé en "masse", correspond à un regroupement de cellules polarisées avec arrêt de croissance, présentant des interactions cellules-cellules via les E-cadhérines, et faisant parfois apparaître une lumière centrale. Cette organisation reproduit celle des acini mammaires observés *in vivo*. Les types "grappe-like" et "stellaires" se caractérisent par des morphologies variées avec perte systématique de polarité, une architecture désorganisée, une diminution ou perte d'expression de E-cadhérine et une reprise de la croissance. Dans leur classement, le type "rond" reproduit l'organisation en acinus de cellules normales mammaires, le type "organisé en masse", correspond à des cellules peu invasives (dans lesquels ils incluent les BT474, les MCF7 et les T47D), le type "grappe-like" à une transition vers un phénotype plus invasif (regroupant les SKBR3 et les ZR751) et le type "stellaire" aux cellules les plus agressives (comprenant les BT549, les MDA-MB-231 et les Hs578T).

Dans notre test, nous pouvons classer toutes les lignées les unes par rapport aux autres, et non uniquement par groupe. Par ailleurs, nous observons le même type d'organisation de nos amas que celui obtenu par l'équipe de Bissel, même en travaillant à une densité beaucoup plus élevée et constante ; les cellules les plus invasives avec notre modèle (MDA-MB-231, HS578T, BT549) ont une morphologie de type "stellaire" ; les SKBR3 et les ZR75 1 forment des amas lâches (résultat non montré) tandis que les T47D, les MCF7, et les BT474 forment des amas compacts tridimensionnels. Cependant, les cellules intégrées dans leur groupe "grappe-like" inclut nos cellules tumorales les moins invasives alors que leur type "organisé en masse" inclus nos cellules moyennement invasives. Donc, même-si nos observations des amas sont similaires, nous n'aboutissons pas au même classement. En résumé, ils obtiennent : MCF-10A<T47D, MCF7, BT474< SKBR3, ZR75 1< MDA-MB-231, Hs578T, BT549, en ce qui nous concerne : MCF-10A<SKBR3<ZR751<T47D<MCF7<BT474<MDA-MB-231<Hs578T<BT549 (résultats non présentés pour les lignées ZR75 1 et SKBR3). Le classement obtenu en chambre de Boyden par Neve et al (2006) est le suivant :



MCF-10A<SKBR3<MCF7<BT474<T47D<ZR751<Hs578T<BT549<MDA-MB-231 et ne permet pas de conclure clairement. Ce que nous envisageons de faire pour conforter nos résultats, consiste à augmenter le nombre de cellules "grappe-like" de cancer mammaire à tester sur notre système et à classer nous-mêmes nos lignées sur chambre de Boyden.

Un autre point, qui diverge avec l'équipe de Bissel, concerne l'organisation en amas de la lignée « normale ». Nous observons, pour les MCF-10A un regroupement de type grappe-like sur 24 et 48h ; tandis que, sur leur modèle, leur lignée « normale » S1 reforme une structure de type acinus après 4 jours de culture, reproduisant l'organisation de ces cellules *in vivo*. Ceci tend à montrer que leurs conditions de culture 3D sont différentes des nôtres. Alors que des arguments montrent la cohérence de leurs résultats dans leurs conditions expérimentales. En effet, lorsque les auteurs étudient en immunofluorescence et par western blot l'expression de la E-cadhérine, leurs résultats confortent leur classement, montrant une perte ou une diminution de son expression uniquement dans les groupe type "grappe-like" et "stellaires". La perte d'expression de cette protéine est notamment associée à la transition épithélio-mésenchymateuse au cours de laquelle il y a une perte des jonctions adhérentes et de la polarité cellulaire et conduit à l'acquisition du phénotype invasif (Iglesias et al 2013). Une étude sur 3300 biopsies de tumeurs mammaires montre que l'absence ou la faible expression d'E-cadhérine dans les cancers mammaires est associée à une tumeur >2cm et au développement de métastases dans les ganglions lymphatiques (Bonetti et al 1996). En ce qui concerne notre test, nous classons dans un ordre de capacité invasive correspondant à la bibliographie des lignées appartenant à différents types de cancers et pas uniquement mammaire, en montrant ainsi la robustesse.

Dans notre test de migration, le réseau moléculaire formé par le Matrigel, constitue un maillage de densité élevée visualisé en microscopie électronique à balayage ; la taille des pores présents dans le gel a été évaluée comme étant inférieure à 2µm (Zaman et al 2006). Tout mouvement cellulaire en absence de dégradation de la matrice est exclu (Zaman et al 2005). Les cellules doivent donc utiliser un mode de migration qui nécessite l'utilisation de protéases solubles sécrétées ou associées à la surface cellulaire, incluant les MMPs et les sérines protéases pour une dégradation spécifique et localisée de la matrice (Raeber et al 2005). Une étude que nous avons réalisée antérieurement montre que la migration sur et dans le gel de Matrigel était principalement MMPs-dépendante. Nous avons donc testé le taux d'expression d'un ensemble de 12 MMPs dans différentes conditions expérimentales, les cellules posées sur ou piégés dans le gel 3D, avec et sans facteurs sériques. Globalement





toutes les lignées cellulaires que nous avons testées expriment les 12 MMPs choisies. Il est à noter cependant qu'il existe un groupe de protéases plus fortement exprimé par toutes les lignées, les MMP-12, -15, -11 et dans une moindre mesure MMP -3 et -9, dont le taux est non corrélé au potentiel invasif. Cependant, un petit groupe de protéases, parmi celles étudiées, ont un taux d'expression qui apparait corrélé au potentiel invasif des cellules. En l'occurrence, les MMP-14, -10 et -1 sont plus exprimées par le groupe de cellules très invasives par rapport aux cellules moyennement à faiblement invasives. Par ailleurs, lorsque les conditions expérimentales changent, nous n'observons que peu de différences. Par exemple, la présence du sérum augmente les taux d'expression globaux des protéases, tout en maintenant le même classement concernant l'importance des MMPs produites, et les mêmes différences observées entre les cellules peu ou très invasives.

Dans la littérature, de nombreuses études ont été réalisées en culture 2D pour évaluer le taux d'expression de MMPs sur certaines de nos lignées. Prenons l'exemple des MDA-MB-231. Dans nos différentes conditions expérimentales, l'ordre d'expression des MMPs de la plus exprimée à la moins exprimée est : MMP-12, -14, -15, -11, -3, -2, -9, -1, -13, -10, -7 et -8. Les résultats obtenus par différents laboratoires, sur cette lignée, présentent une grande disparité en fonction des conditions expérimentales. Une étude de 1998, présente l'expression des MMPs détectées lorsque les MDA-MB-231 sont cultivées sur plastique (extraction à 80% de confluence) en présence de SVF ; elles surexpriment un ensemble de protéases bien défini. Les ARNm des MMP-1 et -14 sont surexprimés à niveau équivalent et maximal, la MMP15 également, bien que plus faiblement présente. En revanche les MMP-2,-9 et -10 sont très faiblement représentées. Toutes les autres MMPs testées ne sont pas exprimées. (Giambardi et al 1998) Il a été montré que des variations d'expression des MMPs sont dépendantes du niveau de confluence des cellules. Notamment, les cellules MDA-MB-231 diminuent leur taux transcriptionnel de MMP-2 et -9 lorsque la densité cellulaire se rapproche de la confluence (Bachmeier et al 2005). C'est pour cette raison que Hegedus et al (2008) a choisi de réaliser son étude sur des cellules non confluentes. Bien que la dominance des MMP-14 et 15 se confirme, l'ordre d'expression des MMPs est différent de ce que nous avons obtenu, et la MMP-8 s'avère très présente. Lorsque les cellules sont cultivées sur un coating de Matrigel, l'expression des MMPs change (Balduyck et al 2000). Par exemple, la MMP-9 n'est pas exprimée sur plastique, alors qu'elle est présente lorsque les cellules sont cultivées sur Matrigel. Ainsi les taux d'expression d'ARNm de MMPs dépendent de nombreux facteurs en culture 2D *in vitro*, tels que la présence d'un coating (Balduyck et al 2008), l'état de



confluence des cellules (Bachmeier et al 2005) lorsqu'elles sont cultivées en présence de SVF. De plus, Kousidou et al (2004) montrent également des changements d'expression selon la présence ou l'absence de sérum. En comparant les résultats obtenus sur biopsies de patients en termes d'expression de MMPs et ceux que nous obtenons dans notre modèle simplifié, n'incluant cependant que des cellules tumorales, nous cherchons à déterminer la pertinence du modèle 3D sur Matrigel, développé au laboratoire.

Les taux d'expression de la MMP-12 que nous obtenons sont extrêmement élevés avec toutes les lignées cellulaires tumorales testées, et non corrélés par le potentiel invasif. Relativement peu de travaux ont été effectués sur la MMP-12 (métalloélastase des macrophages), en particulier dans le cancer du sein. L'étude de McGowan et Duffy (2008) montre que la forte expression de la MMP-12, dans des tumeurs du sein de grade élevé, est associée à une issue défavorable. Toutefois, l'expression élevée de la MMP-12 est un bon pronostic dans le cas de cancers colorectal et hépatique, (Yang et al 2001) et un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules (Hofmann et al 2005). Il a été suggéré que l'origine de production de la MMP-12 pourrait expliquer son rôle ambigu, favorable quand elle est produite par les cellules du stroma et défavorable lorsqu'elle est produite par les cellules tumorales (McGowan et Duffy 2008). Cependant sa localisation tissulaire sur biopsie n'a pas été clairement établie dans le cancer du sein. Nos résultats montrent clairement qu'elle est très fortement exprimée par les cellules tumorales mammaires et suggèrent qu'elle pourrait constituer un marqueur de diagnostic de cancer du sein, indépendamment de son stade de développement

En revanche, concernant la MMP-14, nous obtenons une expression différenciée, très élevée dans les cas de cellules à fort potentiel de migration en comparaison avec les cellules à potentiel invasif moyen. Des études ont montré qu'elle est un facteur de mauvais pronostic dans les cas de cancer du sein (Têtu et al 2006, McGowan et Duffy 2008). Elle est retrouvée au niveau du stroma péri-tumoral (Del Casar et al 2010) et majoritairement au niveau cytoplasmique des cellules tumorales (Köhrmann et al 2009 ; Dalberg et al 2000). La présence de cette MMP membranaire, a été corrélée avec la surexpression du récepteur à l'acide hyaluronique, le CD44, dans les tumeurs de type « Basal-like » et avec l'activation du système uPA/plasmine, augmentant ainsi la mobilité des cellules cancéreuses (Montgomery et al 2012) et permettant la transition épithélio-mésenchymateuse des lignées cellulaires cancéreuses (Noel et Foidart 1998).



De plus, la présence de MMP-14 à la membrane des cellules de cancer du sein leur confère une résistance à l'apoptose (Maquoi et al. 2012). Nos résultats en accord avec ceux de Têtu (2006) et McGowan et Duffy (2008), nous indiquent que la MMP-14 pourrait être un marqueur d'invasivité dans les cas de cancer du sein.

Les taux de MMP-10 et MMP-1 apparaissent également différemment régulés selon que les cellules soient moyennement ou très invasives. En ce qui concerne la MMP-1, des niveaux élevés d'ARNm sont un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du sein (Cheng 2008). Au niveau protéique, sa présence accrue est corrélée à un pronostic défavorable. Par ailleurs, très récemment, une localisation protéique inattendue de MMPs dans le noyau cellulaire a été observée. Cette présence nucléaire, dans le cancer mammaire, serait associée aux critères d'agressivité, incluant un pronostic défavorable ; la présence de MMP-1 est prédominante dans le noyau des cellules tumorales et non présente dans le tissu mammaire normal (Manello et Meda 2012). La MMP-1 a d'ailleurs été proposée comme un marqueur potentiel pour identifier des lésions mammaires bénignes susceptibles d'évoluer vers un cancer invasif (Poola 2005). Nos résultats sont donc cohérents avec les données de la littérature en rapport avec leur production par les cellules tumorales et leur présence accrue associée à un mauvais pronostic et suggèrent l'utilisation de la MMP-1 comme marqueur du potentiel invasif.

En revanche, très peu d'études rendent compte du taux d'expression d'ARNm de la MMP-10 dans le cancer du sein. Lorsqu'elle a été étudiée, aucune variation de taux n'a été clairement établie entre tissu normal et tumoral ou entre différents stades de développement de la tumeur (McGowan et al, 2002, Kohrman et al, 2009), même si elle est hautement surexprimée dans les cas de cancers du poumon (Regala 2011). Cependant une localisation nucléaire et cytoplasmique a été observée dans les cellules tumorales mammaires, et elle est absente dans les cellules stromales et immunitaires (Manello et Meda 2012). Ce résultat conforte celui que nous avons obtenu, lequel suggère son utilisation également comme marqueur du potentiel invasif.

Cette étude préliminaire nécessite de reproduire ces expériences de screening pour confirmer les résultats, qui suggèrent l'identification de la MMP-14, -1 et -10 comme marqueurs d'invasivité, et la MMP-12 et -15 comme marqueurs de diagnostic du cancer du sein. De plus la complexification du système, par ajout de cellules stromales, le rapprochera des conditions physiologiques et permettra d'affiner les résultats obtenus.



# Conclusion et perspectives

La dégradation enzymatique de la matrice par protéolyse joue un rôle central dans le développement tumoral en favorisant la mobilité des cellules cancéreuses ou la mise en place de néo-vaisseaux alimentant la tumeur en nutriment et oxygène. La MEC est assimilable à un gel. Indépendamment de la nature de la matrice et des protéases exprimées, les cellules cancéreuses, dégradent ce réseau gélifié à plusieurs reprises afin de permettre la colonisation de nouveaux tissus. Ces protéases sont présentes à des concentrations très faibles *in vivo*, leur diffusion est donc inhérente au mécanisme régissant la solubilisation de cette matrice.

Au cours de ce travail de thèse nous avons abordé différentes questions pour tenter de comprendre la liquéfaction enzymatique de gels de protéine.

La solubilisation de gels de gélatine dépend-elle de la nature de l'enzyme (nombre de sites de coupure, spécificité de l'enzyme) ? Lorsque la fraction volumique de gel augmente, le mécanisme de dégradation est-il différent ? Quels sont les paramètres cinétiques qui régissent la dégradation enzymatique des gels de protéines ? Quel serait alors le lien avec le mécanisme de diffusion de l'enzyme ?

Nous avons donc étudié la dégradation de gels de gélatine, système simplifié de matrice conjonctive, à différentes concentrations, et en faisant varier la concentration en enzyme en absence et en présence de glycérol, pour trois enzymes modèles. Nous avons montré que la relation entre les temps de dégradation en fonction de la concentration en enzyme dépend des fractions volumiques de gel ( $\alpha$ -chymotrypsine et protéinase K). La solubilisation enzymatique des gels correspond soit à un mécanisme de dégradation pour lequel l'enzyme (papaïne ;  $\alpha$ -chymotrypsine et protéinase K à fortes concentrations en gélatine) diffuse librement sur le réseau de gélatine, soit à un mécanisme de dégradation pour lequel l'enzyme diffuse dans le milieu et interagit avec le réseau jusqu'à trouver un site de coupure ( $\alpha$ -chymotrypsine et protéinase K à faibles concentrations en gélatine). Lorsque l'enzyme diffuse sur le réseau, le temps de dégradation est inversement proportionnel à la concentration en enzyme et la cinétique est toujours limitée par la réaction.

Pour l' $\alpha$ -chymotrypsine il est possible d'avoir deux modes de diffusion de l'enzyme. Le premier est ralenti et l'enzyme se déplace dans le solvant pour aller de sites de coupure en





sites de coupure. L'exposant, déterminé expérimentalement, de la loi de puissance du temps de dégradation en fonction de la concentration en enzyme de 1,8 suppose des interactions non spécifiques de type hydrophobe avec le substrat, puisque l'écrantage des charges de surface n'a pas modifié le mécanisme de dégradation observé. Le second mode de diffusion, est une diffusion libre sur le gel impliquant des interactions électrostatiques.

Lorsque la diffusion est anormale (ralentie), le temps de dégradation du gel en fonction de la concentration en enzyme suit une loi de puissance,  $t_c \propto 1/[E]^{1/\beta}$  et l'exposant  $1/\beta$  est dépendant de la fraction volumique de gel. Dans ce cas, l'effet du changement de la viscosité du milieu montre que la cinétique est limitée par la diffusion. Lorsque l'enzyme se déplace sur le réseau, elle est limitée par la réaction.

Ces deux modes de diffusion ont également été démontrés pour la protéinase K, à des concentrations en gélatine variant de 1 à 10%. Dans cette même gamme de concentrations, pour les expériences précédemment réalisées sur la dégradation de gels par la thermolysine le mécanisme indirect de diffusion a été trouvée anormal et la cinétique est limitée par la diffusion. Tandis que la solubilisation de gels par la papaine est associée à une diffusion normale et à une cinétique limitée par la réaction. La possibilité d'envisager un mécanisme de dégradation universel n'est pas exclue, si la gamme de concentration en gélatine pouvait être étendue, ou en changeant le type de gel. La thermolysine possède une charge globale négative, comme le réseau de gélatine, et un changement de mécanisme pourrait être envisageable pour des concentrations en gel supérieures à 10% ; tandis que pour la papaine, des concentrations inférieures à 1% auraient été nécessaires mais ne sont pas possibles car la solution de gélatine ne formerait plus un gel. Ces gammes de gélatine étant inaccessibles expérimentalement, il est envisagé un changement de substrat gélifié.

La modélisation de ces résultats permettra de mieux appréhender ces mécanismes. Nous allons modéliser le déplacement d'une enzyme dans un réseau en une dimension ou deux dimensions et en intégrant au cours de la diffusion de l'enzyme des sites d'interaction pouvant retenir l'enzyme sur des temps variables, en changeant la taille de la maille et la concentration en enzyme. Nous devrions pouvoir suivre le déplacement de l'enzyme par calcul du déplacement quadratique moyen et estimer l'exposant de diffusion qui est inversement proportionnel à celui mesuré dans nos expériences.

Selon la façon dont l'enzyme va diffuser et dégrader le réseau nous pourrions comparer les simulations aux résultats expérimentaux. Ainsi, l'exposant de diffusion anormal ( $1/\beta$ )



retrouvé dans nos expériences évoluera en loi de puissance du temps, alors que l'exposant caractéristique d'un mécanisme brownien permettra d'observer une évolution du déplacement quadratique moyen proportionnel au temps.

Deux hypothèses permettraient de rendre compte de tels mécanismes.

La première hypothèse pour expliquer le comportement très ralenti des enzymes est basée sur le modèle de continuum percolation. L'enzyme, lorsque son exposant est anormal (supérieur à  $4/3$ ), diffuse entre les mailles et se retrouve piégée sur des sites collants. L'augmentation du pourcentage de gélatine, réduisant la maille, augmente le nombre de nœuds composants le réseau. Si les sites d'interaction non spécifique sont impliqués dans la formation de réticulations, leur nombre diminue avec l'augmentation du nombre de mailles (transition observée pour l' $\alpha$ -chymotrypsine et la protéinase K) jusqu'à permettre une diffusion libre de l'enzyme sur le réseau.

La seconde hypothèse s'appuie sur le modèle de diffusion des enzymes de restriction et des polymérase sur l'ADN. Ce qui détermine alors la capacité de l'enzyme à dégrader son substrat est la longueur de l'ADN flanquant le site de restriction. Des séquences courtes limitent la capacité de l'enzyme à dégrader le substrat. Tout d'abord l'enzyme s'associe de façon non-spécifique avec le brin d'ADN puis diffuse le long de celui-ci. Elle diffuse au hasard sur un nombre de nucléotides défini puis, se dissocie, si elle ne trouve pas de site d'interaction spécifique (site de restriction). Chaque enzyme interagit avec l'ADN sur plus ou moins de bases et donc se dissocie plus ou moins fréquemment, les dissociations ralentissant le mécanisme de dégradation.

Les comportements observés avec des gels de gélatine sont-ils généralisables à d'autres gels de protéine ? Nous envisageons des expériences avec un système modèle de MEC, le Matrigel, afin de comparer les mécanismes de dégradation enzymatique.

Par ailleurs, les protéases membranaires sont importantes dans l'invasion cellulaire. Nous pourrions fonctionnaliser des billes avec des enzymes et les emprisonner dans des gels et suivre la solubilisation enzymatique du réseau.

Quel pourrait être le sens physiologique de tels mécanismes de régulation de l'activité d'une enzyme, qui varie en fonction de la densité du réseau matriciel et qui dépendent des propriétés d'interaction électrostatique avec ce réseau ?



La stromatogénèse est la formation d'un nouveau stroma spécifique, dans l'environnement péri-tumoral et dans les sites d'invasion de cellules tumorales. Elle fait partie intégrante du processus d'invasion. Ce dernier se caractérise par une densification de la matrice et une augmentation de sa rigidité. Le stroma nouvellement formé en étant coincé entre des plans de tissu de moindre résistance perturbe la continuité des structures normales créant des chemins de clivage pour les cellules tumorales invasives. Il est supposé que la formation de ce nouveau stroma est générée et dirigée par les cellules tumorales invasives avec la complicité des fibroblastes activés adjacents. Des études suggèrent que la présence de néo-stroma est complémentaire de l'activité métabolique des cellules cancéreuses, importante pour séparer les déchets produits par les cellules cancéreuses et pour la prévention de la mort cellulaire par acidose (Giatromanolaki 2007).

Cependant, une rigidification de la matrice entourant les cellules cancéreuses semble contradictoire avec la nécessité de dégrader celle-ci dans le processus métastatique. Or nous avons vu qu'une densification de la matrice modèle (collagène I dénaturé) permettait aux enzymes de modifier leur mécanisme de dégradation, en évoluant vers une diffusion brownienne donc indépendante du milieu. Ce changement dans le mécanisme de dégradation pourrait procurer un avantage aux cellules tumorales dans le processus d'invasion. Ces résultats suggèrent la mise en évidence d'un nouveau mode de régulation de l'activité enzymatique, qui pourrait également être impliquée dans le remaniement d'une autre matrice densifiée observée lors du processus de réparation tissulaire.

Les résultats, mettant en évidence deux modes de dégradation de réseaux gélifiés ont été obtenus avec des enzymes modèles non impliquées physiologiquement dans le remaniement matriciel. Nous envisageons de collecter des milieux conditionnés au cours de cultures de cellules normales ou tumorales, sur réseaux 3D ou sur plastique afin de comparer les mécanismes de dégradation relatifs à l'ensemble des protéases exprimées par ces cellules, sur des gels de gélatine à différentes fractions volumiques.

Le 2<sup>ème</sup> objectif de ma thèse a été de réaliser une étude à un niveau plus complexe qui a consisté à cultiver des cellules tumorales mammaires en présence d'une matrice mimant la lame basale, selon un modèle d'étude développé au laboratoire. Pour caractériser les protéases impliquées dans la migration des cellules cancéreuses, nous avons mis en place un test pour évaluer le taux d'expression d'ARNm par RT-PCR semi-quantitative de 12 métalloprotéases



sur 6 lignées de cancer du sein ayant des potentiels invasifs distincts. Nous restreignons notre étude à l'expression de protéases par les cellules tumorales sans prendre en compte la production des autres cellules de l'environnement de la tumeur, tels que les fibroblastes ou les cellules du système immunitaire. Bien qu'il ne s'agisse que de tests préliminaires, les résultats montrent une surexpression par les cellules tumorales de MMP-14, et dans une moindre mesure des MMP-10 et -1 par les cellules les plus invasives; ce qui nous permet de les identifier comme marqueurs potentiels de tumeurs de grade élevé. Par ailleurs, d'autres MMPs non régulées en fonction du potentiel invasif s'avèrent très fortement surexprimées, en particulier le MMP-12, -15 et -11, et de façon plus modérée, les MMP-3 et -9. Ces résultats suggèrent leur utilisation comme marqueur de diagnostic du cancer du sein, indépendamment du stade de développement de la tumeur.

Pour les MMPs très fortement exprimées, il paraît envisageable de les retrouver dans les fluides corporels et de pouvoir les détecter au niveau protéique. Des études antérieures ont été effectuées majoritairement sur la MMP-9, et de façon moindre sur la MMP-2 et la MMP-1. La détection des MMP-9 et -2 apparaît corrélée au stade histologique des tumeurs, et leur surexpression est retrouvée chez des patientes atteintes de cancer métastatique. Peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent et l'apparition de techniques plus sensibles devraient permettre d'élargir le champ de prospection. La technique des nanopores, maîtrisée au laboratoire pourrait également permettre la détection des ARNm de ces protéases, libérées par la tumeur, dans les fluides de patientes atteintes de cancers du sein.

Dans cette étude préliminaire, le modèle d'étude sur gel 3D apporte majoritairement une stabilité des résultats en termes d'expression, par les cellules tumorales, de MMPs dominantes non régulées et de MMPs régulés en fonction du potentiel invasif. Les résultats obtenus sont majoritairement indépendant des conditions de culture, et ceci contrairement aux cultures 2D sur plastique et sur coating. Ces résultats nous confortent dans l'idée que le modèle d'étude sur gel pourrait permettre d'identifier de nouveaux marqueurs tumoraux, et d'identifier les cellules majoritairement responsables de leur production (cellules tumorales, fibroblastes ou cellules du système immunitaire). En effet, nous envisageons de complexifier notre modèle, par l'ajout de cellules du stroma tumoral, afin d'étudier la communication entre les différentes cellules, par facteurs diffusibles, sur la régulation des taux d'expression de MMPs. Les résultats obtenus sur biopsies apparaissent complexes et parfois contradictoires, à la fois sur les MMPs exprimées et sur les types cellulaires qui les produisent. Nous pourrions envisager, par l'utilisation de ce système d'étude *in vitro*, de clarifier ces aspects.





## Références bibliographiques

- Abete T, de Candia A, Lairez D, Coniglio A. Percolation model for enzyme gel degradation. *Phys Rev Lett.* 2004 Nov 26;93(22):228301
- Adam A., Lairez D. Sol-Gel transition. p.87-P.139. *Physical properties of polymeric gels.* John Wiley and Sons.1996.
- Ala-aho R, Kähäri VM. Collagenases in cancer. *Biochimie* 87 (2005) 273–286
- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* 1987 Jun 15;47(12):3239-45
- Al-Raawi D, Abu-El-Zahab H, El-Shinawi M, Mostafa Mohamed M. Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlates with the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in inflammatory breast cancer. *Int J Clin Exp Med* 2011;4(4):265-275
- Andarawewa KL, Motrescu ER, Chenard MP, Gansmuller A, Stoll I, Tomasetto C, Rio MC. Stromelysin-3 is a potent negative regulator of adipogenesis participating to cancer cell-adipocyte interaction/crosstalk at the tumor invasive front. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10862-71
- Artacho-Cordón F, Ríos-Arrabal S, Lara PC, Artacho-Cordón A, Calvente I, Núñez MI. Matrix metalloproteinases: Potential therapy to prevent the development of second malignancies after breast radiotherapy. *Surgical Oncology* 21 (2012) 143-151
- Aumailley A, Verrando P. Structure et pathologies des membranes basales. *Médecine/sciences* 1993 ; 9 : 926-33
- Bachmeier BE, Albini A, Vené R, Benelli R, Noonan D, Weigert C, Weiler C, Lichtinghagen R, Jochum M, Nerlich AG. Cell density-dependent regulation of matrix metalloproteinase and TIMP expression in differently tumorigenic breast cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 2005 Apr 15;305(1):83-98
- Balbín M, Fueyo A, Tester AM, Pendás AM, Pitiot AS, Astudillo A, Overall CM, Shapiro SD, López-Otín C. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. *Nature Genetics* volume 35 number 3 november 2003 252-257
- Balbín M, Pendás AM, Uría JA, Jiménez MG, Freije JP, López-Otín C. Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS.* 1999 Jan;107(1):45-53
- Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G, Thiebaut C, Lemaire V, Dacquembronne E, Duhem T, Lebrun A, Dejonghe MJ, Huet G. Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(2):171-8
- Barresi R, Campbell KP. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J Cell Sci.* 2006 Jan 15;119(Pt 2):199-207
- Batra J, O'Mara T, Patnala R, Lose F, Clements JA. Genetic polymorphisms in the human tissue kallikrein (KLK) locus and their implication in various malignant and non-malignant diseases. *Biol. Chem.* 2012; 393(12): 1365–1390



- Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int. J. Cancer*: 128, 1751–1757 (2011)
- Berry H, Pelta J, Lairez D, Larreta-Garde V. Gel-sol transition can describe the proteolysis of extracellular matrix gels. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Dec 15;1524(2-3):110-7
- Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. *Curr Mol Med*. 2012 Jan;12(1):96-110
- Bix G, Iozzo RV. Matrix revolutions: ‘tails’ of basement-membrane components with angiostatic functions. *TRENDS in Cell Biology* Vol.15 No.1 January 2005
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10):R214
- Blétard N, Detrembleur N, Scagnol I, Delbecque K, Deprez M, Thiry A, Labert Ch, Mutijima E, Delvenne Ph. CANCER DU SEIN : importance de la nomenclature anatomo-pathologique. *Rev Med Liège* 2011; 66 : 5-6 : 254-260
- Bonetti A, Zaninelli M, Rodella S, Molino A, Sperotto L, Piubello Q, Bonetti F, Nortilli R, Turazza M, Cetto GL. Tumor proliferative activity and response to first-line chemotherapy in advanced breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 1996;38(3):289-97
- Breton MF, Thiébot B, Delassault B, Lairez D, Zalczer G, Pelta J. Gel proteolysis: anomalous diffusion and diffusion limited kinetics. (En préparation)
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *nature reviews cancer* volume 6 november 2006 857-866
- Campone M, Berton-Rigaud D, Bourbouloux E, Sadot S, Zanetti A, Frenel JS. Les cancers du sein HER2 : que devons-nous retenir dans notre pratique clinique quotidienne ? *Bull Cancer* vol. 98 N° 2 février 2011 (154-163)
- Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Journal of Cell Science* 118, 1341-1353
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other Diseases. *Nature* vol 407 14 september 2000
- Carney WP, Bernhardt D, Jasani B. Circulating HER2 Extracellular Domain: A Specific and Quantitative Biomarker of Prognostic Value in all Breast Cancer Patients? *Biomark Cancer*. 2013 Aug 12;5:31-39
- Cawston TE, Young DA. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res* (2010) 339:221–235
- Chatterjee D, Cherayil BJ. A model of anomalous enzyme-catalyzed gel degradation kinetics. *J Phys Chem B*. 2010 Apr 22;114(15):5190-5
- Cheng G, Tse J, Jain RK, Munn LL. Micro-environmental mechanical stress controls tumor spheroid size and morphology by suppressing proliferation and inducing apoptosis in cancer cells. *PLoS One*. 2009;4(2):e4632



- Cheng S, Tada M, Hida Y et al. High MMP-1 mRNA expression is a risk factor for disease-free and overall survivals in patients with invasive breast carcinoma. *J Surg Res* 2008 May 1;146(1):104-9
- Cho EY, Choi YL, Han JJ, Kim KM, Oh YL. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Pathol Int.* 2008 Jan;58(1):17-25.
- Correia AL, Mori H, Chen EI. The hemopexin domain of MMP3 is responsible for mammary epithelial invasion and morphogenesis through extracellular interaction with HSP90b. *Genes Dev.* 2013 27: 805-817
- Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CKY, Hicks J, Reis-Filho JS. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: Revisited. *Molecular Oncology* 7 (2013) 859-869
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology* 2002, 14:633–639
- Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. *Connective Tissues: Matrix Composition and Its Relevance to Physical Therapy* phys ther. 1999; 79:308-319.
- Dalberg K, Eriksson E, Enberg U, Kjellman M, Bäckdahl M. Gelatinase A, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and extracellular matrix metalloproteinase inducer mRNA expression: correlation with invasive growth of breast cancer. *World J Surg.* 2000 Mar;24(3):334-40
- Dauplat MM, Penault-Llorca F. Classification des lésions pré invasives et des carcinomes in situ : doutes, controverses, proposition de nouvelles classifications. *Bull Cancer* 2004 ; 91 (special) : S205-10
- De Cremoux P. Hormonothérapie des cancers du sein. *Bull Cancer* 2011 ; 98 : 1311-1319
- De Gennes PG. On a relation between percolation theory and the elasticity of gels. *le journal de physique - lettres* tome 37, janvier 1976
- Del Casar JM, Carreño G, González LO, Junquera S, González-Reyes S, González JM, Bongera M, Merino AM, Vizoso FJ. Expression of metalloproteases and their inhibitors in primary tumors and in local recurrences after mastectomy for breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Jul;136(7):1049-58
- DiMilla PA, Stone JA, Quinn JA, Albelda SM, Lauffenburger DA. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol.* 1993 Aug;122(3):729-37.
- Djabourov M, Nishinari K, Murphy SBR. Physical gels from biological and synthetic polymer p64-80 (2013)
- Duffy MJ. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem.* 2006 Mar;52(3):345-51. Epub 2006 Jan 12.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* volume 2 march 2002 161-174
- Ehbrecht HJ, Pingoud A, Urbanke C, Maass G, Gualerzi C. Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA. *J Biol Chem.* 1985 May 25;260(10):6160-6
- Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *The Journal Of Cell Biology*, vol 54, 1972, 626-637



- Elson EL, Genin GM. The role of mechanics in actin stress fiber kinetics. *Exp Cell Res.* 2013 Oct 1;319(16):2490-500
- Engel J, Hunter I, Schulthess T, Beck K, Dixon TW, Parry DA. Assembly of laminin isoforms by triple- and double-stranded coiled-coil structures. *Extracellular Matrix in Health and disease* (1991)
- Entschladen F, Drell TL 4th, Lang K, Masur K, Palm D, Bastian P, Niggemann B, Zaenker KS. Analysis methods of human cell migration. *Exp Cell Res.* 2005 Jul 15;307(2):418-26
- Even-Ram S, Yamada KM. Cell migration in 3D matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 Oct;17(5):524-32
- Fadda GC, Lairez D, Arrio B, Carton JP, Larreta-Garde V. Enzyme-catalyzed gel proteolysis: an anomalous diffusion-controlled mechanism. *Biophys J.* 2003 Nov;85(5):2808-17
- Fata JE, Ho ATV, Leco J, Moorehead RA, Khokha R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 77–95
- Fata JE, Werb Z, Bissell MJ. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res* 2004, 6:1-11
- Fernández CA, Yan L, Louis G, Yang J, Kutok JL, Moses MA. The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 1;11(15):5390-5
- Figueira RC, Gomes LR, Neto JS, Silva FC, Silva ID, Sogayar MC. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. *BMC Cancer.* 2009 Jan 14;9:20
- Flory PJ. Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. I. *Gelation Nov.,* 1941
- Folkman J. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.* 2006. 57:1–18
- Fowlkes JL, Winkler MK. Exploring the interface between metallo-proteinase activity and growth factor and cytokine bioavailability. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13 (2002) 277–287
- Friedl P, Bröcker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Jan 20;57(1):41-64
- Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 2010 Jan 11;188(1):11-9
- Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki H, Tominaga T. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jan 15;89(2):139-47
- Gau J. Mémoire de DEA de l'université de Cergy-Pontoise. Dégradation enzymatique de gels de protéines. 2002-2003
- Gawlik and Durbeej: Skeletal muscle laminin and MDC1A: pathogenesis and treatment strategies. *Skeletal Muscle* 2011 1:9





- Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003 Nov 28;55(12):1531-46
- Ghibaudo M, thèse de doctorat de l'université Paris Diderot. Influence des propriétés mécaniques du substrat sur la migration et l'adhésion cellulaire. 4 décembre 2008.
- Giambernardi TA, Grant GM, Taylor GP, Hay RJ, Maher VM, McCormick JJ, Klebe RJ. Overview of matrix metalloproteinase expression in cultured human cells. *Matrix Biol.* 1998 Mar;16(8):483-96
- Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP. Nucleic acids, protein synthesis, and molecular genetics: Mapping and Characterization of the Functional Domains Responsible for the Differential Activity of the A and B Isoforms of the Human Progesterone Receptor. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:32889-32900
- Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. The Pathology of Tumor Stromatogenesis. *Cancer Biol Ther.* 2007 Jun 26;6(6)
- Giraud-Guille MM, Mosser G, Belamie E. Liquid crystallinity in collagen systems in vitro and in vivo. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13 (2008) 303–313
- González LO, Corte MD, Junquera S, González-Fernández R, Del Casar JM, García C, Andicoechea A, Vázquez J, Pérez-Fernández R, Vizoso FJ. Expression and prognostic significance of metalloproteases and their inhibitors in luminal A and basal-like phenotypes of breast carcinoma. *Hum Pathol.* 2009 Sep;40(9):1224-33
- González LO, González-Reyes S, Junquera S, Marín L, González L, Del Casar JM, González JM, Vizoso F. Expression of metalloproteases and their inhibitors by tumor and stromal cells in ductal carcinoma in situ of the breast and their relationship with microinvasive events. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010 Sep;136(9):1313-21
- Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL. Characterization of Progesterone Receptor A and B Expression in Human Breast Cancer. *Cancer research* 55, 5063-5068, November 1, 1995
- Gu LQ, Wanunu M, Wang MX, McReynolds L, Wang Y. Detection of miRNAs with a nanopore single-molecule counter. *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 Jul;12(6):573-84
- Ha HY, Moon HB, Nam MS, Lee JW, Ryoo ZY, Lee TH, Lee KK, So BJ, Sato H, Seiki M, Yu DY. Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):984-90
- Ha HY, Moon HB, Nam MS, Lee JW, Ryoo ZY, Lee TH, Lee KK, So BJ, Sato H, Seiki M, Yu DY. Overexpression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 gene induces mammary gland abnormalities and adenocarcinoma in transgenic mice. *Cancer Res.* 2001 Feb 1;61(3):984-90.
- Halfter W, Candiello J, Hu H, Zhang P, Schreiber E, Balasubramani M. Protein composition and biomechanical properties of in vivo-derived basement membranes. *Cell Adhesion & Migration* 7:1, 64–71; January/February 2013.
- Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Ppausch F, Sorokin LM. Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature. *Physiol Rev* 85: 979–1000, 2005



- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74
- Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000
- Hegedüs L, Cho H, Xie X, Eliceiri GL. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *J Cell Physiol*. 2008 Aug;216(2):480-5
- Heimann R, Hellman S. Individual characterisation of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2000 Aug;36(13 Spec No):1631-9
- Heppner KJ, Matrisian LM, Jensen RA, Rodgers WH. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *Am J Pathol*. 1996 Jul;149(1):273-82
- Hofmann HS, Hansen G, Richter G, Taege C, Simm A, Silber RE, Burdach S. Matrix metalloproteinase-12 expression correlates with local recurrence and metastatic disease in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1086-92
- Hohenester E, Yurchenco PD. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adhesion & Migration* 7:1, 56–63; January/February 2013.
- Honahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, March 4, 2011 646-674
- Howard BA, Gusterson BA. Human Breast Development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 5, No. 2, 2000
- Hu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev*. 2000 14: 2123-2133
- Huang C, Jin H, Song B, Zhu X, Zhao H, Cai J, Lu Y, Chen B, Lin Y. The cytotoxicity and anticancer mechanisms of alterporriol L, a marine bianthraquinone, against MCF-7 human breast cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Jan;93(2):777-85
- Iglesias M J, Beloqui I, Garcia-Garcia F, Leis O, Vazquez-Martin A, Eguiara A, Cufi S, Pavon A, Menendez JA, Dopazo J, Martin AG. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS One*. 2013 Oct 4;8(10):e77281
- Inoué S, Leblond CP, Laurie GW. Ultrastructure of Reichert's Membrane, a Multilayered Basement Membrane in the Parietal Wall of the Rat Yolk Sac. *The Journal Of Cell Biology*, vol 97 November 1983 1524-1537.
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. HER-2/neu Protein Expression in Breast Cancer Evaluated by Immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 2000;113:251-258
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90
- Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mason MD, Mokbel K, Mansel RE. Targeting matrilysin and its impact on tumor growth in vivo: the potential implications in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):6012-9
- Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovascular Research* 59 (2003) 812–823



- Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H, Seiki M. Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Cleaves CD44 and Promotes Cell Migration. *The Journal of Cell Biology*, Volume 153, 893-904, 2001
- Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer* volume 6 may 2006
- Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *nature reviews cancer* volume 3 june 2003, 422-433
- Karsdal MA, Nielsen MJ, Sand JM, Henriksen K, Genovese F, Bay-Jensen AC, Smith V, Adamkewicz JL, Christiansen C, Leeming DJ. Extracellular Matrix Remodeling: The Common Denominator in Connective Tissue Diseases. *ASSAY and Drug Development Technologies*, vol. 11 no. 2, march 2013.
- Kass L, Erler JT, Dembo M, Weaver VM. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 ; 39(11): 1987–1994
- Ke Y, Lesperance J, Zhang EE, Bard-Chapeau EA, Oshima RG, Muller WJ, Feng GS. Conditional Deletion of Shp2 in the Mammary Gland Leads to Impaired Lobulo-alveolar Outgrowth and Attenuated Stat5 Activation. *J Biol Chem.* 2006 November 10; 281(45): 34374–34380
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol.* 2007 Jun;1(1):84-96
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell.* 2010 April 2; 141(1): 52–67
- Khokha R, Werb Z. Mammary Gland Reprogramming: Metalloproteinases Couple Form with Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004333
- Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian Collagen IV. *Microscopy Research and Technique* 71:357–370 (2008)
- Kim HY, Nelson CM. Extracellular matrix and cytoskeletal dynamics during branching morphogenesis. *Organogenesis* 8:2, 56–64; April/May/June 2012
- Kim JB. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 2005 Oct;15(5):365-77
- Kittaneh M, Montero AJ, Glück S. Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark Cancer.* 2013 Oct 29;5:61-70
- Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* (2011) 41:271–290
- Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology* 15 (2005) 378–386
- Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer.* 2009 Jun 16;9:188
- Koike C, McKee TD, Pluen A, Ramanujan S, Burton K, Munn LL, Boucher Y, Jain RK. Solid stress facilitates spheroid formation: potential involvement of hyaluronan. *Br J Cancer.* 2002 Mar 18;86(6):947-53



- Kousidou OC, Roussidis AE, Theocharis AD, Karamanos NK. Expression of MMPs and TIMPs genes in human breast cancer epithelial cells depends on cell culture conditions and is associated with their invasive potential. *Anticancer Res.* 2004 Nov-Dec;24(6):4025-30
- Kraning-Rush CM, Carey SP, Lampi MC, Reinhart-King CA. Microfabricated collagen tracks facilitate single cell metastatic invasion in 3D. *Integr Biol (Camb).* 2013 Mar;5(3):606-16
- Kretschmer C, Sterner-Kock A, Siedentopf F, Schoenegg W, Schlag PM, Kemmner W. Identification of early molecular markers for breast cancer. *Mol Cancer.* 2011 Feb 11;10(1):15
- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988 Oct;107(4):1589-98
- Kulić A, Dedić Plavetić N, Vrbanc J, Sirotković-Skerlev M. Low serum MMP-1 in breast cancer: a negative prognostic factor? *Biomarkers.* 2012 Aug;17(5):416-21
- Kupferman ME, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol.* 2000 Dec;157(6):1777-83.
- Kutys ML, Doyle AD, Yamada KM. Regulation of cell adhesion and migration by cell-derived matrices. *Exp Cell Res.* 2013 Oct 1;319(16):2434-9
- La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer.* 2004 Apr 5;90(7):1414-21
- Lairez D, Carton JP, Zalczer G, Pelta J. Scaling and continuum percolation model for enzyme-catalyzed gel degradation. *Phys Rev Lett.* 2007 Jun 1;98(22):228302
- Lamarca HL, Rosen JM. Minireview: Hormones and Mammary Cell Fate—What Will I Become When I Grow Up? *Endocrinology* 149(9):4317–4321 (2008)
- Lamerz R, Stieber P, Fateh-Moghadam A. Serum marker combinations in human breast cancer (review). *In Vivo.* 1993 Nov-Dec;7(6B):607-13
- Lange JR, Fabry B. Cell and tissue mechanics in cell migration. *Exp Cell Res.* 2013 Oct 1;319(16):2418-23
- Langevin MH. Connective tissue: A body-wide signaling network? *Medical Hypotheses* (2006) 66, 1074–1077
- Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 2006, 18:463–471
- Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.* 2007 April ; 4(4): 359–365
- Lekka M. Atomic force microscopy: A tip for diagnosing cancer. *Nat Nanotechnol.* 2012 Nov;7(11):691-2





- Levi E, Fridman R, Miao Hq, Ma Ys, Yayon A, Vlodavsky I. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, pp. 7069-7074, July 1996
- Lewis MT. Homeobox genes in mammary gland development and neoplasia. *Breast Cancer Res* 2000, 2:158–169
- Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006 Feb;19(2):264-71
- López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *nature reviews cancer* volume 7 october 2007
- López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer.* 2007 Oct;7(10):800-8
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
- Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*; 3(12). (2011)
- Lurkin A, Ducimetière F, Ranchère Vince D, Decouvelaere AV, Cellier D, Gilly FN, Salameire D, Biron P, De Laroche G, Blay JY, Ray-Coquard I. Epidemiological evaluation of concordance between initial diagnosis and central pathology review in a comprehensive and prospective series of sarcoma patients in the Rhone-Alpes region. *BMC Cancer* 2010, 10:150
- Mallon E, Osin P, Blain I, Howard B, Gusterson B. The Basic Pathology of Human Breast Cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, Vol. 5, No. 2, 2000
- Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem.* 2012 Mar;47(1):27-58
- Maquoi E, Assent D, Detilleux J, Pequeux C, Foidart JM, Noël A. MT1-MMP protects breast carcinoma cells against type I collagen-induced apoptosis. *Oncogene.* 2012 Jan 26;31(4):480-93
- Martin M, Matrisian L. Matrix metalloproteinases as prognostic factors for cancer. *CLI* October 2004
- McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann Oncol.* 2008 Sep;19(9):1566-72
- Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005 Jul 28;436(7050):518-24
- Miron-Mendoza M, Koppaka V, Zhou C, Petroll WM. Techniques for assessing 3-D cell-matrix mechanical interactions in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* 2013 Oct 1;319(16):2470-80
- Montel F, Delarue M, Elgeti J, Malaquin L, Basan M, Risler T, Cabane B, Vignjevic D, Prost J, Cappello G, Joanny JF. Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Phys Rev Lett.* 2011 Oct 28;107(18):188102



- Montel V, Kleeman J, Agarwal D, Spinella D, Kawai K, Tarin D. Altered metastatic behavior of human breast cancer cells after experimental manipulation of matrix metalloproteinase 8 gene expression. *Cancer Res.* 2004 Mar 1;64(5):1687-94
- Montgomery N, Hill A, McFarlane S, Neisen J, O'Grady A, Conlon S, Jirstrom K, Kay EW, Waugh DJ. CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Res.* 2012 May 23;14(3):R84
- Mousseau M, Garnier C. Cancer du sein : épidémiologie, bilan d'extension, modalités thérapeutiques. *Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique - 2002 - vol.26 - n°1, 7-21*
- Mukhtar RA, Moore AP, Tandon VJ, Nseyo O, Twomey P, Adisa CA, Eleweke N, Au A, Baehner FL, Moore DH, McGrath MS, Olopade OI, Gray JW, Campbell MJ, Esserman LJ. Elevated levels of proliferating and recently migrated tumor-associated macrophages confer increased aggressiveness and worse outcomes in breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012 Nov;19(12):3979-86
- Müller A, Hinrichs W, Wolf WM, Saenger W. Crystal structure of calcium-free proteinase K at 1.5-Å resolution. *J Biol Chem.* 1994 Sep 16;269(37):23108-11
- Muthuswamy SK, Li D, Lelievre S, Bissell MJ, Brugge JS. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):785-92
- Naccarato AG, Viacava P, Vignati S, Fanelli G, Bonadio AG, Montruccoli G, Bevilacqua G. Bio-morphological events in the development of the human female mammary gland from fetal age to puberty. *Virchows Arch (2000)* 436:431–438
- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 69 (2006) 562 – 573
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006 Dec;10(6):515-27
- Nicolini A, Carpi A, Tarro G. Biomolecular markers of breast cancer. *Frontiers in Bioscience* 11, 1818-1843, May 1, 2006
- Nishigami Y, Ichikawa M, Kazama T, Kobayashi R, Shimmen T, Yoshikawa K, Sonobe S. Reconstruction of active regular motion in amoeba extract: dynamic cooperation between sol and gel states. *PLoS One.* 2013 Aug 5;8(8):e70317
- Noël A, Foidart JM. The role of stroma in breast carcinoma growth in vivo. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1998 Apr;3(2):215-25
- O'Brien KM, Cole SR, Engel LS. Breast cancer subtypes and previously established genetic risk factors: A Bayesian approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* Published OnlineFirst October 31, 2013.
- Olson MF, Sahai E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis.* 2009;26(4):273-87



- Orgel JPRO, Irving TC, Miller A, Wess TJ. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *PNAS*, June 13, 2006, vol. 103 no. 24 9001–9005
- Overall CM, Kleinfeld O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* volume 6 march 2006 2257-239
- Page H, Flood P, Reynaud EG. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. *Cell Tissue Res.* 2013 Apr;352(1):123-31
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 March ; 8(3): 221–233
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1160-7
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, Hammer DA, Weaver VM. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell: september 2005, vol. 8*
- Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Seminars in cancer biology*, Vol. 12, 2002: pp. 197–207.
- Pelekanou V, Leclercq G. Recent insights into the effect of natural and environmental estrogens on mammary development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 869-878 (2011)
- Pelta J. Approche biophysique du repliement de protéines multidomaines et de l'invasion cellulaire HDR (2005)
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
- Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Oct 1;89(19):9064-8
- Plodinec M, Loparic M, Monnier CA, Obermann EC, Zanetti-Dallenbach R, Oertle P, Hyotyla JT, Aebi U, Bentires-Alj M, Lim RY, Schoenenberger CA. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat Nanotechnol.* 2012 Nov;7(11):757-65
- Polette M, Gilbert N, I. Stas, Nawrocki B, Noel A, Remacle A, Stetler-Stevenson WG, Birembaut R, Foidart M. Gelatinase A expression and localization in human breast cancers. An in situ hybridization study and immunohistochemical detection using confocal microscopy. *Virchows Archiv* (1994) 424:641-645
- Polyak K, Kalluri R. The Role of the Microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003244
- Poola I, DeWitty RL, Marshalleck JJ, Bhatnagar R, Abraham J, Leffall LD. Identification of MMP-1 as a putative breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. *Nat Med.* 2005 May;11(5):481-3



- Powell WC, Fingleton B, Wilson CL, Boothby M, Matrisian LM. The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis. *Current Biology* 1999, 9:1441–1447
- Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18(2):123-33
- Prockop DJ. Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 1995. 64:403-34
- Przemyslaw L, Boguslaw HA, Elzbieta , Malgorzata SM. ADAM and ADAMTS family proteins and their role in the colorectal cancer etiopathogenesis. *BMB Rep.* 2013 Mar;46(3):139-50.
- Radisky ES, Radisky DC. Matrix Metalloproteinase-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2010) 15:201–212
- Raeber GP, Lutolf MP, Hubbell JA. Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. *Biophys J.* 2005 Aug;89(2):1374-88
- Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO. Prognostic Significance of Nottingham Histologic Grade in Invasive Breast Carcinoma. *Journal of clinical oncology*, volume 26 number 19 july 1 2008, 3153-3158
- Ranuncolo SM, Armanasco E, Cresta C, Bal De Kier Joffe E, Puricelli L. Plasma MMP-9 (92 kDa-MMP) activity is useful in the follow-up and in the assessment of prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2003 Sep 20;106(5):745-51
- Rau DC, Sidorova NY. Diffusion of the restriction nuclease EcoRI along DNA. *J Mol Biol.* 2010 Jan 15;395(2):408-16
- Regala RP, Justilien V, Walsh MP, Weems C, Khor A, Murray NR, Fields AP. Matrix metalloproteinase-10 promotes Kras-mediated bronchio-alveolar stem cell expansion and lung cancer formation. *PLoS One.* 2011;6(10):e26439
- Ricard-Blum S. The Collagen Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004978
- Richie RC, Swanson JO. Breast Cancer: A Review of the Literature. *J Insur Med* 2003;35:85–101
- Robinson GW. Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nature reviews genetics* volume 8 december 2007 963-973
- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-Healing Assay. *Methods in Molecular Biology* Volume 294, 2005, 23-29
- Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega R, Quintanar-Jurado V, Maffuz-Aziz A, Jimenez-Sanchez G, Bautista-Piña V, Arellano-Llamas R, Hidalgo-Miranda A. Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(3):e31904.





- Rosa FE, Caldeira JR, Felipes J, Bertonha FB, Quevedo FC, Domingues MA, Moraes Neto FA, Rogatto SR Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathologic factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers. *Hum Pathol.* 2008 May;39(5):720-30. doi: 10.1016/j.humpath.2007.09.019
- Rothberg JM, Bailey KM, Wojtkowiak JW, Ben-Nun Y, Bogyo M, Weber E, Moin K, Blum G, Mattingly RR, Gillies RJ, Sloane BF. Acid-Mediated Tumor Proteolysis: Contribution of Cysteine Cathepsins. *Neoplasia* Volume 15 Number10 October2013 1125–1137
- Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, volume 27 number 31 november 1 2009
- Rudolph-Owen LA, Chan R, Muller WJ, Matrisian LM. The matrix metalloproteinase matrilysin influences early-stage mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5500-6
- Sager R. Genetic Suppression of Tumor Formation: A New Frontier in Cancer Research. *Cancer Res* 1986;46:1573-1580.
- Sahai E. Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Feb;15(1):87-96
- Sakai K, Kurokawa T, Furui Y, Kuronuma Y, Sekiguchi M, Ando J, Inagaki Y, Tang W, Nakata M, Fujita-Yamaguchi Y. Invasion of carcinoma cells into reconstituted type I collagen gels: Visual real-time analysis by time-lapse microscopy. *BioScience Trends.* 2011; 5(1):10-16.
- Schimmelpenning H, Eriksson ET, Zetterberg A, Auer GU. Association of immunohistochemical p53 tumor suppressor gene protein overexpression with prognosis in highly proliferative human mammary adenocarcinomas. *World J Surg.* 1994 Nov-Dec;18(6):827-32
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22
- Scully OJ, Bay BH, Yip G, Yu Y. Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics* 9: 311-320 (2012)
- Shih IM, Salani R, Fiegl M, Wang TL, Soosaipillai A, Marth C, Müller-Holzner E, Gastl G, Zhang Z, Diamandis EP. Ovarian cancer specific kallikrein profile in effusions. *Gynecologic Oncology* 105 (2007) 501–507
- Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell MJ. The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development.* 2001 August ; 128(16): 3117–3131
- Siziopikou KP. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast. *Arch Pathol Lab Med—Vol 137*, April 2013, 462-466
- Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005;11(9):1251-1266



- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
- Soulié P, Carrozzino F, Pepper MS, Strongin AY, Poupon MF, Montesano R. Membrane-type-1 matrix metalloproteinase confers tumorigenicity on nonmalignant epithelial cells. *Oncogene*. 2005 Mar 3;24(10):1689-97
- Stauffer D, introduction to Percolation Theory, Taylor and Francis, London, 1985.
- Stauffer D. Scaling theory of percolation clusters. *physics reports (Review Section of Physics Letters)* 54, No. 1(1979)1-74.
- Sternlicht MD, Bissell MJ, Werb Z. The matrix metalloproteinase stromelysin-1 acts as a natural mammary tumor promoter. *Oncogene*. 2000 Feb 21;19(8):1102-13
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516
- Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development. The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research* 2006, 8:201
- Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, Smith BL, Ferrone CR, Hornicek FJ, Boucher Y, Munn LL, Jain RK. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 18;109(38):15101-8
- Suresh S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta Biomater*. 2007 Jul;3(4):413-38.
- Talvensaari-Mattila A, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer*. 2003 Oct 6;89(7):1270-5.
- Tan JL, Tien J, Pirone DM, Gray DS, Bhadriraju K, Chen CS. Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):1484-9
- Tani T, Lumme A, Linnala A, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Burgeson RE, Kangas L, Leivo I, Virtanen I. Pancreatic Carcinomas Deposit Laminin-5, Preferably Adhere to Laminin-5, and Migrate on the Newly Deposited Basement Membrane. *American Journal of Pathology*, Vol. 151, No. 5, November 1997
- Tanzer ML. Current concepts of extracellular matrix. *Orthop Sci* (2006) 11:326–331
- Tawfik K, Kimler BF, Davis MK, Fan F, Tawfik O. Ki-67 expression in axillary lymph node metastases in breast cancer is prognostically significant. *Hum Pathol*. 2012 Jan;44(1):39-46
- Teicher BA. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther*. 2006 Oct;5(10):2435-43
- Têtu B, Brisson J, Wang CS, Lapointe H, Beaudry G, Blanchette C, Trudel D. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res*. 2006;8(3):R28



- Théry M. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci.* 2010 Dec 15;123(Pt 24):4201-13
- Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Current Opinion in Cell Biology*, 1996, 8:618-624
- Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):1999-2009
- Van der Rest M, Aubert-Foucher E, Dublet B, Eichenberger D, Font B, Goldschmidt D. Structure and function of the fibril-associated collagens. *Biochemical Society Transactions, Extracellular Matrix in Health and Disease* vol 19 (1991)
- Van Staveren WC, Solís DY, Hébrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1795(2):92-103
- Vargova V, Pytliak M, Mechirovǎ V. Matrix, Metalloproteinase Inhibitor S.P. Gupta ed 2012, *Experientia Supplementum* 103, 1-33
- Vasaturo F, Solai F, Malacrino C, Nardo T, Vincenzi B, Modesti M, Scarpa S. Plasma levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 correlate with histological grade in breast cancer patients. *Oncol Lett.* 2013 Jan;5(1):316-320
- Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-839
- Vizoso FJ, González LO, Corte MD, Rodríguez JC, Vázquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, García-Muñiz JL. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer.* 2007 Mar 26;96(6):903-11
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science.* 2013 March 29; 339(6127): 1546–1558
- Wang N, Tolić-Nørrelykke IM, Chen J, Mijailovich SM, Butler JP, Fredberg JJ, Stamenović D. Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Mar;282(3):C606-16
- Wang V, Wu W. MicroRNA: A New Player in Breast Cancer Development. *Journal of Cancer Molecules* 3(5): 133-138, 2007.
- Wang Y, Zheng D, Tan Q, Wang MX, Gu LQ. Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. *Nat Nanotechnol.* 2011 Sep 4;6(10):668-74
- Wanunu M, Dadosh T, Ray V, Jin J, McReynolds L, Drndić M. Rapid electronic detection of probe-specific microRNAs using thin nanopore sensors. *Nat Nanotechnol.* 2010 Nov;5(11):807-14. doi: 10.1038/nnano.2010.202
- Watson CJ, Kreuzaler PA. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int. J. Dev. Biol.* 55: 757-762 (2011)
- Weigelt B, Peterse JL, Van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 2005 Aug;5(8):591-602



- Wetzels RH, Robben HCM, Leigh IM, Schaafsma HE, Vooijs GP, Ramaekerst FCS. Distribution Patterns of Type VII Collagen in Normal and Malignant Human Tissues. *American Journal of Pathology*, Vol. 139, No. 2, August 1991
- Whitehead J, Vignjevic D, Fütterer C, Beaupaire E, Robine S, Farge E. Mechanical factors activate beta-catenin-dependent oncogene expression in APC mouse colon. *HFSP J.* 2008 Oct;2(5):286-94
- Wiseman BS, Sternlicht MD, Lund LR, Alexander CM, Mott J, Bissell MJ, Soloway P, Itohara S, Werb Z. Site-specific inductive and inhibitory activities of MMP-2 and MMP-3 orchestrate mammary gland branching morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, Volume 162, Number 6, September 15, 2003 1123–1133
- Witty JP, Wright JH, Matrisian LM. Matrix Metalloproteinases Are Expressed during Ductal and Alveolar Mammary Morphogenesis, and Misregulation of Stromelysin-1 in Transgenic Mice Induces Unscheduled Alveolar Development. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 6, 1287-1303, October 1995
- Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2007 Aug;9(8):893-904. Epub 2007 Jul 8
- Wolf K, Wu YI, Liu Y, Geiger J, Tam E, Overall C, Stack MS, Friedl P. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nature cell biology* volume 9 number 8 august 2007
- Wu ZS, Wu Q, Yang JH, Wang HQ, Ding XD, Yang F, Xu XC. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008 May 1;122(9):2050-6
- Wyatt CA, Geoghegan JC, Brinckerhoff CE. Short hairpin RNA-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-1 in MDA-231 cells: effects on matrix destruction and tumor growth. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):11101-8
- Yang W, Arai S, Gorrin-Rivas MJ, Mori A, Onodera H, Imamura M. Human macrophage metalloelastase gene expression in colorectal carcinoma and its clinicopathologic significance. *Cancer.* 2001 Apr 1;91(7):1277-83
- Yoshida K, Soldati T. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci.* 2006 Sep 15;119(Pt 18):3833-44
- Zaman MH, Kamm RD, Matsudaira P, Lauffenburger DA. Computational model for cell migration in three-dimensional matrices. *Biophys J.* 2005 Aug;89(2):1389-97
- Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, Wells A, Lauffenburger DA, Matsudaira P. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 18;103(29):10889-94
- Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S, Li H, Ning L, Fu L, Niu Y, Niu R, Sun B, Hao X. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer.* 2008 Mar 28;8:83
- Zhang M, Teng XD, Guo XX, Li ZG, Han JG, Yao L. Expression of tissue levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Breast.* 2013 Jun;22(3):330-4





- Zheng D, Haddadin S, Wang Y, Gu LQ, Perry MC, Freter CE, Wang MX. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011 Aug 15;4(6):575-86





## **Résumé:**

Le développement des tumeurs et la dissémination métastatique impliquent un processus de migration cellulaire et un remodelage matriciel. Afin d'étudier ces deux aspects, nous avons mis en place deux systèmes modèles. Le premier, se base sur une lame basale reconstituée et permet d'évaluer le potentiel invasif de lignées cellulaires tumorales. Nous avons constaté que les cellules cancéreuses mammaires migrent différemment à travers un gel pour former des amas de taille variable directement corrélée à leur pouvoir invasif. Dans notre système, seule la migration de type mésenchymateuse est utilisée par les cellules. Ce type de mouvement est directement dépendant de protéases sécrétées par les cellules. Nous avons donc mesuré la synthèse au niveau transcriptionnel de la classe d'enzyme majoritairement impliquée dans la dissémination tumorale, les métalloprotéases matricielles (MMPs). Nous avons ainsi pu montrer que l'expression des MMP14, 10 et 1 est corrélée aux capacités migratoires des cellules donc à leur potentiel invasif. Le processus physique par lequel les enzymes dégradent les matrices est très peu étudié au niveau expérimental. Le second système que nous utilisons se base sur un modèle de matrice conjonctive majoritairement composé de collagène de type I. Nous utilisons la gélatine, pour étudier la protéolyse de gels protéiques par différentes classes de protéases. A partir d'études réalisées sur la solubilisation enzymatique de gels, à différentes concentrations, par l' $\alpha$ -chymotrypsine, la protéinase K et la papaïne, nous montrons qu'il existe des mécanismes de dégradation distincts. Le premier est un mécanisme anormal dont la cinétique est limitée par la diffusion de l'enzyme, le second est brownien et la cinétique est limitée par la réaction. Ce second mécanisme dépend directement d'interactions électrostatiques entre l'enzyme et le gel. Nous observons pour deux des enzymes que l'évolution des temps de dégradation mais également la cinétique dépendent de la concentration en protéine dans les gels, et pourrait constituer un nouveau mode de régulation physiologique de l'activité d'une enzyme.

## **Abstract:**

The development of tumors and metastasis involves a process of cell migration and matrix remodeling. To study these two aspects, we established two model systems. The first is based on a reconstituted basement membrane and used to evaluate the invasive potential of tumor cell lines. We found that breast cancer cells migrate differently across a gel to form clusters of variable size directly correlates with their invasiveness. In our system, only the mesenchymal type migration is used by the cells. This type of movement is directly dependent of proteases secreted by the cells. We measured the synthesis at the transcriptional level of the enzyme class mainly involved in tumor dissemination, the matrix metalloproteinases (MMPs). We were able to show that the expression of MMP14, 10 and 1 is correlated with the migratory capacity of cells therefore their invasive potential. The physical process by which enzymes degrade the matrix is very little studied at the experimental level. The second system we use is based on a model of connective tissue matrix composed mainly of collagen type I. We use gelatin for the study of protein gels proteolysis by different classes of proteases. From studies on the enzymatic solubilization of gels at different concentrations, by the  $\alpha$ -chymotrypsin, proteinase K and papain, we show that there are distinct mechanisms of degradation. The first one is an abnormal mechanism, whose kinetics is limited by enzyme diffusion, and the second is Brownian and the kinetic is reaction limited. The second mechanism depends directly on electrostatic interactions between enzyme and gel. We observe for two enzymes that the evolution of degradation time but also the degradation kinetics depend on the concentration of protein in gels, and could be a new mode of regulation of the physiological activity of an enzyme.