Journal de la Société de Biologie, 195 (2), 165-172 (2001)

Influence des peptides d'élastine sur la production de la métalloprotéinase matricielle-2 par les fibroblastes du derme humain en culture

par Eric Huet[1,#], Bertrand Brassart[1,#], Jean Wallach[2], Laurent Debelle[1], Bernard Haye[1], Hervé Emonard[1] & William Hornebeck[1,*].

[1]*Signalisation Cellulaire et Matrice Extracellulaire, CNRS FRE 2260, IFR 53 Biomolécules, Facultés de Médecine et des Sciences, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France ;* [2]*Laboratoire de Biochimie Analytique, Faculté des Sciences, Université C. Bernard, Lyon 1, France.*

** Auteur pour la correspondance : CNRS FRE 2260, IFR 53 Biomolécules, Faculté de Médecine, 51, rue Cognacq Jay, 51095 Reims cedex, France. Tél. : 03-26-91-35-35. Fax : 03-26-91-80-55. Email : william.hornebeck@univ-reims.fr*

[#] Les deux auteurs ont contribué de façon égale à ce travail.

Recu le 29 janvier 2001

RÉSUMÉ

Des peptides d'élastine obtenus par hydrolyse alcaline ou enzymatique (élastase leucocytaire) de l'élastine insoluble, de même que la tropoélastine, augmentent la production (zymographie en gel de gélatine, ELISA) de la métalloprotéinase matricielle-2 (MMP-2) par les fibroblastes dermiques humains en culture. Cet effet est prolongé dans le temps (jusqu'à 48 heures de culture) et est fonction de la concentration en peptides. Il peut être reproduit par des hexapeptides synthétiques d'élastine : VGVAPG et PGAIPG ou de laminine : LGTIPG et est inhibable par le lactose, ce qui implique une interaction de ces peptides avec le récepteur de l'élastine. Les niveaux d'expression à l'équilibre des ARNm de la MMP-2 restent invariants après interaction fibroblaste-élastine. L'inhibition de la phospholipase C (D-609), du facteur de ribosylation de l'ADP (bréfeldine A), de la protéine kinase C (RO-318220) ou de la phospholipase D (propanol-1) supprime totalement l'augmentation de production de la MMP-2 due à l'élastine. Cela suggère qu'un mécanisme post-transcriptionnel impliquant une cascade conduisant à l'activation de la phospholipase D contrôle la surproduction de la MMP-2 par les peptides d'élastine.

SUMMARY Elastin-mediated overproduction of matrix metalloproteinase 2 by human skin fibroblasts

Soluble elastin-derived peptides from alkaline or elastase hydrolysis of insoluble elastin, as well as tropoelastin, increase matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) production by human skin fibroblasts in culture as determined by gelatin zymography and ELISA. Such an effect is time and concentration dependent; it can be reproduced by synthetic elastin: VGVAPG, PGAIPG, and laminin: LGTIPG, hexapeptides and inhibited by lactose and is therefore elastin receptor-mediated. The steady state levels of MMP-2 mRNAs are invariant following elastin-fibroblasts interaction. Inhibition of phospholipase C (D-609), ADP-ribosylation factor (brefeldin), protein kinase C (RO-318220) and phospholipase D (1-propanol) totally abolished the elastin-mediated increase of MMP-2 production. It suggested that the post-transcriptional mechanism controlling the elastin-mediated overproduction of MMP-2 involved a cascade leading to phospholipase D activation.

INTRODUCTION

La dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire (MEC) est essentielle au remodelage de la peau au cours de la cicatrisation cutanée (Kahari & Saarialho, 1997 ; Karelina *et al.*, 2000) et il est établi que les protéinases appartenant aux classes des sérine-, cystéine- et métallo- endopeptidases participent à ce remodelage de la MEC (Kahari & Saarialho-Kere, 1997). Toutefois les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont généralement considérées comme jouant un rôle prépondérant dans la dégradation de la MEC (Woessner & Nagase, 2000). Bien que l'hydrolyse du collagène ait été initia-

Ce travail a reçu le soutien financier de la Région Champagne-Ardenne (ARERS, Préfecture de Champagne-Ardenne), de l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), de la Ligue contre le Cancer et du Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS, FRE 2260).

lement attribuée à l'action des collagénases : MMP-1, MMP-8 et MMP-13, des études récentes démontrent le rôle clé de la gélatinase A (MMP-2) dans la dégradation du collagène dans certains tissus comme la peau et la gencive (Creemers *et al.*, 2000). Des expériences *ex vivo* à l'aide de coupes de tissu dermique humain et d'analyses morphométriques informatisées ont montré que la MMP-2 était capable d'altérer de manière significative les fibres de collagène ainsi que les constituants de la jonction dermo-épidermique (Berton *et al.*, 2000). Contrairement à la plupart des MMP, la MMP-2 n'est pas activée directement par des sérine protéinases telles que la plasmine, ou, hormis la MT1-MMP, par d'autres MMP actives (Hernandez-Barrantes *et al.*, 2000). Cette enzyme est produite de manière constitutive par les fibroblastes, et la plupart des cytokines et facteurs de croissance ne sont pas capables de moduler de manière significative son expression. Cependant, la MEC et ses fragments peuvent stimuler l'expression et l'activation de la MMP-2 (Stanton *et al.*, 1998 ; Tomasek *et al.*, 1997). Récemment, nous avons pu mettre en évidence que l'occupation du récepteur de l'élastine par les peptides d'élastine induisait une augmentation de l'expression de la MMP-2 par les cellules HT-1080 issues d'un fibrosarcome (Brassart *et al.*, 1998).

Le récepteur de l'élastine, désigné également comme la protéine liant l'élastine, ou EBP pour "elastin-binding protein", a été identifié initialement dans les fibroblastes et correspond à une forme épissée de β-galactosidase enzymatiquement inactive (Groult *et al.*, 1991 ; Hinek, 1996 ; Privitera *et al.*, 1998). Le récepteur est exprimé par les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes, les leucocytes et de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses (Robert, 1999). Au niveau de la membrane plasmique, l'EBP est associée à deux autres protéines, une neuraminidase de masse moléculaire égale à 61 kDa et une protéine chaperonne de masse moléculaire égale à 55 kDa (Hinek, 1996 ; Robert, 1999). Il a été montré que la liaison de peptides d'élastine à l'EBP stimulait le chimiotactisme et la prolifération des fibroblastes, induisait une augmentation rapide et transitoire du flux intracellulaire de calcium libre et stimulait la sécrétion d'une activité de type élastase (Jacobs *et al.*, 1987 ; Kamoun *et al.*, 1995 ; Landeau *et al.*, 1994 ; Varga *et al.*, 1989). Dans les leucocytes, il a été rapporté que l'une des sous unités du récepteur était couplée à une protéine Gi et serait donc impliquée dans une voie de signalisation conduisant à l'activation de la phospholipase C (PLC) et de la protéine kinase C (PKC) (Varga *et al.*, 1989).

A la suite d'une blessure, dans les étapes initiales de la réparation de la peau, des enzymes possédant une activité élastinolytique importante, comme l'élastase, la cathepsine G et la MMP-9, sont libérées des granules azurophiles des neutrophiles et induisent la libération de fragments d'élastine (Berton *et al.*, 2000).

Dans ce travail, nous avons recherché si ces peptides d'élastine pouvaient moduler la production de la MMP-2 par les fibroblastes dermiques humains (FDH) en culture. Des peptides issus de l'hydrolyse alcaline ou enzymatique par l'élastase leucocytaire d'élastine insoluble, ainsi que la tropoélastine et des peptides synthétiques possédant la séquence consensus XGXXPG, peuvent augmenter la sécrétion de la MMP-2 par ces cellules selon un mécanisme post-transcriptionnel impliquant la phospholipase D (PLD).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Matériels

La tropoélastine bovine a été obtenue chez Elastin Product Co. (Owensville, USA). L'élastine insoluble est préparée à partir de ligament large de nuque de bœuf par traitement alcalin à chaud. Sa pureté est déterminée par l'analyse de sa composition en acides aminés et par l'absence d'hexoses et d'hexosamines dans la préparation (Jacob & Hornebeck, 1985). Les peptides solubles de kappa élastine (kE) sont obtenus par hydrolyse organoalcaline d'élastine insoluble (Jacob & Hornebeck, 1985). Les peptides ayant une masse moléculaire moyenne de 75 kDa sont isolés par gel-filtration sur Séphadex G-100. Pour la production d'un hydrolysat enzymatique d'élastase, 75 mg d'élastine insoluble, de diamètre inférieur à 100 mesh, sont remis en suspension dans 7,5 ml d'un tampon Tris-HCl 100 mM, $CaCl_2$ 5 mM pH 8,0 et maintenus sous agitation mécanique constante durant 1 heure à 37° C. 37,5 µg (1,25 µmol) d'élastase leucocytaire humaine (HLE, Elastin Product Co.) sont alors ajoutés à cette dispersion ; les tubes sont maintenus à 37° C sous agitation mécanique constante durant 1 à 24 heures et la réaction est arrêtée par addition de PMSF (1 mM). L'élastine non hydrolysée est centrifugée à 12 000 *g* pendant 15 minutes et le surnageant est récupéré et dialysé exhaustivement contre de l'eau distillée et lyophilisé. Son contenu en protéines est déterminé selon la méthode de Bradford en utilisant la kE comme standard (Jacob & Hornebeck, 1985).

Les peptides sont synthétisés en mode Fmoc ou fluorénylméthoxycarbonyle et les couplages sont effectués avec des esters d'acide aminé-Fmoc-pentafluorophényl. Toutes les étapes de déprotection Fmoc impliquent un traitement avec une solution de diméthylformamide/pipéridine 20 % pendant 10 minutes. La coupure du peptide de la résine est obtenue par un traitement avec un mélange acide trifluoroacétique/eau (95 : 5 ; v/v) pendant 6 heures, suivi par des lavages successifs de la résine avec de l'éther. Les peptides sont ensuite purifiés par HPLC en phase inverse et leurs puretés vérifiées par spectrométrie de masse à bombardement atomique rapide.

La bréfeldine A et le D-609 sont fournis par Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) et le propanol-1 et le propanol-2 par Prolabo (Strasbourg, France). Le RO-318220 et l'ET-18OCH3 sont obtenus chez Calbiochem (France Biochem, Meudon, France). Tous les autres réactifs, de qualité analytique, proviennent de chez Gibco-

BRL (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) ou de chez Sigma.

Culture cellulaire

Les souches de FDH sont établies à partir d'explants de biopsie de peau d'adultes sains après avoir recueilli leur consentement (âge : 21-41 ans). Les FDH sont cultivés dans du milieu minimal essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau fœtal et 2 mM de glutamine, à 37 °C en présence de 5 % (v/v) CO_2. Les FDH sont utilisés entre le 5ème et le 10ème passage.

Les cultures de cellules sont rincées deux fois avec un tampon phosphate (PBS, 10 mM de phosphate de sodium, 170 mM de NaCl pH 7,4) et incubées pendant 1 à 48 heures dans un milieu sans sérum en absence ou en présence de peptides d'élastine ou d'autres effecteurs. Le milieu de culture est récupéré et centrifugé à 500 *g* pendant 5 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires.

Zymographie en gel de gélatine

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS et d'un substrat a été réalisée comme décrite précédemment (Brassart *et al.*, 1998 ; Emonard & Hornebeck, 1997). Les gels pour la zymographie contiennent 10 % de polyacrylamide et 0,1 % de gélatine. La zymographie révèle une activité protéolytique qui apparaît comme une bande claire, démontrant la lyse de la gélatine dans le gel, sur un fond bleu de gélatine colorée.

L'activité gélatinolytique, détectée par la zymographie en gel de gélatine, est ensuite quantifiée par une analyse d'images automatisée décrite précédemment (Brassart *et al.*, 1998). La zone de linéarité de l'activité enzymatique est déterminée en utilisant la MMP-2 purifiée (Calbiochem) comme standard. La linéarité est obtenue entre 10 et 200 pg d'enzyme.

Quantification de la MMP-2 par ELISA

Le taux de MMP-2 produite par les cellules a été déterminé à l'aide d'un kit Biotrak™, un test de type ELISA-sandwich contre la MMP-2 humaine, suivant le protocole du fabricant (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). Les standards et les échantillons sont incubés dans une plaque de 96 puits prétraités avec un anticorps anti-MMP-2 humaine. La MMP-2 liée interagit ensuite avec un anticorps anti-MMP-2 couplé à la peroxidase. La quantité de peroxidase liée dans chaque puits est évaluée par ajout de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). La réaction est arrêtée par addition de H_2SO_4 à 0,5 M et la coloration obtenue est lue à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de microplaque (Titertek Multiskan plus, Poly Labo, Strasbourg, France). La concentration en MMP-2 des échantillons est déterminée par une analyse en régression non linéaire de la courbe obtenue avec les standards à l'aide du logiciel Grafit 4.0 (Erithacus, Middlesex, UK). Les résultats sont exprimés en ng de MMP-2 par ml pour 10^5 cellules.

Immuno-révélation de la MMP-3

Après concentration à l'aide de Nanosep™ (Polylabo) et ajustement à la même concentration protéique, les milieux conditionnés sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % et en présence de 0,1 % de SDS en condition réductrice, puis transférés sur une membrane Immobilon-P (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). La membrane est ensuite saturée en présence de sérum de veau fœtal à 5 % dans un tampon Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1 % pH 7,5 (TBS-T) pendant 2 heures, mise en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-MMP-3 humaine dilué au 1/500 (Valbiotech, Paris, France) puis d'un anticorps anti-immunoglobuline de lapin, clone RG-16, couplé à la phosphatase alcaline (Sigma). Entre chaque incubation, la membrane est lavée exhaustivement avec le TBS-T. La présence de phosphatase alcaline est révélée par incubation de la membrane avec le Sigma Fast NBT/BCIP (Sigma).

Isolement des ARN et analyse par Northern blot

Les cultures de fibroblastes à confluence sont rincées deux fois avec du milieu sans sérum puis incubées dans du DMEM en absence de sérum pendant 2 heures. 50 µg/ml de kE sont ensuite ajoutés au milieu de culture et l'incubation est poursuivie durant 3 à 48 heures. Les cellules sont alors rincées avec le PBS et les ARN totaux sont extraits des FDH comme décrit précédemment (Brassart *et al.*, 1998).

Vingt µg d'ARN sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose-formaldéhyde à 1,2 % puis transférés par capillarité sur une membrane GeneScreen Plus (DuPont NEN, Les Ullis, France) dans une solution de SSC 20 fois concentrée (le SSC 1x correspond à un tampon citrate de sodium 15 mM, NaCl 150 mM pH 7,0) et immobilisés après exposition aux UV. Les membranes sont ensuite hybridées avec les sondes d'ADNc dénaturées marquées avec de l'a-32P dCTP selon la méthode du multi-amorçage au hasard (PrimIt II, Stratagène Europe, Amsterdam, Hollande). L'hybridation est réalisée dans une solution à 50 % de formamide désionisé, SDS 7 %, NaCl 250 mM, NaH_2PO_4 250 mM, EDTA 1 mM à 42° C pendant 24 heures. Les lavages ultérieurs à l'étape d'hybridation sont effectués dans une solution de SSC 2x contenant 0,1 % de SDS à 65° C. Lorsque nécessaire, les déshybridations sont réalisées à l'aide d'une solution de SSC 0,2x, SDS 0,1 % à 65° C pendant 10 minutes. Après lavages, les membranes sont exposées sur un film Kodak X-Omat (Poly Labo) à – 80° C dans des écrans intensificateurs. La sonde d'ADNc de la MMP-2 de 1,1 kb a été fournie par le Pr. Stetler-Stevenson (NIH, Bethesda, USA). Le signal obtenu à partir des Northern blots a été normalisé à celui de la 36B4 (sonde fournie par le Pr. Chambon, Université de Strasbourg, France) afin de corriger les légères différences dans les dépôts d'ARN.

RÉSULTATS

La liaison des peptides d'élastine à l'EBP augmente la sécrétion de la MMP-2 par les FDH

Des FDH, à confluence, sont cultivés dans du milieu DMEM sans sérum en présence de concentrations croissantes de kE (2,5 à 100 µg/ml). Après 6, 24 et 48 heures d'incubation, les milieux conditionnés sont récupérés et leur contenu en MMP-2 est évalué par zymographie en gel de gélatine ou par dosage ELISA. La figure 1 montre que la stimulation de la production de la MMP-2 par les FDH, après ajout de kE au milieu de culture, augmente avec le temps de culture et est fonction de la concentration en peptides. Cet effet s'observe dès 6 heures de culture et la stimulation de la production de la MMP-2 est maintenue après 48 heures de culture. A ce temps, seules des traces de MMP-2 active peuvent être mises en évidence par zymographie (Fig. 1a). L'effet des peptides sur la sécrétion de la MMP-2 est fonction de la concentration de kE ajoutée au milieu de culture (Fig. 1b) : une concentration de 2,5 µg/ml est suffisante pour augmenter de façon significative la production de la MMP-2 et une courbe dose-réponse quasi linéaire est observée jusqu'à une concentration de 50 µg/ml de kE. En fonction de la souche de FDH employée : nombre de passage et âge des donneurs, une stimulation de 2 à 5 fois de la

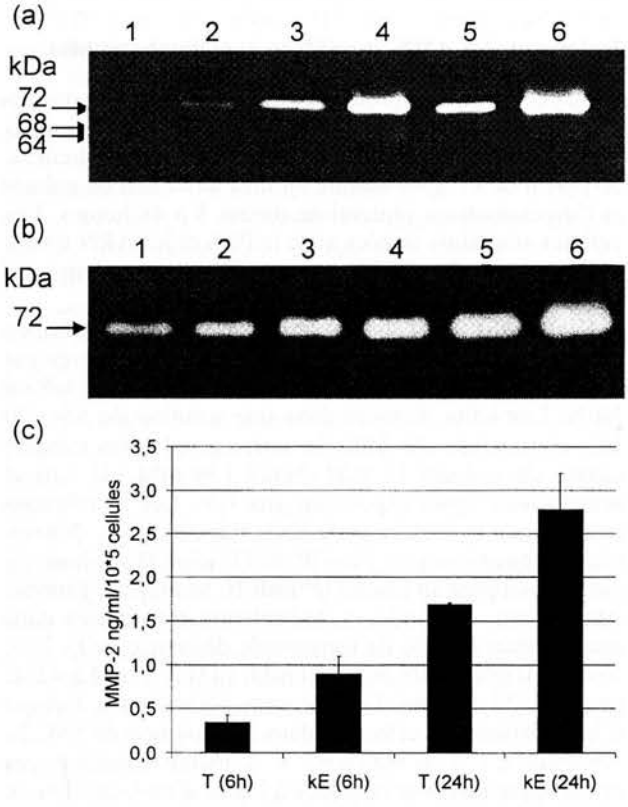

FIG. 1. – Production de la MMP-2 par les FDH stimulés par la kE.

a) Cinétique de l'induction pour une concentration en kE égale à 50 µg/ml. 6 heures : 1, témoin ; 2, kE. 24 heures : 3, témoin 4, kE. 48 heures : 5, témoin ; 6, kE.

b) Effet-dose de la kE sur la production de la MMP-2 après 24 heures de traitement. 1, témoin ; 2, kE 2,5 µg/ml ; 3, kE 10 µg/ml ; 4, kE 25 µg/ml ; 5, kE 50 µg/ml ; 6, kE 100 µg/ml.

c) Quantification de la MMP-2 par ELISA après stimulation des FDH par la kE (50 µg/ml) pendant 24 heures.

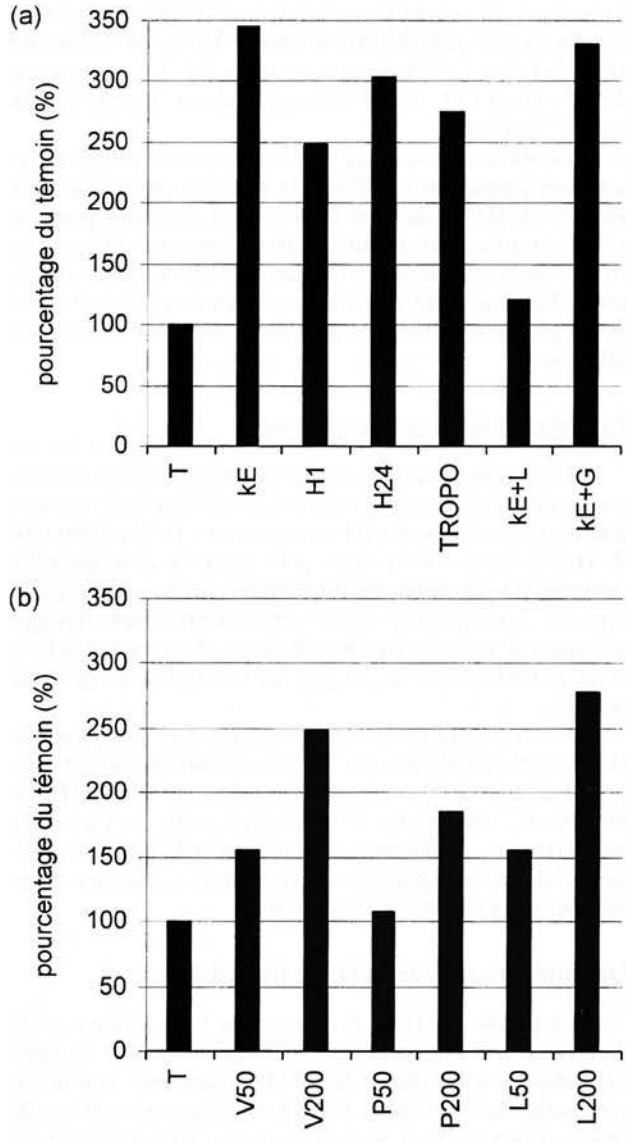

FIG. 2. – Effets des peptides d'élastine et du lactose sur la production de la MMP-2 par les FDH après 24 heures de culture.

a) T, témoin ; kE, kappa élastine 50 µg/ml ; H1, 50 µg/ml : hydrolysat obtenu après 1 heure de traitement de l'élastine insoluble avec l'HLE (voir Matériels et Méthodes pour les détails) ; H24, 50 µg/ml : hydrolysat obtenu après 24 heures de traitement de l'élastine insoluble avec l'HLE (voir Matériels et Méthodes pour les détails) ; Tropo, tropoélastine 50 µg/ml ; kE+L, kE 50 µg/ml en présence de lactose 50 mM ; kE+G, kE 50 µg/ml en présence de glucose 50 mM.

b) T, témoin ; V50 et V200, VGVAPG 50 et 200 µg/ml ; P50 et P200, PGAIPG 50 et 200 µg/ml ; L50 et L200, LGTIPG 50 et 200 µg/ml respectivement.

production de la MMP-2 par les cellules est démontrée après 24 heures de culture. L'effet de la kE sur la production de la MMP-2 a été confirmé au niveau protéique par dosage ELISA (Fig. 1c).

L'effet de la kE sur la sécrétion de la MMP-2 a pu être reproduit par des peptides d'élastine plus physiologiques, tels que la tropoélastine ou des peptides d'élastine obtenus par hydrolyse de l'élastine insoluble par l'élastase leucocytaire. Comme représenté à la figure 2, le niveau de stimulation de la production de la MMP-2 est similaire quel que soit le type de peptides d'élastine utilisé.

La liaison de glucides de type lactose sur le site lectine, présent au sein de la molécule d'EBP, empêche son interaction avec les peptides d'élastine et annihile les activités biologiques des peptides d'élastine (Hinek, 1996 ; Robert, 1999). La figure 2a montre qu'en présence de lactose, l'augmentation de la production de la MMP-2 par la kE est supprimée ; le glucose, par contre, n'a aucun effet.

L'EBP interagit avec des séquences hexapeptidiques de type VGVAPG ou PGAIPG répétées plusieurs fois dans la tropoélastine (Hinek, 1996 ; Robert, 1999). Le récepteur reconnaît également la séquence LGTIPG présente sur la chaîne B de la laminine-1 (Hinek, 1996). L'effet de ces peptides sur la sécrétion de la MMP-2 a donc été évalué : à une concentration égale à 200 µg/ml, VGVAPG, PGAIPG et LGTIPG augmentent la sécrétion de la MMP-2 respectivement de 2,5, 1,7 et 2,7 fois (Fig. 2b).

La stimulation de la production de la MMP-2 par les peptides d'élastine fait intervenir des mécanismes post-transcriptionnels

Nous avons récemment montré que la liaison de peptides d'élastine avec le récepteur de l'élastine, présent à la membrane plasmique de cellules HT-1080 issues d'un fibrosarcome, induisait une augmentation significative du taux d'ARNm de la MMP-2 (Brassart *et al.*, 1998). Les variations des niveaux d'expression des ARNm de la MMP-2 à partir de FDH cultivés en absence ou en présence de 50 µg/ml de kE pendant 8 à 48 heures ont été quantifiées par Northern Blot (Fig. 3). Le traitement des cellules avec la kE ne modifie pas de façon significative l'expression de la MMP-2 quel que soit le temps de culture. Toutefois une augmentation, non significative (de 1,5 fois), est détectable pour des temps de culture tardifs (Fig. 3). De plus, l'actinomycine D qui se lie spécifiquement à l'ADN et inhibe la transcription, ne modifie pas l'augmentation de la sécrétion de la MMP-2 induite par la kE (Fig. 4) alors que l'augmentation de la production de la stromélysine 1 (MMP-3), dont le taux d'ARNm est significativement élevé à la suite d'un traitement des FDH par la kE , est abolie en présence de cet antibiotique (Fig. 4). Ainsi l'effet stimulant de l'élastine

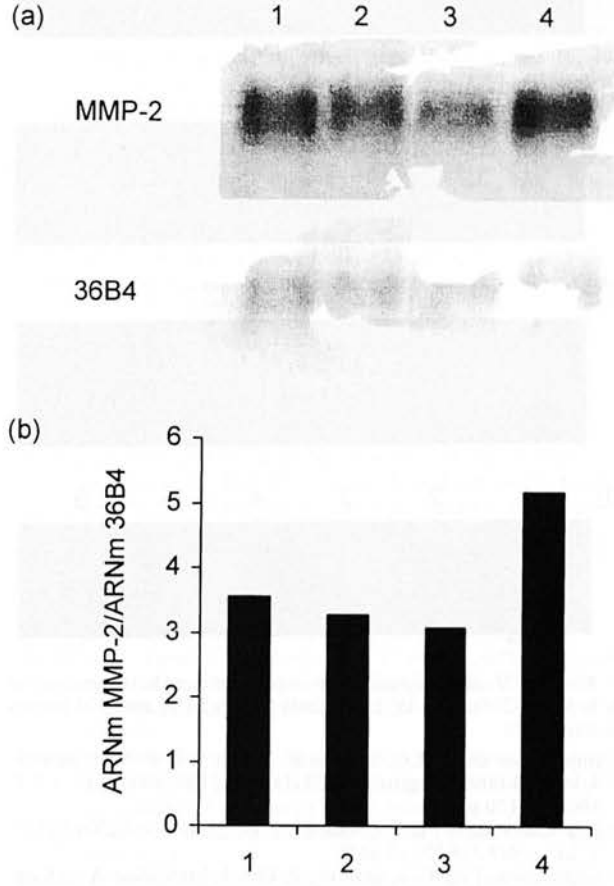

FIG. 3. – Influence de la kE (50 µg/ml) sur l'activité transcriptionnelle du gène de la MMP-2. Analyse par Northern blot.
a) ARNm de la MMP-2 et de la 36B4.
b) Rapport ARNm MMP-2/ARNm 36B4.
1, témoin, 8 heures ; 2, en présence de kE, 8 heures ; 3, témoin, 48 heures ; 4, en présence de kE, 48 heures.

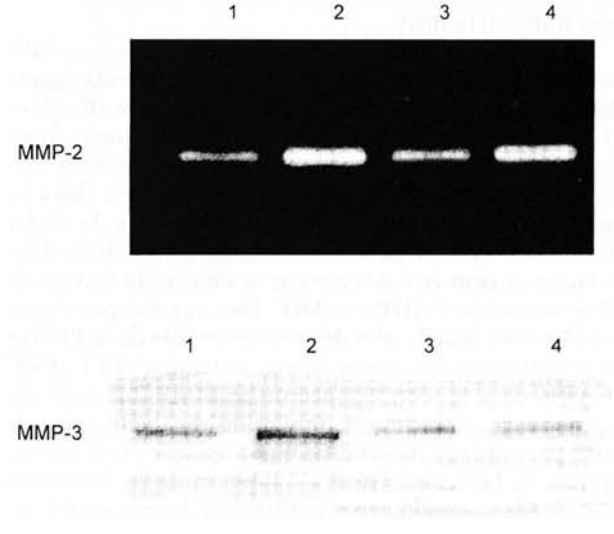

FIG. 4. – Effet de l'actinomycine D (1 µg/ml) sur la production de la MMP-2 et de la MMP-3 induite par la kE (50 µg/ml) par les FDH après 24 heures de culture.
1, témoin ; 2, kE ; 3, témoin + actinomycine D ; 4, kE + actinomycine D.

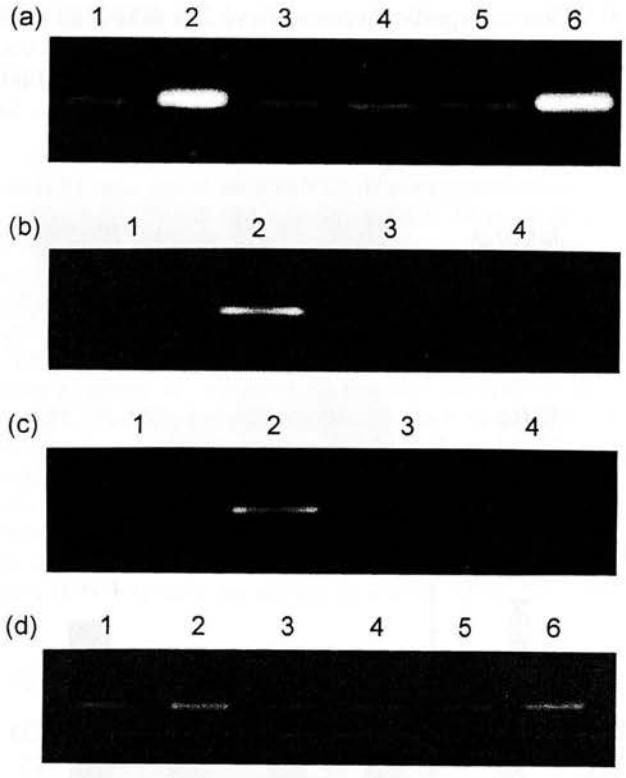

FIG. 5. – Voie de signalisation impliquée dans la surproduction de la MMP-2 due à la kE (50 µg/ml) par les FDH après 24 heures de traitement.

a) Implication de la PLC. 1, témoin ; 2, kE ; 3, D-609 (20 µg/ml) ; 4, kE + D-609 (20 µg/ml) ; 5, ET-18OCH$_3$ (20 µM) ; 6, kE + ET-18OCH$_3$ (20 µM).
b) Implication de la PKC. 1, témoin ; 2, kE ; 3, RO-318220 (5 µM) ; 4, kE + RO-318220 (5 µM).
c) Implication d'ARF. 1, témoin ; 2, kE ; 3, bréfeldine A (0,5 µg/ml) ; 4, kE + bréfeldine A (0,5 µg/ml).
d) Implication de la PLD. 1, témoin ; 2, kE ; 3, propanol-1 (130 mM) ; 4, kE + propanol-1 (130 mM) ; 5, propanol-2 (130 mM) ; 6, kE + propanol-2 (130 mM).

sur la production de la MMP-2 est contrôlé à un niveau post-transcriptionnel.

L'importance de la PLD dans la production de gélatinases (MMP-2 et MMP-9) induites par différents agents dans plusieurs types cellulaires a été soulignée (Reich *et al.*, 1995 ; Williger *et al.*, 1995, 1999). Bien que la fonction précise de cette enzyme ne soit pas clairement élucidée, la PLD est probablement impliquée dans le contrôle du trafic vésiculaire des composants du Golgi (Exton, 1997). Une de ses isoformes a été localisée dans le Golgi et peut être activée par la PKC et le facteur de ribolysation de l'ADP ou ARF. Des agents spécifiques ont alors été utilisés afin de préciser le rôle de la PLD et de ses effecteurs en amont de son activation : PLC, PKC et ARF, dans la sécrétion accrue de MMP-2 induite par les peptides d'élastine. L'inhibition de l'activation de ARF par échange de GTP/GDP est réalisée par l'utilisation de la bréfeldine A et l'inhibition de la formation d'acide phosphatidique par l'utilisation de propanol-1, un alcool primaire qui entraîne la formation de phosphatidyl propanol par une réaction de transphosphatidylation (Exton, 1997). Les résultats présentés sur la figure 5 démontrent que l'inhibition des activités de la PLC (D-609), de la PKC (RO-318220), d'ARF (bréfeldine A) ou de la PLD (propanol-1), supprime totalement l'effet stimulateur de l'élastine sur la production de la MMP-2 par les FDH.

DISCUSSION

Le récepteur de l'élastine est une protéine ubiquitaire exprimée par les cellules produisant de l'élastine comme les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales, mais également par les cellules circulantes telles que les neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes (Hinek, 1996 ; Robert, 1999). La liaison de peptides d'élastine sur ce récepteur entraîne l'activation des cellules et des fonctions cellulaires aussi diverses que le chimiotactisme, la prolifération, la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose (Robert, 1999). En réponse aux peptides d'élastine, la stimulation de l'adhérence des cellules aux fibres élastiques (Groult *et al.*, 1991), l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'entrée du calcium extracellulaire (Jacob *et al.*, 1987), de la biosynthèse de la fibronectine (Robert, 1999) et de la sécrétion d'une activité de type élastase (Landeau *et al.*, 1994) sont des phénomènes observées chez les fibroblastes.

En relation avec l'importance de la MMP-2 dans la physiopathologie de la peau et plus particulièrement dans sa fonction émergente dans la régulation du renouvellement du collagène (Creemers *et al.*, 1998), nous avons recherché si les peptides d'élastine pouvaient moduler la production de cette enzyme.

La tropoélastine et les hydrolysats d'élastine stimulent la production de MMP-2 par les cellules à une concentration effectrice minimale égale à 3,3 10^{-8} M. Bien que cette concentration soit supérieure à celle réputée induire le chimiotactisme et la prolifération des fibroblastes, elle est proche de la constante de dissociation entre les peptides d'élastine et leur récepteur et avoisine le taux circulant de peptides d'élastine (Groult *et al.*, 1991 ; Robert, 1999). Un tel effet peut être reproduit par des hexapeptides d'élastine ou de laminine correspondant à la séquence consensus XGXXPG reconnue par l'EBP. De plus l'augmentation de la sécrétion de la MMP-2 due à l'élastine peut être inhibée par le lactose, indiquant ainsi que cet effet est médié par l'occupation du récepteur de l'élastine par ces peptides.

Dans les cellules HT-1080 issues d'un fibrosarcome, les peptides d'élastine provoquent une augmentation du taux d'ARNm de la MMP-2 (Brassart *et al.*, 1998). Dans les fibroblastes, il semblerait que l'effet stimulateur de ces peptides sur la production de la MMP-2 soit contrôlé à un niveau post-transcriptionnel. L'action d'agents interférant avec les éléments impliqués dans la voie de signalisation conduisant à l'activation de la PLD, i.e. PLC, PKC et ARF, ou la modulation directe de l'activité de la PLD par un alcool primaire conduisent à l'inhibition

totale de l'effet stimulateur des peptides d'élastine sur la sécrétion de la MMP-2 par les FDH. Ceci suggère que la PLD puisse jouer un rôle déterminant dans la surproduction de cette enzyme par les peptides d'élastine. Dans les cellules de mammifères, l'activation de la PLD-1, associée au Golgi, conduit à l'hydrolyse de la phosphatidylcholine en acide phosphatidique. Il a été montré que l'acide phosphatidique entraîne notamment la mitose des fibroblastes et stimule l'explosion respiratoire des neutrophiles (Exton, 1997). De plus, dans des cellules cancéreuses, l'acide phosphatidique augmente le taux de calcium intracellulaire, active des protéines kinases et des phospholipases spécifiques et finalement accroît l'expression de la MMP-2 (Reich *et al.*, 1995). Il est nécessaire de souligner qu'un tel processus d'activation intracellulaire est observé suite à l'interaction peptides d'élastine-récepteur. Le rôle putatif de l'acide phosphatidique comme médiateur principal des effets des peptides d'élastine sur les cellules nécessitera des investigations futures plus approfondies.

La gélatinase A ou MMP-2 a été particulièrement impliquée dans la dégradation du collagène de type IV au cours de l'invasion tumorale. Cependant des données récentes semblent indiquer qu'elle pourrait jouer un rôle clé dans la dégradation des fibres de collagène dans les tissus conjonctifs sains comme la peau. Chez le Rat, une corrélation inverse significative entre la demi-vie du collagène et la quantité de MMP-2 active a été trouvée dans des tissus tels que le ligament parodontal, les gencives ou la peau (Creemers *et al.*, 1998). Bien que la capacité de la MMP-2 à digérer *in vitro* le collagène de type I ait été remise en question, nos récentes données expérimentales ont montré qu'elle possède, *ex vivo*, une activité collagénolytique importante (Berton *et al.*, 2000). De plus, l'expression de la collagénase 1 (MMP-1) par les fibroblastes est également induite consécutivement à l'occupation du récepteur de l'élastine par les peptides d'élastine (Brassart *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données est en faveur de l'hypothèse conceptuelle qu'au cours de l'inflammation, une élastolyse initiale puisse conduire à une collagénolyse et qu'en ce sens, les peptides d'élastine soient des catalyseurs efficaces du remodelage tissulaire.

Remerciements. – Les auteurs remercient Mme DECARME pour son assistance technique ainsi que le Dr A. HINEK (Hôpital des Enfants Malades, Toronto, Canada), le Dr G. BELLON (CNRS, FRE 2260) pour leurs précieux conseils et le Dr L. ROBERT pour la présentation de ce manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

Berton A., Godeau G., Emonard H., Baba K., Bellon P., Hornebeck W. & Bellon G., Analysis of the *ex vivo* specificity of human gelatinases A and B towards skin collagen and elastic libers by computerized morphometry. *Matrix Biol.*, 2000, *19*, 139-148.

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

Brassart B., Randoux A., Hornebeck W. & Emonard H., Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MTI-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) expression by elastin-derived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell fine. *Clin. Exp. Metast.*, 1998, *16*, 489-500.

Creemers L. B., Jansen I. D., Docherty A. J., Reynolds J. J., Beertsen W. & Everts V., Gelatinase A (MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue. *Matrix Biol.*, 1998, *17*, 35-46.

Emonard H. & Hornebeck W., Binding of 92 kDa and 72 kDa progelatinases to insoluble elastin modulates their proteolytic activation. *Biol. Chem.*, 1997, *378*, 265-271.

Exton J. H., New developments in phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 15579-15582.

Groult V., Hornebeck W., Ferrari P., Tixier J. M., Robert L. & Jacob M. P., Mechanisms of interaction between human skin fibroblasts and elastin: differences between elastin fibres and derived peptides. *Cell Biochem. Funct.*, 1991, *9*, 171-182.

Hernandez-Barrantes S., Toth M., Bernardo M. M., Yurkova M., Gervasi D. C., Raz Y., Sang Q. A. & Fridman R., Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 12080-12089.

Hinek A., Biological roles of the non-integrin elastin-laminin receptor. *Biol. Chem.*, 1996, *377*, 471-480.

Jacob M. P., Fulop T. Jr., Foris G. & Robert L., Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, *84*, 995-999.

Jacob M. P. & Hornebeck W., Isolation and characterization of insoluble and kappa elastins. *In: Methods of connective tissue research Frontiers of matrix biology, vol. 10.* Robert L., Moczar M., Moczar E., editors. Basel, New York : Karger, 1985, 92-123.

Kahari V. M. & Saarialho-Kere U., Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.*, 1997, *6*, 199-213.

Kamoun A., Landeau J. M., Godeau G., Wallach J., Duchesnay A., Pellat B. & Hornebeck W., Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes. Commun.*, 1995, *3*, 273-281.

Karelina T. V., Bannikov G. A. & Eisen A. Z., Basement membrane zone remodeling during appendageal development in human fetal skin. The absence of type VII collagen is associated with gelatinase-A (MMP2) activity. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, *114*, 371-375.

Landeau J. M., Pellat B. & Hornebeck W., Increased secretion of latent elastase activity following contact between human skin fibroblasts and elastin derived peptides. *Cell Biol. Int.*, 1994, *18*, 111-117.

Privitera S., Prody C. A., Callahan J. W. & Hinek A., The 67 kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of β-galactosidase is identical to the elastin-laminin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 6319-6326.

Reich R., Blumenthal M. & Liscovitch M., Role of phospholipase D in laminin-induced production of gelatinase A (MMP-2) in metastatic cells. *Clin. Exp. Metast.*, 1995, *13*, 134-140.

Robert L., Interaction between cells and elastin, the elastin-receptor. *Connect. Tissue Res.*, 1999, *40*, 75-82.

Stanton H., Gavrilovic J., Atkinson S. J., d'Ortho M. P., Yamada K. M., Zardi L. & Murphy G., The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with

an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *J. Cell Sci.*, 1998, *111*, 2789-2798.

Tomasek J. J., Halliday N. L., Updike D. L., Ahern-Moore J. S., Vu T. K., Liu R. W. & Howard E. W., Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 7482-7487.

Varga Z., Jacob M. P., Robert L. & Fulop T. Jr., Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. *FEBS Lett.*, 1989, *258*, 5-8.

Williger B. T., Ho W. T. & Exton J. H., Phospholipase D mediates matrix metalloproteinase-9 secretion in phorbol ester-stimulated human fibrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274*, 735-738.

Williger B. T., Reich R., Neeman M., Bercovici T. & Liscovitch M., Release of gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) induced by photolysis of caged phosphatidic acid in HT1080 metastatic fibrosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270*, 29656-29659.

Woessner J. F. & Nagase H., Matrix metalloproteinases and TIMPs. New York : Oxford University Press, 2000.

Séance du 20 décembre 2000