

Effets biologiques de peptides des collagènes I et IV

par Sylvie Pasco, Laurent Ramont, François-Xavier Maquart, Jean-Claude Monboisse

Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS FRE 2534, IFR 53, UFR de Médecine, 51 rue Cognacq-Jay, 51095, Reims Cedex, France

Reçu le 18 septembre 2002

RÉSUMÉ

Divers processus biologiques, comme la différenciation cellulaire, la migration cellulaire ou l'expression des gènes, sont contrôlés par des interactions cellule – cellule ou par des cytokines, mais aussi par des interactions entre cellules et matrice extracellulaire. La régulation de ces processus implique une protéolyse limitée et dirigée des macromolécules matricielles, induisant la libération de domaines protéiques et de peptides dotés d'activités biologiques. Dans cette revue, nous résumons des résultats de notre laboratoire montrant que des peptides des collagènes de types I et IV jouent un rôle important dans la régulation

de l'inflammation et de la progression tumorale. Des peptides du collagène I stimulent l'explosion respiratoire, l'exocytose des granules cytoplasmiques et la sécrétion de cytokines par des leucocytes humains (neutrophiles polynucléaires et monocytes), pour la détersion des sites inflammatoires et ensuite pour attirer divers types de cellules nécessaires à la cicatrisation. Un peptide du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(IV)$ du collagène IV empêche l'activation des leucocytes. De plus, ce peptide est capable de limiter la progression tumorale en diminuant les propriétés invasives *in vitro* et *in vivo* de cellules de mélanome.

SUMMARY Biological effects of collagens I and IV peptides

Various biological events, such as cell differentiation, cell migration or gene expression, are controlled by cell-cell interactions or by cytokines, as well as by interactions between cells and extracellular matrix. The regulation of these events involves a directed and limited proteolysis of matrix macromolecules, that induces the release of proteic domains and peptides exhibiting biological activities. In this review, we summarise several data from our laboratory showing that peptides from type I and type IV collagens play an important role in the control of inflammation and

tumor progression. Type I collagen peptides stimulate respiratory burst, granule exocytosis and cytokine secretion by human leukocytes (polymorphonuclear neutrophils or monocytes) for the detersion of inflammatory sites and then for the chemoattraction of various cell types needed for wound healing. A peptide of the NC1 domain of the $\alpha 3(IV)$ collagen chain prevents leukocyte activation. In addition, this peptide is also capable of limiting tumor progression by downregulating *in vitro* and *in vivo* invasive properties of melanoma cells.

ABRÉVIATIONS

MMP : métalloprotéinase matricielle ;
MEC : matrice extracellulaire ;
PN : polynucléaire neutrophile ;
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α ;
IL-1 : Interleukine 1 ;
IL-6 : Interleukine 6 ;
Tumeur EHS : tumeur d'Engelbreth-Holm-Swarm.

INTRODUCTION

De nombreux processus biologiques, comme la différenciation cellulaire, la migration cellulaire, l'expression

des gènes ou l'apoptose, sont contrôlés par des interactions de type cellule-cellule ou par des cytokines et facteurs de croissance, mais aussi par des interactions entre cellules et matrice extracellulaire. La modulation de ces interactions met en jeu une protéolyse limitée et dirigée des macromolécules matricielles, avec libération de domaines protéiques ou de peptides biologiquement actifs (Hornebeck *et al.*, 2002).

La plupart des cellules synthétisent une matrice extracellulaire constituée de collagènes, glycoprotéines et protéoglycannes. Elles synthétisent aussi diverses protéinases capables de dégrader cette matrice, ainsi que les activateurs et inhibiteurs de ces protéinases. Un déséquilibre entre activateurs et inhibiteurs entraîne l'activa-



tion des cascades protéolytiques aboutissant à une protéolyse partielle des macromolécules matricielles avec libération de peptides, pour lesquels nous avons proposé le nom de matrikines (Maquart *et al.*, 1999). Ces peptides, ou les macromolécules matricielles elles-mêmes, peuvent se fixer sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules, en particulier les intégrines, à proximité ou à distance de leur site de formation. Cette fixation engendre des voies de signalisation intracellulaire aboutissant au contrôle et à la régulation de divers processus comme l'adhésion des cellules, leur migration, prolifération, expression de gènes et synthèse protéique. De même, les activateurs et inhibiteurs de protéinases peuvent réguler, outre l'activité des protéinases, la migration et la prolifération de cellules (Fig. 1).

Dans cette revue, nous résumerons les principales données acquises sur l'interaction de peptides des collagènes de types I et IV, avec des leucocytes au cours des processus inflammatoires et avec des cellules cancéreuses lors de la progression tumorale.

Interactions collagènes-leucocytes

Les polynucléaires neutrophiles (PN) constituent une des premières lignes de défense de l'organisme contre les agressions. L'étape principale de leur fonctionnement est l'extravasation, qui correspond à leur sortie du vaisseau sanguin pour se diriger vers le site de la lésion, sous l'action de facteurs chimiotactiques. Les PN sont

ralentis dans le courant sanguin et roulent (phase de « rolling ») à la surface de l'endothélium par l'intermédiaire de récepteurs de surface, les sélectines. Des cytokines chimiotactiques (IL-8 ou PAF) stimulent les PN en induisant l'augmentation de l'affinité des intégrines $\beta 2$ pour leurs ligands à la surface des cellules endothéliales (ICAM, PECAM, ...), provoquant une forte adhérence. Les PN, attirés par les facteurs chimiotactiques, migrent à travers l'endothélium (diapédèse). Ils entrent en contact avec la membrane basale sous-endothéliale et, en particulier, avec un de ses constituants majeurs, le collagène de type IV. Leur migration se poursuit ensuite dans le tissu conjonctif sous-jacent où ils entrent en contact avec le collagène de type I ou d'autres stimuli qui les activent.

Collagène I et PN

Le collagène de type I est constitué par l'association en triple hélice de trois chaînes polypeptidiques α , 2 chaînes $\alpha 1(I)$ et une chaîne $\alpha 2(I)$, ayant à chaque extrémité un court domaine non hélicoïdal, appelé télépeptide N- ou C-terminal. Le collagène I extrait par digestion enzymatique avec la pepsine, donc dépourvu de ses télépeptides, induit l'adhésion des PN sans activation. En revanche, le collagène I, extrait par l'acide acétique (acido-soluble) et conservant ses télépeptides, permet à la fois l'adhérence et l'activation des PN (Fig. 2). Cette activation se traduit par un étalement des PN, l'émission de pseudopodes et l'explosion respiratoire. Celle-ci est

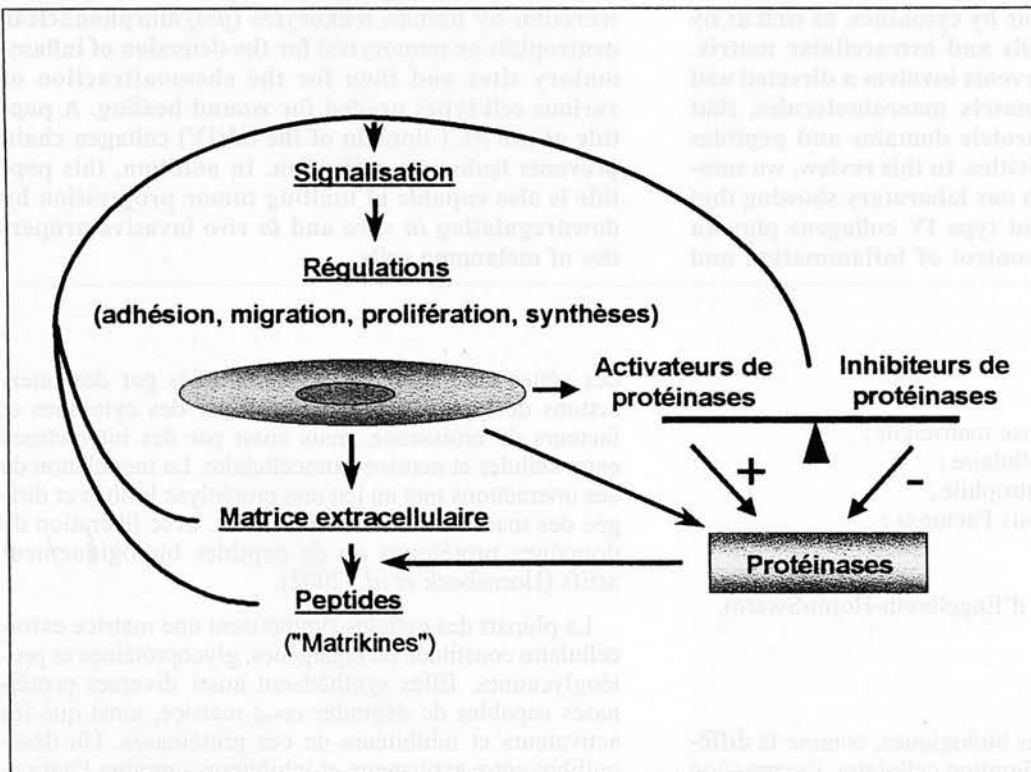


FIG. 1. — Contrôle de l'activité des cellules par les interactions entre cellules et macromolécules de la matrice extracellulaire et leurs domaines protéiques.

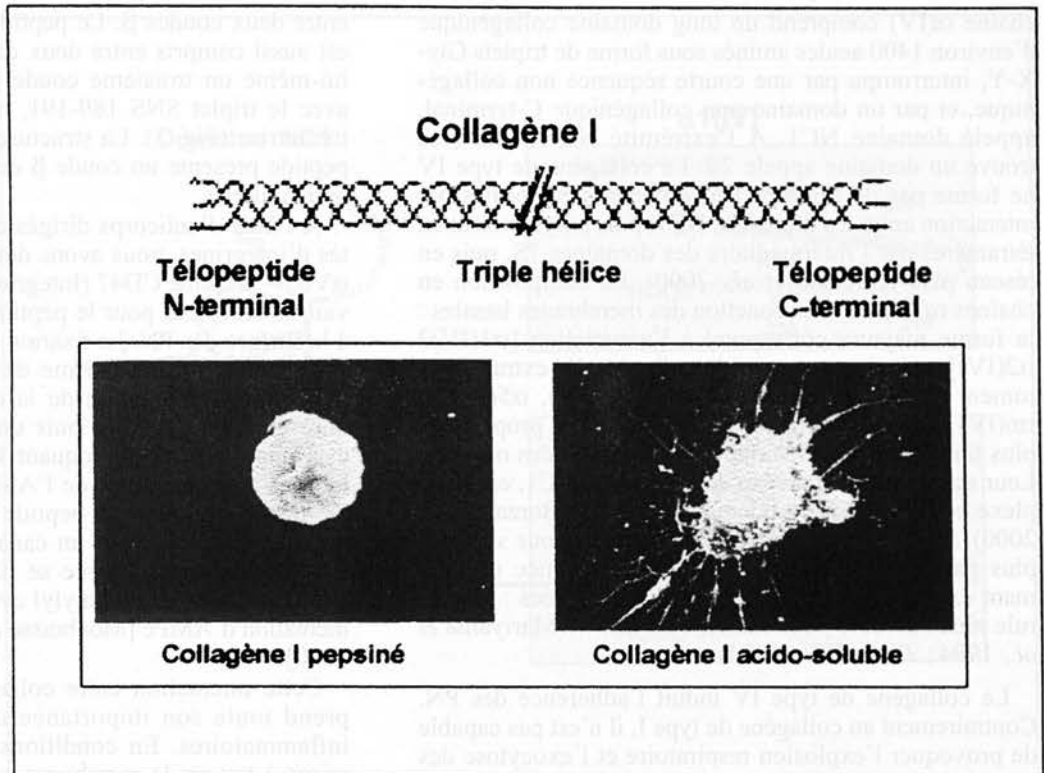


FIG. 2. – Activation des polynucléaires neutrophiles humains par le collagène de type I.

En microscopie électronique à balayage ($G \times 400$), les PN adhèrent au collagène I pepsiné, mais ne sont pas stimulés. Sur le collagène I acido-soluble, les PN s'étalent, forment des pseudopodes et sont activés.

caractérisée par la production de radicaux libres oxygénés, avec une intensité proche de celle induite par les peptides chimiotactiques, comme le peptide fMet-Leu-Phe. De plus, le collagène I induit l'exocytose des granules cytoplasmiques azurophiles et spécifiques (Monboisse *et al.*, 1987). Cette activation implique deux courtes séquences peptidiques, toutes deux localisées sur la même chaîne $\alpha 1(I)$:

- la séquence RGD dans la triple hélice, en position 915-917, responsable de l'adhérence,
- la séquence DGGRYYY, dans le télopeptide C-terminal, en position 1034-1039, responsable de l'activation (Monboisse *et al.*, 1990).

Par utilisation d'anticorps spécifiques des sous-unités des intégrines des leucocytes, nous avons déterminé que l'intégrine $\alpha L\beta 2$ (CD11a/CD18) sert de récepteur du collagène I à la surface des PN (Garnotel *et al.*, 1995). La fixation du collagène I sur cette intégrine induit la phosphorylation, sur des résidus de tyrosine, de diverses protéines cytoplasmiques aboutissant à la formation d'une plaque d'adhérence focale, composée de la kinase d'adhérence focale ($p125^{FAK}$), de kinases de la famille Src et de la paxilline. L'activation de la voie des MAP-kinases, et plus particulièrement de ERK1/2, conduit à la phosphorylation de composants cytosoliques de la NADPH-oxydase comme les protéines $p47^{PHOX}$ et $p67^{PHOX}$, et à leur translocation à la membrane. L'ensemble de ces événements aboutit à l'activation de la NADPH-oxydase et à la production de radicaux libres oxygénés.

De la même façon, le contact de monocytes humains, préparés par élutriation, avec le collagène I acido-soluble provoque leur stimulation, qui se traduit par la production de radicaux libres oxygénés, la sécrétion et l'activation de MMP-9 et la sécrétion de cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α).

Cette interaction se fait par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha X\beta 2$ (CD11c/CD18) et nécessite l'activation du facteur NF- κB (Garnotel *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces résultats montre qu'au cours des processus inflammatoires, le collagène de type I ou certains de ses fragments obtenus par protéolyse limitée, sont capables d'activer les leucocytes. Ces cellules participent activement à la détersion des foyers inflammatoires par libération massive de radicaux libres oxygénés et d'enzymes lytiques, et par sécrétion de cytokines qui attirent à leur tour d'autres cellules nécessaires à la cicatrisation.

Collagène de type IV et PN

Le collagène de type IV est un des composants majeurs des membranes basales. La molécule élémentaire est un hétérotrimère constitué par l'association en triple hélice de trois chaînes polypeptidiques $\alpha(IV)$, parmi six possibles, $\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$, chacune codée par un gène différent. Ces gènes sont associés par deux, COL4A1 et COL4A2, COL4A3 et COL4A4, COL4A5 et COL4A6, disposés tête-à-tête, respectivement sur les chromosomes 2, 3 et X (Hudson *et al.*, 1993). Chaque

chaîne α (IV) comprend un long domaine collagénique d'environ 1400 acides aminés sous forme de triplets Gly-X-Y, interrompu par une courte séquence non collagénique, et par un domaine non collagénique C-terminal, appelé domaine NC1. A l'extrémité N-terminale, se trouve un domaine appelé 7S. Le collagène de type IV ne forme pas de fibrilles. Des dimères sont formés par interaction entre les domaines NC1, puis polymérisent en tétramères par l'intermédiaire des domaines 7S, puis en réseau plan (Boutaud *et al.*, 2000). La composition en chaînes α (IV) varie en fonction des membranes basales : la forme majeure correspond à l'association [α 1(IV) α 2(IV)], qui constitue aussi le collagène IV extrait de la tumeur EHS. Les chaînes α 3(IV), α 4(IV), α 5(IV) et α 6(IV) sont dites mineures car retrouvées en proportions plus faibles et surtout variables en fonction des organes. Leur association, au niveau des domaines NC1, est complexe et non encore totalement élucidée (Borza *et al.*, 2000). La chaîne α 3(IV), à laquelle nous nous sommes plus particulièrement intéressés, est exprimée uniquement dans des membranes basales spécialisées : glomérule rénal, alvéole pulmonaire, cochlée, ... (Mariyama *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1994).

Le collagène de type IV induit l'adhérence des PN. Contrairement au collagène de type I, il n'est pas capable de provoquer l'explosion respiratoire et l'exocytose des granules. (Monboisse *et al.*, 1991). En revanche, lorsque les PN sont soumis à un contact préalable avec le collagène IV, puis à une activation par un autre stimulus (peptide fMet-Leu-Phe, ester de phorbol ou collagène I), la réponse des PN varie en fonction du collagène IV utilisé. Un contact avec du collagène IV de tumeur EHS ou extrait par la pepsine, ne contenant pas les domaines NC1 [α 3(IV)], aboutit à l'augmentation de l'activation déclenchée par le deuxième stimulus (phénomène de « priming »). Au contraire, le collagène IV contenant des domaines NC1 de la chaîne α 3(IV), par exemple celui de la capsule antérieure du cristallin, empêche cette activation en instaurant un état réfractaire des PN (Monboisse *et al.*, 1991). Cet effet inhibiteur est reproduit par une préparation enrichie en domaines NC1 de la chaîne α 3(IV), ainsi que par un peptide synthétique reproduisant la séquence 185-203 de ce domaine NC1 [α 3(IV)]. Il s'agit du peptide CNYYSNSYSFWLASLNPER (Monboisse *et al.*, 1994). La majeure partie de l'activité inhibitrice de ce peptide est concentrée dans l'heptapeptide N-terminal CNYYSNS (résidus 185-191). Le remplacement de la sérine 189 ou 191 par une alanine abolit l'activité biologique de ce peptide. Il en est de même avec la suppression de la cystéine 185; toutefois, cette dernière peut être remplacée par une homocystéine ou une méthionine, sans modification de l'activité. Le peptide homologue α 5(IV) 185-191, de séquence CNYYSNS, n'est pas actif; mais la substitution de l'alanine 189 par une sérine restaure l'activité inhibitrice.

Sur le domaine NC1, la séquence 185-203 est localisée sur une boucle, ce qui facilite son accessibilité. La structure secondaire du peptide NC1 [α 1(IV) 185-203] présente une séquence pratiquement linéaire, comprise

entre deux coudes β . Le peptide NC1 [α 3(IV) 185-203] est aussi compris entre deux coudes β , mais forme par lui-même un troisième coude β , plus particulièrement avec le triplet SNS 189-191, indispensable à l'activité inhibitrice (Fig. 3). La structure tridimensionnelle de ce peptide présente un coude β de type I entre deux brins antiparallèles.

A l'aide d'anticorps dirigés contre diverses sous-unités d'intégrines, nous avons déterminé que le complexe α V β 3 - protéine CD47 (Integrin Associated Protein) servait de récepteur pour le peptide NC1 [α 3(IV) 185-203] à la surface des PN. La fixation du peptide sur cette intégrine induit un mécanisme de transduction complexe, avec une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), puis une augmentation d'AMP cyclique (AMPc) provoquant l'activation de protéines kinases A dépendantes de l'AMPc [Fawzi *et al.*, 2000]. De plus, la fixation du peptide induit une sortie d'adénosine (ou d'ATP) par un canal non encore déterminé. L'adénosine ainsi libérée se fixe sur un récepteur A2 avec activation de l'adénylyl cyclase, à la base de l'augmentation d'AMPc [Monboisse *et al.*, 1998; Fawzi *et al.*, 2000].

Cette interaction entre collagène de type IV et PN prend toute son importance au cours des processus inflammatoires. En conditions physiologiques, le PN migre à travers la membrane basale et entre en contact avec la séquence NC1 [α 3(IV) 185-203], qui induit l'état réfractaire : le PN n'est pas activé. Au contraire, une lésion du sous-endothélium entraîne la dégradation de la séquence inhibitrice. Le PN n'est plus soumis à l'état réfractaire, mais à un phénomène de « priming », qui conduit à l'augmentation de son activation (Fig. 4). Au cours de certaines pathologies comme le diabète sucré, le collagène de type IV est modifié par glycoxydation. L'induction de l'état réfractaire des PN est abolie, contribuant à une aggravation des dommages créés par les radicaux libres oxygénés (Monboisse *et al.*, 2000).

Collagène de type IV et progression tumorale

PROGRESSION Tumorale ET DÉGRADATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

La progression tumorale est un processus complexe caractérisé par différentes étapes. Dans un premier temps, des cellules cancéreuses perdent leurs capacités d'adhérence par dégradation des cadhérines E, et quittent la tumeur primaire. L'invasion locale correspond à la migration de ces cellules dans la matrice extracellulaire (MEC) et nécessite la dégradation de membranes basales, de même que la phase suivante de prolifération et de survie. Au cours de cette étape, des facteurs de croissance liés à la MEC, ainsi que des domaines protéiques des macromolécules matricielles, modulent le comportement des cellules cancéreuses. Ces dernières traversent ensuite la membrane basale vasculaire pour gagner la circulation sanguine. Au cours du processus d'extravasation, elles sortent du vaisseau sanguin pour coloniser un autre organe (poumon, foie, ...) et former des métastases.

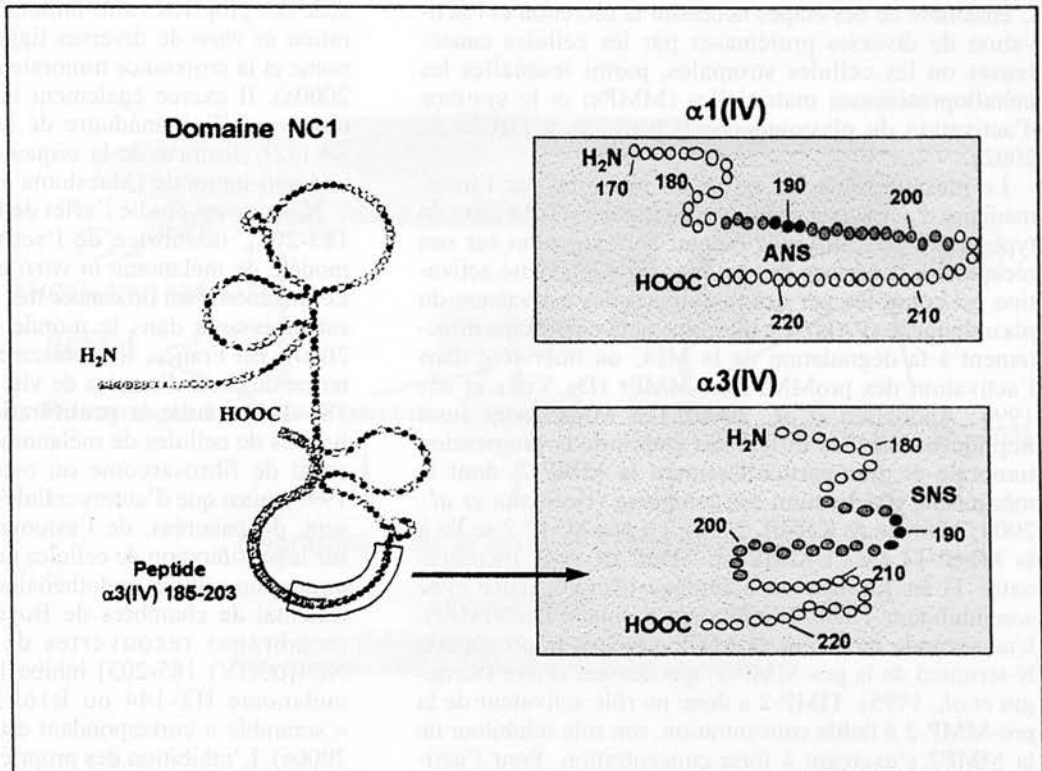


FIG. 3. - Localisation dans le domaine NC1 et structure secondaire du peptide [NC1 $\alpha3(IV)$ 185-203].

Les acides aminés constituant les peptides [NC1 $\alpha1(IV)$ 185-203] et [NC1 $\alpha3(IV)$ 185-203] ont figurés par des cercles bleins.

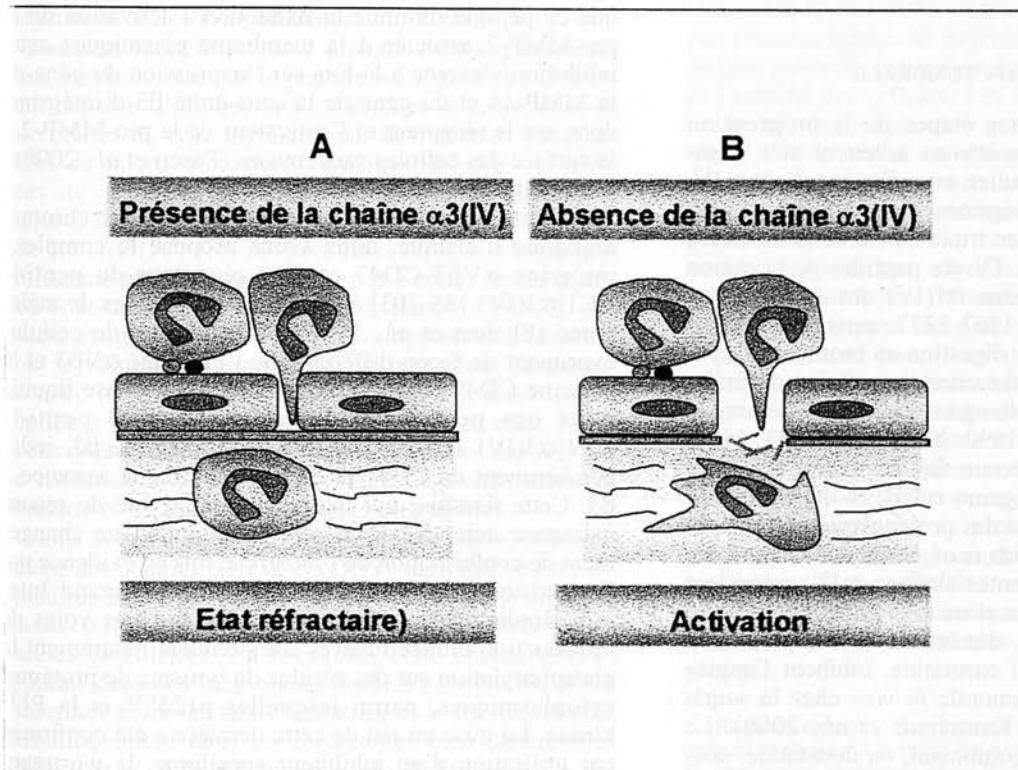


FIG. 4. - Intérêt physiopathologique de l'interaction neutrophiles-collagène IV :

En conditions physiologiques (A), le PN entre en contact avec le peptide NC1 $\alpha3(IV)$ 185-203], qui instaure un état réfractaire du PN.

En cas de lésion de l'endothélium(B), la chaîne $\alpha3(IV)$ est dégradée, donc n'induit plus l'état réfractaire du PN. Ce dernier est activé.

L'ensemble de ces étapes nécessite la sécrétion et l'activation de diverses protéinases par les cellules cancéreuses ou les cellules stromales, parmi lesquelles les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et le système d'activation du plasminogène (Chantrain et DeClerck, 2002).

Le plasminogène est activé en plasmine par l'intermédiaire d'activateurs soit de type tissulaire (tPA) soit de type urokinase (uPA), ce dernier après fixation sur son récepteur à la surface des cellules (uPAR). Cette activation est contrôlée par des inhibiteurs des activateurs du plasminogène (PAIs). La plasmine active participe directement à la dégradation de la MEC ou intervient dans l'activation des proMMPs en MMPs (De Vries *et al.*, 1996; Andreasen *et al.*, 2000). Les MMPs sont aussi impliquées dans les différentes étapes de la progression tumorale et plus particulièrement la MMP-2, dont le mécanisme d'activation est complexe (Hofmann *et al.*, 2000; Vihinen & Kähäri, 2002). La pro-MMP-2 se lie à la MMP-14 (MT1-MMP ou MMP de type membranaire 1) en formant un complexe trimoléculaire avec son inhibiteur TIMP-2 (inhibiteur tissulaire des MMPs). Une seconde molécule de MMP-14 clive le propeptide N-terminal de la pro-MMP-2, qui devient active (Strongin *et al.*, 1995). TIMP-2 a donc un rôle activateur de la pro-MMP-2 à faible concentration, son rôle inhibiteur de la MMP2 s'exerçant à forte concentration. Pour l'activation de la pro-MMP-2, un deuxième mécanisme a été proposé, notamment dans les cellules de mélanome, dans lequel la pro-MMP-2 se fixe sur l'intégrine $\alpha V\beta 3$ par l'intermédiaire de son domaine hémapexine. Une molécule de MMP-14 clive le peptide N-terminal pour donner naissance à la MMP-2 active (Brooks *et al.*, 1996; Deryugina *et al.*, 2000).

COLLAGÈNE IV ET INVASION TUMORALE

Au cours des différentes étapes de la progression tumorale, les cellules cancéreuses adhèrent aux membranes basales et en particulier, au collagène de type IV, par l'intermédiaire des intégrines. Cette adhérence peut intervenir sur le domaine en triple hélice de la molécule ou sur les domaines NC1. Divers peptides de la région en triple hélice de la chaîne $\alpha 1(IV)$ ont été étudiés : $\alpha 1(IV)$ 531-543; $\alpha 1(IV)$ 1263-1277, ainsi que le fragment CB3[IV], obtenu par digestion au bromure de cyanogène; ils induisent l'adhérence de cellules de mélanome et leur motilité (Chelberg *et al.*, 1989; Chelberg *et al.*, 1990; Tsilibary *et al.*, 1990; Kern *et al.*, 1993; Miles *et al.*, 1994). Cette adhérence fait intervenir des intégrines, notamment l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ et dépend de la séquence RGD, mais aussi des protéoglycannes à héparane sulfate (CD44) (Fields *et al.*, 1993). De même, les domaines NC1 des différentes chaînes $\alpha(IV)$ possèdent des activités anti-tumorales et/ou anti-angiogéniques. Le domaine NC1[$\alpha 1(IV)$], dénommé arrestène, et le domaine NC1[$\alpha 2(IV)$] ou constatine, inhibent l'angiogénèse et la croissance tumorale *in vivo* chez la souris (Colorado *et al.*, 2000; Kamphaus *et al.*, 2000). Le domaine NC1[$\alpha 3(IV)$] recombinant, ou tumstatine, pos-

sède des propriétés anti-tumorales en inhibant la prolifération *in vitro* de diverses lignées de cellules de mélanome et la croissance tumorale *in vivo* (Maeshima *et al.*, 2000a). Il exerce également une activité anti-angiogénique par l'intermédiaire de la séquence NC1[$\alpha 3(IV)$ 54-132], distincte de la séquence responsable de l'activité anti-tumorale (Maeshima *et al.*, 2000b).

Nous avons étudié l'effet de la séquence NC1[$\alpha 3(IV)$ 185-203], inhibitrice de l'activation des PN, dans un modèle de mélanome *in vitro* et *in vivo* chez la Souris. Le mélanome est un cancer très agressif dont l'incidence est croissante dans le monde entier (Hofmann *et al.*, 2000). En France, il représente le deuxième cancer en terme de perte d'années de vie. Le peptide NC1[$\alpha 3(IV)$ 185-203] inhibe la prolifération *in vitro* de diverses lignées de cellules de mélanome humain et murin, mais aussi de fibrosarcome ou ostéosarcome (Han *et al.*, 1997), ainsi que d'autres cellules cancéreuses (cancers du sein, du pancréas, de l'estomac), mais n'a pas d'effet sur la prolifération de cellules normales (fibroblastes dermiques ou cellules endothéliales). Dans un modèle expérimental de chambres de Boyden modifiées, avec de membranes recouvertes de Matrigel, le peptide NC1[$\alpha 3(IV)$ 185-203] inhibe l'invasion de cellules de mélanome HT-144 ou B16F1, alors que le peptide « scramble » correspondant est sans effet (Pasco *et al.*, 2000a). L'inhibition des propriétés invasives des cellules cancéreuses nous a conduits à étudier l'effet de ce peptide sur les différentes cascades protéolytiques (Fig. 5). Il inhibe la génération de plasmine active en diminuant l'activité uPA (résultats non publiés). Nous avons également démontré, dans les cellules HT-144, de fibrosarcome HT-1080 et dans les cellules bronchiques BZR que ce peptide diminue la fixation et l'activation de la pro-MMP-2 associée à la membrane plasmique; cette inhibition s'exerce à la fois sur l'expression du gène de la MMP-14 et du gène de la sous-unité $\beta 3$ d'intégrine donc sur le récepteur et l'activateur de la pro-MMP-2 à la surface des cellules cancéreuses (Pasco *et al.*, 2000a; Martinella-Catusse *et al.*, 2001).

En utilisant des anticorps spécifiques et par chromatographie d'affinité, nous avons proposé le complexe intégrine $\alpha V\beta 3$ -CD47 comme récepteur du peptide NC1[$\alpha 3(IV)$ 185-203] à la surface des cellules de mélanome (Shahan *et al.*, 1999b). L'utilisation de cellule exprimant de façon différentielle l'intégrine $\alpha V\beta 3$ et la protéine CD47 et des tests de capture en phase liquide nous ont permis de démontrer que le peptide NC1[$\alpha 3(IV)$ 185-203] se fixe sur l'intégrine $\beta 3$, indépendamment de CD47 et de la sous-unité α associée à $\beta 3$. Cette fixation, qui intervient sur un site de reconnaissance indépendant du site RGD, induit un changement de conformation de l'intégrine, mis en évidence par l'apparition d'épitopes LIBS1 et LIBS2 (Ligand Integrin Binding Site) (Pasco *et al.*, 2000b). Les voies de transduction intracellulaires comprennent notamment la phosphorylation sur des résidus de tyrosine de protéine cytoplasmiques, parmi lesquelles p125^{FAK} et la PI3 kinase. La mise en jeu de cette dernière a été confirmée par utilisation d'un inhibiteur spécifique, la wortman

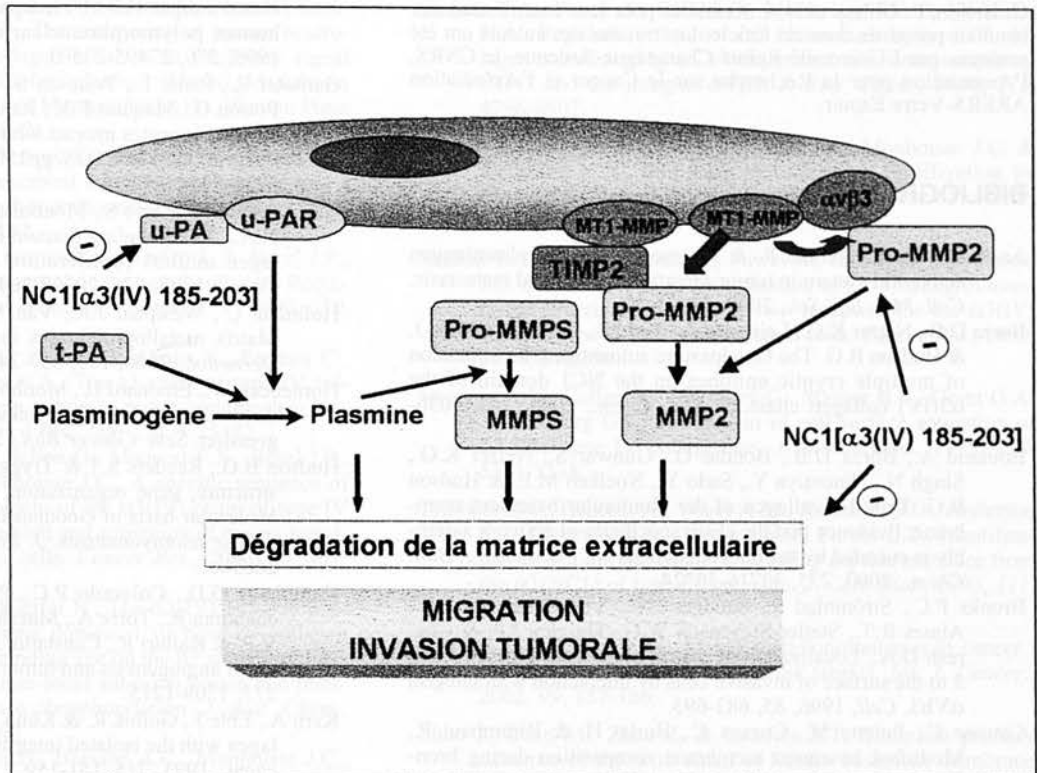


FIG. 5. – Inhibition des cascades protéolytiques impliquées dans l'invasion tumorale par le peptide NC1[α3(IV) 185-203].

Le peptide NC1[α3(IV) 185-203] inhibe l'activité u-PA et la génération de Plasmine active. Il inhibe également l'activation de la pro-MMP-2 en diminuant l'expression de la MT1-MMP et de l'intégrine αvβ3.

ine. La transduction du signal aboutit, comme dans les cellules endothéliales, à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, d'AMPc et à l'activation de protéines kinases A dépendantes de l'AMPc (Shahan *et al.*, 1999a; Shahan *et al.*, 2000).

Dans un modèle *in vitro* d'étude de l'angiogenèse, nous avons montré que le peptide NC1[α3(IV) 185-203] était capable d'inhiber la formation et la croissance de microtubules de type capillaire par des cellules endothéliales de microvasculature humaines (HMEC-1), cultivées sur des billes de dextran recouvertes de gélatine et incluses dans un gel tridimensionnel de fibrine. Le peptide NC1[α3(IV) 185-203] est aussi capable d'inhiber la croissance tumorale *in vivo* chez la Souris. Après injection sous-cutanée de cellules de mélanome B16F1, des souris syngéniques C57BL6 développent des tumeurs dont le volume est diminué par un traitement péri-tumoral avec le peptide NC1[α3(IV) 185-203], alors que le peptide « scramble » correspondant est sans effet. Nous avons obtenu des résultats comparables avec des cellules de mélanome B16F1 transfectées, surexprimant le domaine NC1[α3(IV)] (résultats non publiés).

Nous avons étudié, par immunohistochimie, la distribution des chaînes α1(IV) et α3(IV) dans des tissus pulmonaires sains et cancéreux. Dans les tissus sains, la chaîne α3(IV) n'est trouvée que dans les membranes basales alvéolaires. En revanche, cette chaîne α3(IV) apparaît dans des membranes basales néosynthétisées à l'interface entre les amas tumoraux et le stroma, et plus particulièrement dans les carcinomes bien différenciés (Polette *et al.*, 1997; Catusse *et al.*, 2000).

Conclusion : régulation des cellules par la matrice extracellulaire

Les macromolécules matricielles, par elles-mêmes ou par l'intermédiaire de peptides provenant de leur protéolyse partielle, contrôlent divers processus biologiques et l'activité des cellules. Les résultats décrits dans cette revue montrent que des peptides des collagènes de types I et IV jouent un rôle prépondérant dans les processus inflammatoires, soit en limitant l'activation des cellules inflammatoires dans les conditions physiologiques normales, soit au contraire en exacerbant leur activation pour participer activement à la détersion nécessaire des foyers inflammatoires et pour le recrutement d'autres types cellulaires et l'induction de la cicatrisation. D'autre part, l'activité anti-tumorale du peptide NC1[α3(IV) 185-203] concourt à la régulation de l'invasion tumorale. L'ensemble des résultats suggère que la chaîne α3(IV) du collagène de type IV confère une résistance propre aux membranes basales qui la contiennent, pour limiter l'invasion tumorale. D'autres peptides, provenant notamment de la protéolyse partielle et dirigée des macromolécules constitutives des membranes basales (collagène de type XVIII, laminines, protéoglycannes, ...) participent également au contrôle de la progression tumorale par leur activité anti-tumorale et/ou anti-angiogénique.

Remerciements. – Les auteurs expriment leur plus vive gratitude au Professeur J.P. Borel qui a initié ces travaux au laboratoire. Ils remercient également Mme R. Garnotel et N. Kieffer et MM.

G. Bellon, P. Gillery et N.A. Kefalides pour leur contribution aux résultats présentés dans cet article. Les travaux des auteurs ont été soutenus par l'Université Reims Champagne-Ardenne, le CNRS, l'Association pour la Recherche sur le Cancer et l'Association ARERS-Verre Espoir.

BIBLIOGRAPHIE

- Andreasen P.A., Egelund R. & Petersen H.H., The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, 57, 25-40.
- Borza D.B., Netzer K.O., Leinonen A., Todd P., Cervera J., Saus J. & Hudson B.G. The Goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the $\alpha 3$ (IV) collagen chain. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 6030-6037.
- Boutaud A., Borza D.B., Bondar O., Gunwar S., Netzer K.O., Singh N., Ninomiya Y., Sado Y., Noelken M.E. & Hudson B.G. Type IV collagen of the glomerular basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 30716-30724.
- Brooks P.C., Strömblad S., Sanders L.C., Von Schalscha T.L., Aimes R.T., Stetler-Stevenson W.G., Quigley J.P. & Chesh D.A., Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha V\beta 3$. *Cell*, 1996, 85, 683-693.
- Catusse C., Polette M., Coraux C., Burret H. & Birembaut P., Modified basement membrane composition during bronchopulmonary tumor progression. *J. Histochem. Cytochem.*, 2000, 48, 663-669.
- Chantrain C. & DeClerck Y.A., Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med. Sci.*, 2002, 18, 565-575.
- Chelberg M.K., McCarthy J.B., Skubitz A.P.N., Furcht L.T. & Tsilibary E.C., Characterization of a synthetic peptide from type IV collagen that promotes melanoma cell adhesion, spreading, and motility. *J. Cell. Biol.*, 1990, 111, 262-270.
- Chelberg M.K., Tsilibary E.C., Hauser A.R. & McCarthy J.B., Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration: involvement of multiple, distinct domains of the collagen molecule. *Cancer Res.*, 1989, 49, 4796-4802.
- Colorado P.C., Torre A., Kamphaus G., Maeshima Y., Hopfer H., Takahashi K., Volk R., Zamborsky E.D., Herman S., Sarkar P.K., Erickson M.B., Dhanabal M., Simons M., Post M., Kufe D.W., Weichselbaum R.R., Sukhatme V.P. & Kalluri R., Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.*, 2000, 60, 2520-2526.
- De Vries T.J., Van Muijen G.N.P. & Ruiter D.J., The plasminogen activation system in melanoma cell lines and in melanocytic lesions. *Melanoma Res.*, 1996, 6, 79-88.
- Deryugina E.I., Ratnikov B., Monosov E., Postnova T.I., DiScipio R., Smith J.W. & Strongin A.Y., MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha V\beta 3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 2001, 263, 209-223.
- Fawzy A., Robinet A., Monboisse J.C., Ziaie Z., Kefalides N.A. & Bellon G., A peptide of the $\alpha 3$ (IV) chain of type IV collagen modulates stimulated neutrophil function via activation of cAMP-dependent protein kinase and Ser/Thr protein phosphatase. *Cell. Signalling*, 2000, 12, 327-335.
- Fields C.G., Mickelson D.J., Drake S.L., McCarthy J.B. & Fields G.B., Melanoma cell adhesion and spreading activities of a synthetic 124-residue triple helical « mini-collagen ». *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 14153-14160.
- Garnotel R., Monboisse J.C., Randoux A., Haye B., & Borel J.P., The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 27495-27503.
- Garnotel R., Rittié L., Poitevin S., Monboisse J.C., Nguyen P., Potron G., Maquart F.X., Randoux A. & Gillery P., Human blood monocytes interact with type I collagen through $\alpha X\beta 2$ integrin (CD11c-CD18, gp150-95). *J. Immunol.*, 2000, 166, 5928-5934.
- Han J., Ohno N., Pasco S., Monboisse J.C., Borel J.P. & Kefalides N.A., A cell binding domain from the $\alpha 3$ chain of type collagen inhibits proliferation of melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 20395-20401.
- Hofmann U., Westphal J.R., Van Muijen G.N.P. & Ruiter D.J., Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, 115, 337-344.
- Hornebeck W., Emonard H., Monboisse J.C. & Bellon G., Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Sem. Cancer Biol.*, 2002, 439, 1-11.
- Hudson B.G., Reeders S.T. & Tryggvason K., Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human disease. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Biol. Chem.*, 1993, 268, 2603-26036.
- Kamphaus G.D., Colorado P.C., Panka D.J., Hopfer H., Rameshchandra R., Torre A., Maeshima Y., Mier J.W., Sukhatme V.P. & Kalluri R., Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Biol. Chem.*, 2001, 275, 1209-1215.
- Kern A., Eble J., Golbik R. & Kühn K., Interaction of type IV collagen with the isolated integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 215, 151-159.
- Maeshima Y., Colorado P.C., Torre A., Holthaus K.A., Grunmeyer J.A., Erickson M.B., Hopfer H., Xiao Y., Stillman R.E. & Kalluri R., Distinct antitumor properties of a type I collagen domain from basement membrane. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 21340-21348.
- Maeshima Y., Manfredi M., Reimer C., Holthaus K.A., Hopfer H., Chandamuri B.R., Kharbanda S. & Kalluri R., Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane tumstatin. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 15240-15244.
- Maquart F.X., Siméon A., Pasco S. & Monboisse J.C., Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracellulaire. *J. So. Biol.*, 1999, 193, 423-428.
- Mariyama M., Leinonen A., Mochizuki T., Tryggvason K. & Reeders S.T., Complete primary structure of the human $\alpha 3$ (IV) collagen chain. Coexpression of the $\alpha 3$ (IV) and $\alpha 4$ (IV) chains in human tissues. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 2301-23017.
- Martinella-Catusse C., Polette M., Noel A., Gilles C., Dehan J., Munaut C., Colige A., Volders L., Monboisse J.C., Foidart J.M. & Birembaut P., Down-regulation of MT1-MMP expression by the $\alpha 3$ chain of type IV collagen inhibits bronchial tumor cell line invasion. *Lab. Invest.*, 2001, 81, 167-175.
- Miles A.J., Skubitz A.P.N., Furcht L.T. & Fields G.B., Promotion of cell adhesion by single-stranded and triple-helical peptide models of basement membrane collagen $\alpha 1$ (IV) 531-544. Evidence for conformationally dependent and conformationally independent type IV collagen cell adhesion sites. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 30939-30945.
- Monboisse J.C., Rittié L., Lamfarraj H., Garnotel R. & Gillery P., *In vitro* glycoxidation alters the interactions between collagens and polymorphonuclear neutrophils. *Biochem. J.*, 2001, 350, 377-383.
- Monboisse J.C., Bellon G., Dufer J., Randoux A. & Borel J.P., Collagen activates superoxide anion production by human polymorphonuclear neutrophils. *Biochem. J.*, 1987, 246, 59-603.

- Monboisse J.C., Bellon G., Garnotel R., Fawzi A., Ohno N., Kefalides N.A. & Borel J.P., The interaction of human neutrophils with type IV collagen involves an inhibitory signal transduction pathway. In *Angiogenesis : Models, Modulators and Clinical Applications*, Maragoudakis, Ed., Plenum Press (New-York), 1998, 203-211.
- Monboisse J.C., Bellon G., Perreau C., Garnotel R. & Borel J.P., Bovine lens capsule basement membrane collagen exerts a negative priming on polymorphonuclear neutrophils. *FEBS Lett.*, 1991, 294, 129-132.
- Monboisse J.C., Bellon G., Randoux A., Dufer J. & Borel J.P., Activation of human neutrophils by type I collagen. Requirement of two different sequences. *Biochem. J.*, 1990, 270, 459-462.
- Monboisse J.C., Garnotel R., Bellon G., Ohno N., Perreau C., Borel J.P. & Kefalides N.A., The $\alpha 3$ chain of type IV collagen prevents activation of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 25475-25482.
- Pasco S., Han J., Gillery P., Bellon G., Maquart F.X., Borel J.P., Kefalides N.A. & Monboisse J.C., A specific sequence of the noncollagenous domain of the $\alpha 3$ (IV) chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells. *Cancer Res.*, 2000, 60, 467-473.
- Pasco S., Monboisse J.C. & Kieffer N., The $\alpha 3$ (IV) 185-206 peptide from noncollagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the $\beta 3$ subunit of integrin $\alpha V\beta 3$ and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 32999-33007.
- Plotte M., Thiblet J., Ploton D., Buisson A.C., Monboisse J.C., Tournier J.M. & Birembaut P., Distribution of $\alpha 1$ (IV) and $\alpha 3$ (IV) chains of type IV collagen in lung tumours. *J. Pathol.*, 1997, 182, 185-190.
- Shahan T.A., Fawzi A., Bellon G., Monboisse J.C. & Kefalides N.A., Regulation of tumor cell chemotaxis by type IV collagen is mediated by a Ca^{2+} -dependent mechanism requiring CD47 and the integrin $\alpha V\beta 3$. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 4796-4802.
- Shahan T.A., Ohno N., Pasco S., Borel J.P., Monboisse J.C. & Kefalides N.A., Inhibition of tumor cell proliferation by type IV collagen requires increased levels of cAMP. *Connect. Tissue Res.*, 1999, 40, 221-232.
- Shahan T.A., Ziaie Z., Pasco S., Fawzi A., Bellon G., Monboisse J.C. & Kefalides N.A. Identification of CD47/Integrin-associated Protein and $\alpha V\beta 3$ as two receptors for the $\alpha 3$ (IV) chain of type IV collagen on tumor cells. *Cancer Res.*, 1999, 59, 4584-4590.
- Strongin A.Y., Collier Y., Bannikov G., Marner B.L., Grant G.A. & Goldberg G.I., Mechanism of cell surface activation of 72 kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 5331-5338.
- Tsilibary E.C., Reger L.A., Vogel A.M., Koliakos G.G., Anderson S.S., Charonis A.S., Alegre J.N. & Furcht L.T., Identification of a multifunctional, cell-binding peptide sequence from the $\alpha 1$ (NC1) of type IV collagen. *J. Cell. Biol.*, 1990, 111, 1583-1591.
- Vihinen P. & Kähäri V.M., Matrix metalloproteinases in cancer : prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer.*, 2002, 99, 157-166.
- Zhou J., Ding M., Zhao Z. & Reeders S.T. Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, $\alpha 6$ (IV). Isolation of the cDNAs for $\alpha 6$ (IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 13193-13199.

The same matrix metalloproteinase-2 inhibitor angiogenesis and tumor growth. Proteolytic cleavage of SPARC releases critical peptides which exert opposite effects on angiogenesis. Matrix metalloproteinases derived from glycosaminoglycans also participate in the control of angiogenesis.

and from matrix metalloproteinase-2 inhibitor angiogenesis and tumor growth. Proteolytic cleavage of SPARC releases critical peptides which exert opposite effects on angiogenesis. Matrix metalloproteinases derived from glycosaminoglycans also participate in the control of angiogenesis.

Les métalloprotéinases ont été décrites récemment comme un des fragments dans le microenvironnement de la matrice extracellulaire possédant des sites catalytiques et possédant un caractère protéolytique qui s'exerce dans la matrice extracellulaire (Dewaele et al., 2002). Ces sites catalytiques sont exposés par des modifications structurales ou conformationnelles de la matrice protéique qui peuvent être induites par cinq mécanismes distincts (Fig. 1). Le terme général de protéase pour toutes les molécules de la matrice extracellulaire dépendes de la dégradation produisant molécules bioactives extracellulaires ainsi qu'àux molécules de la matrice extracellulaire comme les protéines, les lipides, les glucosaminoglycans, les protéoglycans, les collagènes et les élastines.

L'angiogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, est un processus indépendant au développement des tissus (Fawzi et al., 1999; Ferrara, 2001). Le

processus physiologique de l'angiogénèse est contrôlé par une balance entre les activateurs et les inhibiteurs présents dans le microenvironnement vasculaire. L'angiogénèse implique la stimulation des cellules endothéliales, la dégradation de la matrice basale sous-jacente par ces cellules pour leur permettre leur migration pour former un nouveau vaisseau, et enfin la recirculation de la ligne basale (Ferrara, 2001). Les cellules endothéliales activées expriment fortement l'intégrine $\alpha V\beta 3$ qui joue un rôle important dans l'angiogénèse et est une cible thérapeutique telle que l'antagonisme de la protéine FEN (Kleiner et al., 2001; Dewaele et al., 2002). Les métalloprotéinases inhibent l'angiogénèse, tout comme d'autres molécules bioactives produites, d'une manière indirecte en inhibant l'angiogénèse et donc la néovascularisation telle que la matrice extracellulaire ou encore la polymérisation structurale (Dewaele et al., 2002).