



HAL
open science

Protéomique fonctionnelle des Métalloprotéases Matricielles (MMPs) dédiée à la détection des formes actives de MMPs dans des protéomes complexes.

Arnaud David

► **To cite this version:**

Arnaud David. Protéomique fonctionnelle des Métalloprotéases Matricielles (MMPs) dédiée à la détection des formes actives de MMPs dans des protéomes complexes.. Sciences du Vivant [q-bio]. Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS, 2007. Français. NNT: . tel-00555061

HAL Id: tel-00555061

<https://theses.hal.science/tel-00555061>

Submitted on 12 Jan 2011

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.



MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
ECOLE DOCTORALE « SCIENCES DE LA NATURE ET DE L'HOMME »
(ED 227)



COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

Année 2007

N° attribué par la Bibliothèque

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Discipline : **Biochimie**

Présentée et soutenue publiquement par

Arnaud DAVID

Le 03 juillet 2007

**« Protéomique fonctionnelle dédiée aux Métalloprotéases Matricelles (MMPs) :
développement d'une méthode extrêmement sensible permettant la détection des formes
actives des MMPs dans des protéomes complexes »**

Sous la direction de : **Monsieur Vincent DIVE, Directeur de Recherche**

JURY

M. Max GOYFFON	Professeur	Muséum national d'Histoire naturelle, Paris (75)	Président
M. Maurice GOELDNER	Professeur	Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Illkirch (67)	Rapporteur
M. Santiago RIVERA	Directeur de Recherche	Faculté de Médecine - Secteur Nord, Marseille (13)	Rapporteur
M. Jean-Baptiste MICHEL	Directeur de Recherche	Université Paris Diderot-Paris VII, Paris (75)	Examineur
M. Vincent DIVE	Directeur de Recherche	CEA/Centre de Saclay, Gif-sur-Yvette (91)	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Maurice Goeldner et le Docteur Santiago Rivera d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que le Professeur Max Goyffon et le Docteur Jean-Baptiste Michel d'avoir bien voulu examiner ce travail ; j'espère qu'ils ne souffriront pas trop de la lecture du présent manuscrit.

Je tiens à remercier également le Professeur André Ménez de m'avoir accueilli au sein de son Département d'Ingénierie et d'Etudes des Protéines à Saclay.

Je tiens aussi à remercier celui qui a su m'apprendre ce formidable métier, dans lequel on réussit avec satisfaction mais douleur. Il m'a montré combien la persévérance n'est rien sans les « contrôles » et qu'un sujet de Recherche se vit. Merci au Docteur Vincent Dive de ses conseils avisés et de m'avoir conforté dans mon envie de faire de la Recherche.

Bien entendu, je n'oublie pas Fabrice et Bertrand qui m'ont épaulé pendant ces quatre années au sein de l'équipe de Vincent, toujours là pour aider et conseiller, de véritables « piliers de thèse » sur qui j'ai toujours pu compter.

Je remercie aussi mes collègues Laurent, Mustapha, Cécile, Anne-Sophie, Sarah & Philippe pour tous les échanges scientifiques et parfois plus personnels que nous avons pu partager.

Un grand merci à Loïc Leclainche, qui est devenu plus qu'un collègue mais un véritable ami.

Remerciements

Je remercie aussi Messieurs Pascal Kessler & Andrzej Galat pour m'avoir transmis une partie de leurs expériences et de leurs connaissances. Vielen Dank Herren !

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues du DIEP et de l'Animalerie pour m'avoir supporté si longtemps : ça relève de l'exploit ! Un grand merci tout particulier à Marie-Hélène, à Jean-Baptiste et Bob, dit le « thaï » pour leurs soutiens et leurs sympathies.

Un énorme merci aussi à mes amis qui m'ont aidé et soutenu de près ou de loin tout au long de ma thèse.

Merci aussi à ma famille et mes proches qui ont toujours cru en moi, mes parents pour leur soutien permanent et mes frères, ces deux docteurs ès sciences, qui n'attendent que moi dans ce monde de diplômés.

Mais surtout, je tiens à remercier celle qui a souffert autant que moi pendant cette thèse, celle qui a subi contre vents et marées chaque aléa de ces travaux, celle qui m'a amené avec courage, croyance et soutien jusqu'à aujourd'hui, ma Princesse : Virginie.

« Alles Gescheidte ist schon gedacht worden, man
muß nur versuchen es noch einmal zu denken » *

Goethe

à ma grand-mère,
à mes parents,
à Virginie

*« Tout a déjà été pensé auparavant, le challenge est d'y repenser. »

Table des matières	5
Abréviations	8
Chapitre I : Les MétalloProtéases Matricielles ou MMP	10
1. Classification des MMP	15
2. Les différents domaines structuraux des MMP	16
a) Le peptide signal	19
b) Le prodomaine	19
c) Le domaine catalytique	20
d) La charnière	20
e) Le domaine C-terminal de type hémopexine	21
3. Les différents groupes de MMP	27
a) Les matrilysines	27
b) Les collagénases interstitielles	27
c) Les stromélysines	28
d) Les gélatinases	28
e) Les MMP transmembranaires ou MT-MMP	29
f) Le groupe hétérogène	30
4. La structure tridimensionnelle des MMP	33
a) Le prodomaine	33
b) Le domaine catalytique	35
c) L'atome de zinc et la catalyse	35
5. Différences avec les protéases à zinc	38
6. Développement d'inhibiteurs de protéases à zinc	40
a) Les premiers inhibiteurs de protéases à zinc	40
b) Les analogues de l'état de transition	41
c) Les premiers inhibiteurs spécifiques de MMP	44
d) Les inhibiteurs sélectifs de la MMP-12	49
e) Les inhibiteurs sélectifs de la MMP-13	50
7. Fonctions des MMP	52
a) Les fonctions physiologiques des MMP	52
b) L'activation des MMP	59

Table des matières

i. Clivage du prodomaine à l'extérieur de la cellule	59
ii. Clivage du prodomaine à l'intérieur de la cellule	62
c) L'inhibition des MMP	62
8. Détection des formes actives de MMP	64
a) La zymographie appliquée à l'étude des gélatinases	64
b) ABPP pour la détection des MMP	67
c) Le marquage par photoaffinité	74
Chapitre II : Développement d'une sonde radioactive pour la détection sensible des MMP	80
1. Conception de la sonde	81
a) Choix du groupement photoactivable	81
b) Site d'incorporation de la radioactivité	85
c) Radiospécificité de la sonde	85
2. Affinité de la sonde vis-à-vis des MMP	86
3. Sensibilité de détection de la sonde	87
a) Site de modification covalente	88
b) Rendement de modification covalente	89
c) Seuil de détection	89
4. Spécificité de la sonde vis-à-vis d'autres partenaires protéiques	90
5. Discussion	92
Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	97
1. Evaluation <i>in vitro</i> de l'efficacité de la sonde à modifier différentes MMP	98
a) Modification de la MMP-12 murine	99
b) Influence du prodomaine sur l'efficacité de la sonde	100
2. Evaluation <i>ex vivo</i> de l'efficacité de la sonde à modifier des MMP sous forme active en présence de broyat tumoral	101
a) Stabilité d'un complexe hMMP-12/sonde dans un broyat tumoral	101
b) Sensibilité de détection de la hMMP-12 au sein d'un broyat tumoral	102
c) Modification de MMP en mélange	103
d) Modification de MMP en mélange en présence de broyat tumoral	106
e) Analyse des protéines d'un extrait tumoral modifiées par la sonde	107
f) Analyse par zymographie gélatine bidimensionnelle du broyat tumoral	111
3. Discussion	115

Table des matières

4. Conclusion	124
Chapitre IV : Matériels et méthodes	126
1. Matériels	127
a) Enzymes et composés	127
b) Préparation des composés et des échantillons	127
c) Tests enzymatiques	128
d) Photoactivation	130
e) Electrophorèses	131
f) Transfert électrophorétique	132
g) Principe du radioimageur	132
2. Méthodes	135
a) Activation des enzymes	135
b) Dosage des MMP	136
c) Purification du composé 2	137
d) Radiomarquage du composé 2	137
e) Tests enzymatiques <i>in vitro</i>	139
f) Culture cellulaire	139
g) Préparation des échantillons	140
h) Photoactivation	141
i) Electrophorèses	143
i. L'électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE)	143
ii. L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE)	145
j) Transfert électrophorétique	151
k) Coloration au nitrate d'argent	151
l) Zymographie	152
i. La zymographie 1D	153
ii. La zymographie 2D	154
iii. Révélation de l'activité gélatinolytique	154
Bibliographie	155
Publication	166

Abréviations

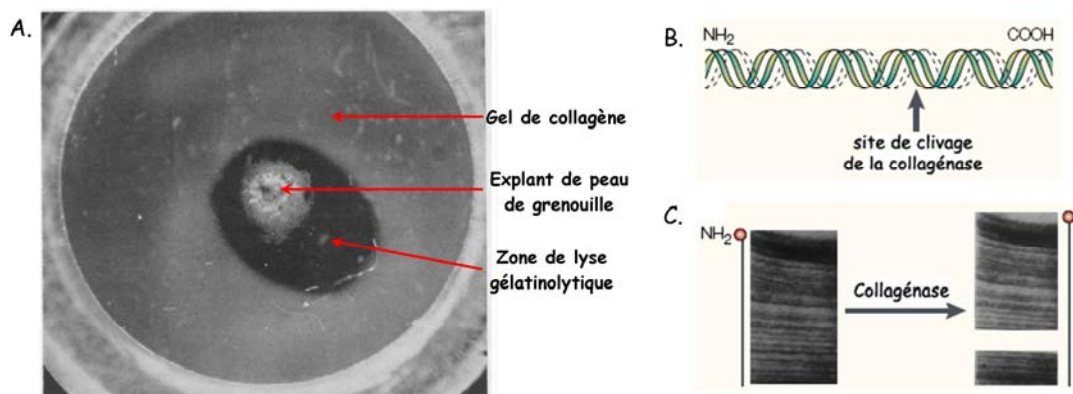
α 1-PI	" α -1 Proteinase Inhibitor"
α 2M	" α -2 Macroglobuline"
ABPP	"Activity Based Protein Profiling"
ACE	"Angiotensin Converting Enzyme"
ADAM	"A Disintegrin And Metalloproteinase"
APMA	Acétate de 4-aminophényle mercure
APN	AminoPeptidase N
ARN	Acide RiboNucléique
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CA-MMP	"Cystein-Array Matrix Metalloproteinase"
CCD	"Charge-Coupled Device"
CD44	Régulateur de la croissance et de l'invasion cellulaire
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CH ₃ CN	Acétonitrile
CHCl ₃	Chloroforme
DIEA	Diisopropylethylamine
Dpa	Acide N-3-(2,4-dinitrophényl)-L-2,3-diaminopropionique
DPP-III	DiPeptidylPeptidase III
EDC	1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]-carbodiimide
Et ₃ N	Triéthyle-amine
EtOH	Ethanol
Fas	Récepteur membranaire
FasL	Ligand de Fas
Fib	Fibronectine
Glu	Glutamate
H ₂	Dihydrogène
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HCl	Acide chlorhydrique
HMDS	1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane
hMMP	MMP humaine
HOBt	N-Hydroxybenzotriazole
IFN- β	Interféron β 1
IGF	Insulin like growth factor
IGFBP	Insulin like growth factor binding protein
IL	Interleukine
IL-2R α	Récepteur α de l'interleukine 2
kDa	kilo Dalton
Ki	Constante d'inhibition
KISS	"Metastin", serait un suppresseur de métastases chez l'Homme
LAP	"Leukocyte alkaline phosphatase"

Abréviations

LiOH	hydroxide de lithium
LIX	Lipopolysaccharide - Induced CXC Chemokine ; CXCL5
Mca	Acide 7-méthoxycoumarin-4-acétique
MCP	"Membrane cofactor protein"
Met	Méthionine
mMMP	MMP murine
MMP	"Matrix Metalloproteinase"
MSA	"Mouse Serum Albumin"
MT-MMP	"Membrane-Type Matrix MetalloProteinase"
NaCl	Chlorure de Sodium
NaNO ₂	Nitrite de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NCS	N-chlorosuccinimide
NEP	Néprilysine
NH ₂ OH	Hydroxylamine
pro-IL	proforme d'Interleukine
pro-TNF α	"proform of Tumor Necrosis Factor- α "
PtO ₂	Oxyde de platine
PTSA	Acide paratoluène sulfonique
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
RAS	RadioActivité Spécifique
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDF	"Spore Differentiation Factor"
SDS	Sodium Dodécyl-Sulfate
TACE	"Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme" ; ADAM-17
TFA	Acide trifluoroacétique
TGF β	"Transforming Growth Factor- β "
THF	Tétrahydrofurane
TIMP	"Tissue inhibitors of MMP"
TNF α	"Tumor Necrosis Factor- α "
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
t-transglut	Transglutaminase tissulaire
VEGF	"Vascular endothelial growth factor"

Chapitre I
Les MétalloProtéases Matricielles
ou MMP

L'existence d'une activité protéolytique capable de cliver le collagène natif fut proposée par Gross *et al.* il y a 45 ans pour expliquer le processus de régression de la queue des têtards, étape de leur métamorphose (Gross *et al.*, 1962) (figure 1.1). Cette activité fut montrée capable de cliver le collagène dans un site très spécifique de la triple hélice de collagène entre des résidus Gly-Leu/Ile. Après la découverte de l'activité de la première métalloprotéase matricielle (MMP), cette activité collagénolytique ne fut isolée sous forme pure qu'après dix années de tentatives infructueuses. En effet, ce n'est qu'en 1970 que la collagénase fut obtenue sous forme pure à partir de peau humaine (Bauer *et al.*, 1970) et d'utérus de rat en involution (Jeffrey *et al.*, 1970).



source : Gross *et al.*, 1962, Gross *et al.*, 1965

Figure 1.1 : A, Photographie de culture de peau de queue de têtard sur un gel de collagène ; cette photographie, publiée par Gross *et al.*, illustre la lyse du collagène autour de l'extrait tissulaire de queue de têtard après 48h de culture à 27°C (Gross *et al.*, 1962) ; B, illustration schématique du site de clivage spécifique de la collagénase ; C, observation au microscope électronique par Gross *et al.* de la dégradation $\frac{3}{4}$ du collagène par la collagénase de grenouille (Gross *et al.*, 1965).

Il se passe encore une quinzaine d'années avant que la séquence de cette protéine soit établie et qu'apparaisse une nomenclature décrivant trois MMP : la MMP-1 pour l'activité collagénolytique décrite ci-dessus, la MMP-2 pour une activité capable de cliver le collagène de type IV (Liotta *et al.*, 1980) et la MMP-3 isolée à partir d'explants d'os mis en culture, de spécificité large clivant notamment les protéoglycanes (Galloway *et al.*, 1983). L'établissement des

séquences de ces protéines a permis de mettre en évidence des éléments de séquence conservés entre ces protéines et de déboucher sur la mise en œuvre d'expériences visant à caractériser de nouvelles MMP. Ainsi, des techniques de criblage différentiel d'expression d'ARN messagers, permettant de détecter l'ensemble des protéines possédant de tels éléments de séquence hautement conservée, furent développées dans différents laboratoires. C'est ainsi que la stromélysine-3 (MMP-11) put être détectée et observée comme étant un des principaux gènes exprimé par des cellules stromales dans des cancers du sein (Basset *et al.*, 1990). Des approches de clonage et de séquençage d'ADN complémentaire à partir d'échantillons tumoraux permirent aussi l'identification de la première forme de MMP membranaire (Sato *et al.*, 1994) et d'une nouvelle collagénase (Freije *et al.*, 1994). Ces travaux permirent de mettre en évidence chez l'Homme la présence d'une famille de protéines, caractérisée par la présence d'un domaine catalytique possédant une activité protéolytique nécessitant la présence d'un atome de zinc (Brinckerhoff *et al.*, 2002). Les MMP représentent un sous-groupe dans la famille des protéases à zinc, constitué de 23 membres chez l'Homme, capables de dégrader conjointement l'ensemble des protéines de la matrice extracellulaire. Cette propriété leur confère la possibilité de remodeler les tissus conjonctifs, en d'autres termes l'environnement immédiat des cellules, en modifiant par exemple les liens physiques existants entre la cellule et la matrice extracellulaire (Shapiro, 1998). Aujourd'hui, on sait que la modification des liens entre la cellule et son environnement peut entraîner la modification de nombreuses voies de signalisation à l'intérieur de la cellule et aboutir par exemple à changer le phénotype de la cellule (Lukashev *et al.*, 1998; Adams, 2001). Dans cette perspective, les MMP ne doivent pas être considérées comme de simples « ciseaux » moléculaires passifs, mais comme des molécules des voies de signalisation à part entière (Mott *et al.*, 2004). Cette vision se trouve renforcée

par la découverte de nouveaux substrats cibles des MMP comme les chémokines, des ligands apoptotiques comme le ligand de Fas (FasL), les protéines de liaison de facteurs de croissance et différents récepteurs influençant la signalisation cellulaire (Egeblad *et al.*, 2002).

Ce répertoire de propriétés biochimiques complexes s'accorde avec l'implication des MMP dans de nombreuses pathologies telles que le cancer, l'athérosclérose, l'arthrite et des maladies pulmonaires (Fingleton, 2007). L'implication directe ou indirecte des MMP dans ces pathologies a naturellement conduit de nombreux laboratoires publics et privés à s'intéresser au développement d'inhibiteurs des MMP en tant qu'agent thérapeutique. Dans le domaine du cancer, secteur où les études cliniques ont été menées le plus loin, les résultats ont été relativement décevants associant, dans certains cas, au faible bénéfice pour le patient des effets indésirables (Egeblad *et al.*, 2002). La faible sélectivité des inhibiteurs utilisés dans ces essais cliniques est aujourd'hui le principal argument avancé pour expliquer l'échec de ces essais. Cet argument semble être validé par l'évaluation du rôle individuel de certaines MMP dans la progression tumorale dans des modèles animaux. En effet, ces expériences démontrent que certaines MMP participent à la progression tumorale, alors que d'autres MMP semblent être mobilisées par l'hôte pour lutter contre la progression tumorale (Folgueras *et al.*, 2004). Ces résultats indiquent la nécessité d'utiliser des inhibiteurs capables de discriminer les MMP participant à la réponse de l'hôte et les MMP favorisant le développement de la pathologie. Ces travaux récents soulignent donc la nécessité de développer des inhibiteurs de plus grande spécificité que ceux mis au point dans le passé. Cependant il est important de noter que, compte tenu de la très grande conservation des résidus figurant dans les sites actifs des différentes MMP, le développement d'inhibiteurs capables d'inhiber chaque MMP individuellement constitue encore aujourd'hui un formidable défi. Pour mieux cerner les besoins, il semble logique

de s'interroger sur la nature des MMP mises en jeu dans une pathologie donnée, à un moment donné. Dans un premier temps, cette question a été abordée par différentes techniques visant à déterminer le niveau d'expression des ARN messagers correspondant aux différentes MMP. En montrant qu'effectivement il existe des profils d'expression particuliers des MMP, ces travaux ont confirmé l'intérêt potentiel de ce type d'analyse. Cependant, dans le cas spécifique des MMP, les limites de ces approches sont très vite apparues (Lopez-Otin *et al.*, 2002). Les MMP subissant en effet de nombreuses modifications post-traductionnelles, il n'existe pas de relation simple entre les niveaux d'expression des ARN messagers et la quantité de protéases qui existera finalement dans le tissu sous forme active. C'est pour répondre à cet objectif précis, que se sont développées, ces dix dernières années, des approches dites de protéomique fonctionnelle, qui visent à déterminer, voire quantifier les niveaux d'expression des protéases dans leur état fonctionnel (Liu *et al.*, 1999; Greenbaum *et al.*, 2002). Appliquées au champ des MMP, ces approches visent en particulier à détecter et identifier la nature des MMP présentes sous formes actives dans un tissu donné. Pour repérer dans un protéome complexe les formes actives de MMP, ces approches nécessitent le développement de ligands permettant de visualiser, capturer et identifier ces formes actives. L'expertise du laboratoire dans le développement d'inhibiteurs de protéases à zinc, en particulier d'inhibiteurs de MMP, constituait un atout pour le développement de telles approches. Le développement d'un ligand capable de détecter avec une très grande sensibilité des formes actives de MMP dans un protéome complexe constitue l'un des objectifs de cette thèse.

1. Classification

Le terme « métalloprotéase » regroupe l'ensemble des enzymes dont l'activité catalytique nécessite un ion métallique, qui est dans la majorité des cas un atome de zinc. Ainsi, chez l'Homme, 186 gènes codant pour des protéases à zinc ont été identifiés, nombre surpassant celui des gènes codant respectivement pour des protéases à sérines (176) et des protéases à cystéines (143) chez cette espèce (Puente *et al.*, 2003). Parmi les familles qui constituent le groupe des métalloprotéases à zinc, la moitié possède un motif consensus HEXXH : ce sont les zincines. Les deux histidines de cette séquence constituent les deux premiers ligands de l'atome de zinc, alors que le glutamate polarise la molécule d'eau impliquée dans l'hydrolyse de la liaison peptidique (Bode *et al.*, 1993).

Les zincines sont divisées en sous-famille selon la nature du troisième ligand de l'atome de zinc ; pour la famille des gluzincines, comme la thermolysine, l'ACE et la NEP, le troisième ligand est un glutamate porté par une séquence conservée NEXXSD. La famille des metzincines (Stocker *et al.*, 1995) regroupe les protéases dont le troisième ligand de l'atome de zinc est un résidu histidine, le motif consensus étant alors étendu à la séquence suivante : HEXGHXXGXXH. Les Metzincines présentent par ailleurs dans leur séquence un résidu méthionine situé sur une séquence structurée en un tournant de type β -1,4, appelé Met-turn. Dans cette structure, la chaîne latérale de la méthionine pointe vers l'atome de zinc catalytique. Cette topologie particulière du résidu méthionine a permis sur des bases structurales le regroupement en sous-famille des metzincines. Les matrixines (MMP) ont une séquence consensus de type (A/S)XMX(A/P/L).

2. Les différents domaines structuraux des MMP

Le séquençage complet du génome humain et une analyse fine des séquences codant pour les MMP ont permis de définir l'ensemble des MMP produites chez l'Homme. 24 gènes codant pour des MMP ont ainsi été identifiés dans le génome humain, donnant lieu à la traduction de 23 protéases de type MMP ; deux gènes distincts codent en effet pour une même MMP : la MMP-23. Les produits des deux gènes sont communément appelés MMP-23A et MMP-23B, mais ces deux enzymes présentent des séquences en aminoacides strictement identiques (Pei, 1999; Velasco *et al.*, 1999; Folgueras *et al.*, 2004).

Les MMP sont des protéines qui présentent une combinaison variable de différents modules sur une même chaîne peptidique et dont les fonctions supposées sont décrites ci-dessous (Nagase *et al.*, 1999) (figure 1.2 et tableau 1.1).

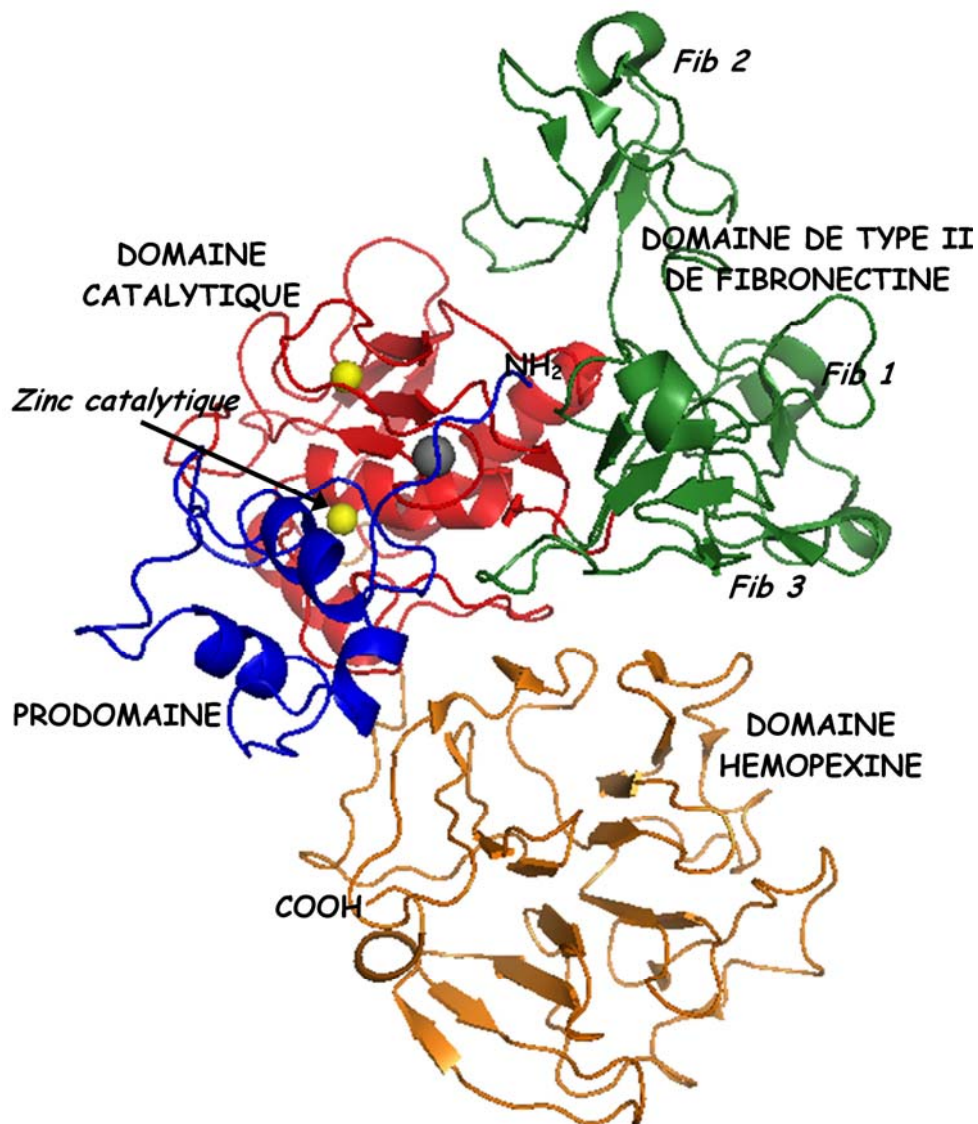


Figure 1.2 : Structure tridimensionnelle de la proforme de la MMP-2 (PDB : 1GXD) illustrant l'organisation modulaire des MMP (Morgunova *et al.*, 2002) ; cette représentation moléculaire a été réalisée avec Pymol v0.99rc6 (Delano Scientific LLC).

Sur cette représentation, le prodomaine (en bleu) est associé au domaine catalytique (en rouge), dont les ions métalliques sont représentés en jaune pour les zincs et en gris pour le calcium ; le domaine en vert, caractéristique des gélatinases (MMP-2 et MMP-9), est une insertion dans la séquence du domaine catalytique et est formé de trois unités fibronectine de type II (Fib 1 à 3) ; Le domaine C-terminal (en orange) identique dans la plupart des MMP est un domaine de type hémopexine.

Tableau 1.1 : Organisation en domaines des MMPs humaines

Enzyme	MMP	Organisation en domaines
Matrilysine	MMP-7	A
Endométase	MMP-26	A
Collagénase 1	MMP-1	B
Stromélysine 1	MMP-3	B
Collagénase 2	MMP-8	B
Stromélysine 2	MMP-10	B
Métalloélastase	MMP-12	B
Collagénase 3	MMP-13	B
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-19	B
Enamélysine	MMP-20	B
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-27	B
Gélatinase A	MMP-2	C
Gélatinase B	MMP-9	C
Stromélysine 3	MMP-11	D
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-21	D
Epilysine	MMP-28	D
MT1-MMP	MMP-14	E
MT2-MMP	MMP-15	E
MT3-MMP	MMP-16	E
MT5-MMP	MMP-24	E
MT4-MMP	MMP-17	E'
MT6-MMP	MMP-25	E'
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-23	F



Peptide signal	Prodomaine	Zn	Domaine catalytique	Séquence de coupure par la furine
Domaines de type II de fibronectine	Charnière	Domaine hémapexine		
Domaine transmembranaire de type I	Ancre glycosyl-inositol phosphate (GPI)			
Domaine transmembranaire de type II				
Queue cytoplasmique	Séquence riche en cystéines	Domaine de type immunoglobuline		

a) le peptide signal :

La séquence des MMP commence par une vingtaine de résidus, généralement hydrophobes, permettant de diriger le polypeptide synthétisé vers les voies de sécrétion. Toutes les MMP possèdent cette séquence « signal », sauf la MMP-23, observation suggérant l'existence d'une voie de sécrétion alternative pour cette MMP (Velasco *et al.*, 1999).

b) le prodomaine :

Le prodomaine est composé d'environ 80 aminoacides, caractérisé par la présence d'une séquence $PR\underline{C}G(V/N)PD$ strictement conservée dans la plupart des MMP. Cette séquence contient le résidu cystéine du « cystein switch » décrit en 1990 par Van Wart et Birkedal-Hansen, dont l'atome de soufre interagit directement avec l'atome de zinc catalytique, maintenant les proMMP sous forme inactive comme l'illustre la figure 1.3 (Van Wart *et al.*, 1990).

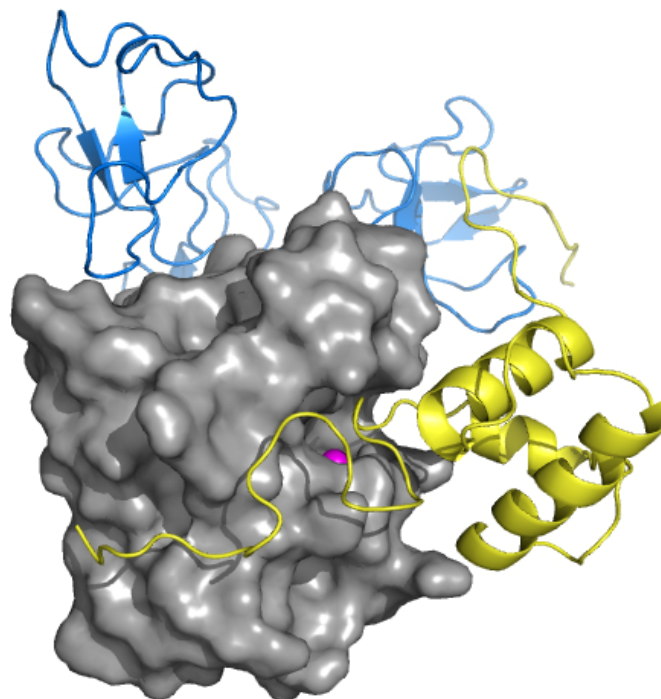


Figure 1.3 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre la boucle du prodomaine (en jaune) et le zinc (en rose) du domaine catalytique (en gris) de la proMMP-2 ; le domaine fibronectine est représenté en bleu en arrière-plan.

Seule la MMP-23 ne possède pas cette séquence (Gururajan *et al.*, 1998). Par ailleurs, dans le prodomaine de quelques MMP (MMP-11, les MT-MMP, MMP-21, MMP-23 et MMP-28), une séquence RX(K/R)R a été observée située en C-terminal du prodomaine, typique d'un site de clivage par la furine (Marchenko *et al.*, 2003; Visse *et al.*, 2003).

c) le domaine catalytique :

Le domaine catalytique, composé d'environ 170 résidus, est caractérisé par un site de liaison de l'atome de zinc catalytique HEXGHXXGXXH. Dans la famille des métalloprotéases à zinc, c'est le domaine le plus petit par le nombre de résidus entrant dans sa composition. Cette remarque suggère que ce domaine pourrait représenter un ancêtre commun à de nombreuses protéases à zinc modernes. Cet argument est renforcé par la conservation de structures secondaires, observées chez les MMP, dans d'autres protéases de plus grande taille. Outre l'atome de zinc du site catalytique, le domaine catalytique possède plusieurs ions métalliques structuraux : un atome de zinc non-échangeable et deux ou trois atomes de calciums, nécessaires à la stabilité et à l'activité de l'enzyme (Bode *et al.*, 1994). De façon remarquable, on observe dans le domaine catalytique des MMP-2 et -9 (les Gélatinases A et B) la présence d'une insertion longue de 175 résidus. Cette séquence possède trois motifs répétitifs proches en structure du domaine de type II de la fibronectine. La présence de ces domaines particuliers dans ces deux MMP est responsable de leur spécificité à dégrader la gélatine (Brinckerhoff *et al.*, 2002) (figure 1.2).

d) la charnière :

Cette séquence permet de relier le domaine catalytique des MMP à leur domaine C-terminal, excepté dans le cas des matrilysines (MMP-7 et MMP-26), dont les structures primaires ne sont constituées que du prodomaine et du

domaine catalytique. La MMP-23 est une autre exception dans laquelle le peptide charnière est remplacé par une région riche en cystéines $CX_6CX_8CX_{10}CX_3CX_2C$. Cette région est très variable en taille, de 16 à 65 résidus et très flexible (Murphy *et al.*, 1997). La taille de cette région intervient certainement dans des interactions intermoléculaires engagées par les MMP qui impliquent à la fois le domaine catalytique et le domaine hémapexine.

e) le domaine C-terminal de type hémapexine :

La plupart des MMP présente en C-terminal du peptide charnière un domaine constitué de 210 résidus. Ce domaine, en forme de disque ellipsoïdal, fortement similaire aux membres de la famille des hémapexines, ressemble à une hélice à 4 pales, dont chaque pale est formée de 4 brins β anti-parallèles et d'une hélice α (Gomis-Ruth *et al.*, 1996) (figure 1.2). Ce domaine est absolument nécessaire aux collagénases pour la dégradation de la triple hélice de collagène interstitiel (Bode, 1995). De plus, ce domaine apparaît essentiel dans l'activation de la proMMP-2 par la MMP-14 à la surface de la cellule (Brinckerhoff *et al.*, 2002; Visse *et al.*, 2003).

Dans le cas de la MMP-23, le domaine hémapexine est remplacé par des motifs similaires à ceux trouvés dans la séquence du récepteur à l'IL-1, caractéristiques d'un repliement de type immunoglobuline C2 (Pei, 1999).



Dans le cas des MT-MMP, le domaine hémapexine est suivi soit d'un domaine transmembranaire (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP), soit d'un groupement inositolphosphate (MT4-MMP et MT6-MMP), permettant l'ancrage membranaire de l'enzyme à la surface de la cellule (Brinckerhoff *et al.*, 2002).

Tableau 1.2 : Alignement des séquences des 23 MMP humaines.

Cet alignement a été réalisé à l'aide de Clustalw ; les numéros d'accès des séquences sont issus de la banque de données ExPASy/Swissprot et sont présentés dans le tableau ci-dessous.

MMP-1	P03956
MMP-2	P08253
MMP-3	P08254
MMP-7	P09237
MMP-8	P22894
MMP-9	P14780
MMP-10	P09238
MMP-11	P24347
MMP-12	P39900
MMP-13	P45452
MMP-14	P50281
MMP-15	P51511
MMP-16	P51512
MMP-17	Q9ULZ9
MMP-19	Q99542
MMP-20	O60882
MMP-21	Q8N119
MMP-23	O75900
MMP-24	Q9Y5R2
MMP-25	Q9NPA2
MMP-26	Q9NRE1
MMP-27	Q6UWK6
MMP-28	Q9H239

Légende des pages suivantes :

-  Structure en hélice α ;
-  Structure en feuillet β .

	hi	Prodomaine	h2		
MMP1	FPATLLEQEQD	---VDLVQKYLEKYLKNDGRQVKKRRNSG	---PVEKLLKMQKEFF 71		
MMP2	FAAPSPPIKFPG	---DYAP---KTDKELAVQYLN---	---TFYGGPKESCNLFLVKKTLKMQKEF 81		
MMP3	YPLDGAARGDGT	---SMNLQKYLENYDLDKDKVQKQFVRRKDSG	---PVDKTKIREMQKEL 71		
MMP7	JLQEAAGMSLQ	---WEQADYLKRFYLYDS---	---ETKNANSLEAKLQEMQKEF 66		
MMP8	FPVS---SKEKN	---TKTVQDYLEKRYQLPSNQYQSTRKNGTN	---VIVEKLLKEMQREF 70		
MMP9	KQRFSTLVLPFG	---DLRNLNDRQLAEEYLYRYGYTRVAAERGESKSLGPFALLLQKQL	78		
MMP10	YPLSGAAKEEDS	---NKDLAQQLYKYYNLERDKVQKFR	---KDSN---LIVKIKQMQKEL 70		
MMP11	ARALLPFMLL	---LLQFPPLLARALPPDVLHHAERRGQPWHAALPSSP	---A 60		
MMP12	PLNSSTLSEKN	---NVLFGERYLEKRYGLEINKLPYTKMYSGNLKKEKI	QEMQHFL 71		
MMP13	JLPLSGGDEDDLSEEDLQFAERLYSRYPHNLAGILKENAAS	---MTERLRMQSFF 75			
MMP14	TLASLG---SAQS	---SFSPEAWLQOYGYLLPPQDLRTHTRQSR	POSLSAAIAAQKFY 72		
MMP15	JLGLGSLGVAEDA	---EVAENWLRLYGYLLPPGSRMSTRSAQIILASALAMQREY	90		
MMP16	JLJLWILCAVCGTEQ	---YFNVEVWLOKYGYPDPDRMSVLRSAAETMQSALAAVQOQFY	80		
MMP17	GGCAAPAPRAED	---LSLGVWELSRFGYLLPPADPTGQLQTEELSKAITAMQOFG	92		
MMP19	---MTVSGRVLGL	---AEVAPVDYLSQYGYLQKPLE	---GSNNFKPEDITEALRAFQEAS 64		
MMP20	JLVAASPTWRNN	---YRLAQAYLDKYYTNKEGHQIGEMVARGNSMIRKIKELQAF	79		
MMP21	JLPSLRQAKPIADLHAAQRFLSRYSGWYAAWGFSPGEP	PETPKGAALAEAVRRFRAN 96			
MMP23	MGRGARVPSEAP	---GAGVERRWLGAALVALCLL	PALVLLARLGAAPVAWSA 50		
MMP24	MPSRGGRAAPGPPPPP	PGQAPRWSRWYGRLLLLLPALCCLPGAARAAAAAGAGNRAA	VAVAVARADEAEA---PEFAGQNWLSYGYLLPYDSRASALHSKAKALQSAVSTMQQFY 118		
MMP25	---MR---	JLRLJALLLALLLAPP	---ARAPKPSAQD---VSLGVDWLTTRYGYLLPPHPAQAQLQSP	PEKLRDAIKVMQREFA 69	
MMP26	---MQLVIRVTIFLPMCF	A---MQLVIRVTIFLPMCF	---MDFVGYGHQFFLTK---	KESPLLTQETQQLLQOEF 61	
MMP27	---MKRLLLELFFITFSSA	---	---	FLVWRMTENEE---NMQLAQAYLNQFY	SLEIEGNHLVQSKNRS---LDDDKIREMQAEE 70
MMP28	---MVARVGLLRLRALQLLLWGHLD	---	---	AQPAERGGQE---LRKEAEAFLEKYGYLENQVP	---KAP---TSTRFSDAIRAFQWVS 70

	h3	SI	ha																						
MMP1	GLKVTGKPAEATLKVWKQ	CRGGVPDVAQ---	FVLTTEGN---	PRWEQTHLYRIENYNT	---PDLPRADVDAIEKAEQFLWSNVTPLTF 149																				
MMP2	GLPQTGLDQNTIETMRK	CRGNPDVANYN---	FPRK---	PKWDKQNTIYRIEYGT	---PDLDPETVDDAFARAFQVWSDVTPLEF 159																				
MMP3	GLPVTGKLDSDTLEVMRK	CRGGVPDVGHFR---	FPGI---	PKWRKTHLYRIYVNYT	---PDLPKDAVDASVEKALKVWEEVTPLEF 149																				
MMP7	GLPVTGLNLSRVIEIMQK	CRGGVPDVAEYS---	FPNS---	PKWTSKVVTYRIVSYT	---RDLPHITVDRLVSKALNMWGIPLTF 144																				
MMP8	GLNVTGKNEEETLDMKK	CRGGVPDSGG---	FMLTPGN---	PKWERTNLTYRIRNYT	---PQLSEAEVERAIKDAEELMSVASPLIF 148																				
MMP9	SLPVTGELDSATLKA	MRTCRGGVPDLGRFQT---	FEGD---	LKWHHNITWIQNS---	EDLPRAVIDDAPARAFALWSAVTPLTF 156																				
MMP10	GLEVTGKLDTDITL	EMRKCRGGVPDVGHFS---	FVLS---	GGRWEKTDLYRILRFP	---WQLVQGVQVQRTMAEALKVWSDVTPLEF 148																				
MMP11	PAPAT---QEA	PRASSLRPRCGGVPDSDGLSARN---	---	RQR---	---	FREMPGGPV---	WRKHYYTYRINNYT	---PDMNREDVDVAIRKAFQVWSNVTPLKE 149																	
MMP13	GLEVTGKLDNDTLD	VMKKCRGGVPDVGYYN---	---	LKWSKMLTYRIVNYT	---PDMTHSEVEKAFKAKVWSDVTPLEF 153																				
MMP14	GLQVTGKADADTMKAMRR	PRCGVPDQFGAEIKANV---	---	GLKWQHNEITFCIQNYT	---PKVGEYATYEAIRKAFRWESATPLRF 159																				
MMP15	GI PVTGVLDEETKE	WMKRCRGGVPDQFQGVRYKANILRR---	---	GRKNNHHLTFSIQNYT	---EKLGWYHSMEAVERA	FRVEQATPLVF 179																			
MMP16	GIMNTGKYDRNTI	DMKKCRGGVPDQTRGSKFHI---	---	GQKWQHKHTYSIKNVT	---PKVGDPETRKAI	RRRFAFDVWQNVTPLEF 167																			
MMP17	GLEATGILDEATL	ALMKTCRSLDPLVLT---	QA---	---	---	QAPAP---	TKNNKRNLSWRVTF	FPFROSPLGHDTVRALMYALKVWSDIAPLNF 178																	
MMP19	ELPVSQGLDDAT	RAMRQRCGLEDP---	---	ENQTKLYLLGLL	---RWRKKHITFRILNLP	---STLPHHTARALRQA	FQDWSNVAPLTF 144																		
MMP20	GLQVTGKLDQTTM	NVIKCRGGVPDVAANYR---	---	PKWKNTLTYRISKYT	---PSMSSEVVDKAVEMALQAWSSAVPLSE 157																				
MMP21	ALPASGELDAATL	AAMNRPRCGVPMRPPPSAPSPPPPPPPRA---	---	RSRS	PRALSLSRRC	WQPRGYPDGAAQA	FSKRTLSWRLLGEALSQD	RRRVALAERWSEVTPLEF 213																	
MMP23	AQGDVAALGLS	AVPPTRVFGLAP---	---	RRR	---	YTLTPAR---	LRWDHNLTYRILS	FPRNLLSPRETRALAAAAFRMWSDFPSE 129																	
MMP24	GI PVTGVLQDQTT	IEWMKCRGGVPDHPHLSR---	RR---	RRR	---	YALT---	GQWRQKHHTYSI	HNNT---PKVGEELDKRAIRQAFDVMQKVTPLTF 203																	
MMP25	GLPETGRMDPG	IVATMRKCRSLPDVLGVAGLVR---	---	RRR	---	YALS---	GSVMKRTLTWRVRS	FPQSSQLSOBETRVLMYSYALMAGWMSGLTF 157																	
MMP26	HRNTDILLDMQ	HALLHQFHC	GGVDPDGS---	---	---	TSIS	SPGR---	CKWNKHTLYRILNY	P---HDMKPSAKDSTINYSIWSNVTPLIF 139																
MMP27	GLVTGKLDNSQ	ITLIMKTCGGVPDVGQ---	---	YG---	YTLPG---	---	WRKYNLTYRILNY	P---PDMARA	AVDEALQEGLEWKS	VTPLEF 146															
MMP28	QLPVS	GVLDRA	TLRQMTRE	CGVTD	TNSYAAWAERL	SDLE	FAHR	TKMRKR	---	FAKQ---	GNKWKYKQHL	SYRLVNW	P---EHLPE	PA	RG	AV	RA	AA	EQ	LS	NS	VA	LE	EE	170

« Cysteine switch »
Site de reconnaissance de la furine

Domaine catalytique (1/2)

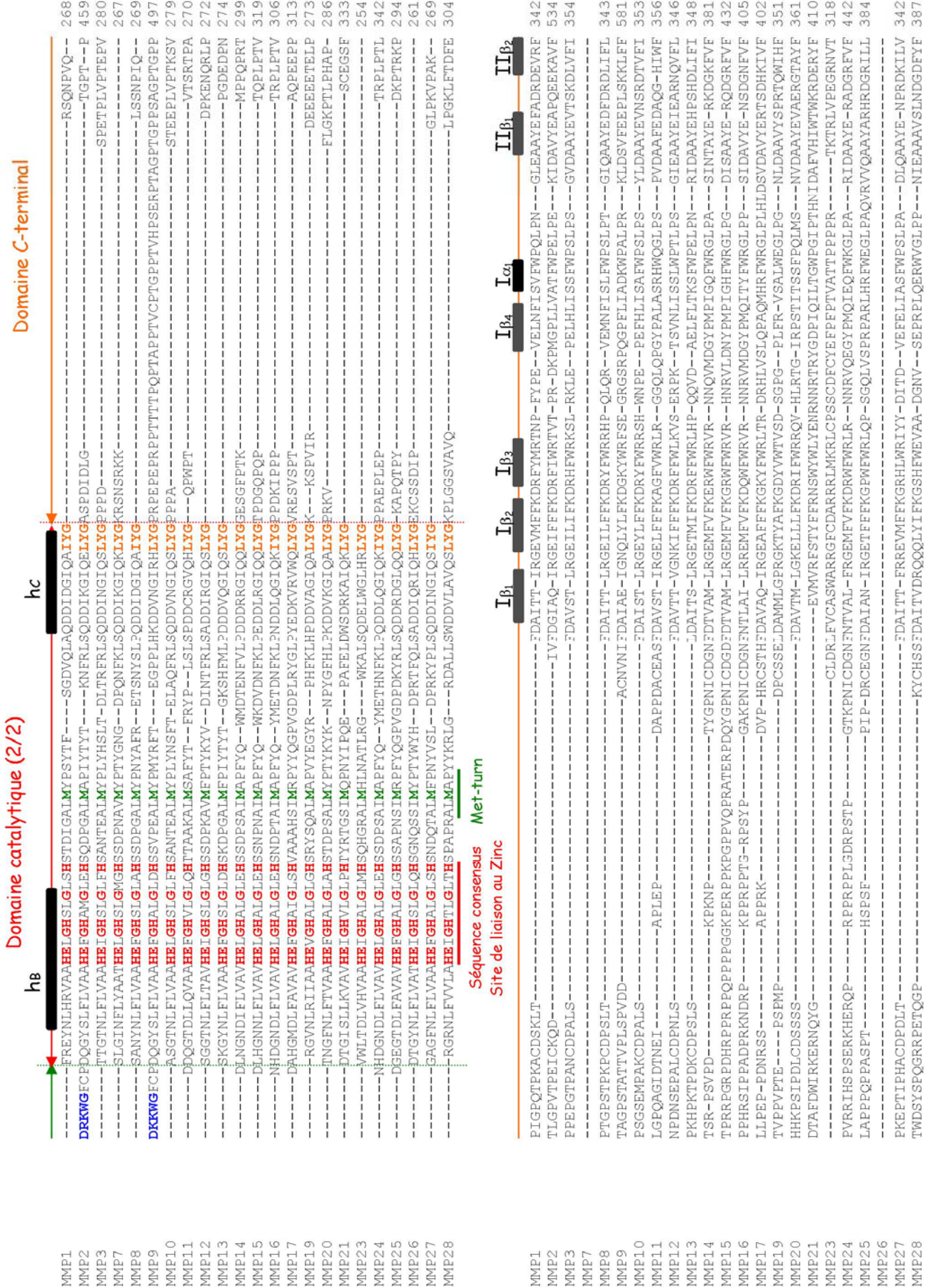
	SIII	SIV	Sv	
MMP1	TKVSE---	FDGPGNLAHAFQPGRGIG--	GDHFDDEDEWRTNN	206
MMP2	SRIHD---	FDGKDLLAHAFAPGTGVG--	GDSHFDDDELWTLGEGQVVRV	264
MMP3	SRLYE---	FDGPNVLAHAYAPGGIN--	GDHFDDEQWTKD	206
MMP7	RKVVW---	FDGPNVLAHAFAPGTGIG--	GDHFDDEWRTDGS	202
MMP8	TRISQ---	FDGPNVLAHAFAPGTGIG--	GDHFDDEWRTDGS	205
MMP9	TRVYS---	FDGKDLLAHAFPPGGIQ--	GDHFDDELMSLGKGVVPT	261
MMP10	SRLYE---	FDGPGSLAHAYPPGGIY--	GDHFDDEKWTED	205
MMP11	TEVH---	EGRADIMIDFARYWHGDDLP--	FDGPGVLAHAFPP--	202
MMP12	SKINT---	GMADILVVFARGAHGDFHA--	FDGKGGILAHAFPGSGIG--	206
MMP13	TRLHP---	GIADIMISFGIKHGDFYP--	FDGSGLLAHAFPPGNYG--	210
MMP14	REVPYI	REGHEKQADIMIFAEFGHDSTP--	FDGEGFLAHAYFPGNIG--	226
MMP15	QEVPE	DIRLRKQKADIMVLFASGFGDSSP--	FDGTGGFLAHAYFPGGLG--	246
MMP16	EEVPS	ELENGK-RVDVITII	FASGFGDSSP--	233
MMP17	HEVA---	GSTADIQIDFSKADHNDGYP--	FDGPGTVAHAFPPGHHHTAGDTH	238
MMP19	QEVQAG	-----	AADIRLSFHG-RQSSYCSN	201
MMP20	VRINS---	GEADIMISFENGHDGDSYP--	FDGPRGTLAHAFAPGEGLG--	214
MMP21	REDL	AAFG--	AAVDIKLGFGRGRHLGCPR--	271
MMP23	REVAPE	-----	QPSDLRIGFYPINHTDCLVLSALHHC	199
MMP24	EEVPE	HEIKSDR-KEADIMIF	FASGFGDSSP--	269
MMP25	HEVDS---	PQQE	PDLIDFARAFHQDSYP--	220
MMP26	QQVQN---	GDADIKVSWQWAHE	DGWP--	196
MMP27	TKISK---	GIADIMIAFRTRVHGRCPRY--	FDGELGVLGHAFPPGGLG--	204
MMP28	WEAPATG	-----	PADIRLTFEQGDHNDGLGN--	229

Insertions Fibronectine de type II

MMP1	FEKDKYGF	FCPHEALFTMGGNAEQCKPFRFQGTSDSCTTEGRDGYRCWCTTEDYDRDKKYGFC	FCETAMSTV--	383																		
MMP2	MMP3	MMP7	MMP8	MMP9	MMP10	MMP11	MMP12	MMP13	MMP14	MMP15	MMP16	MMP17	MMP19	MMP20	MMP21	MMP23	MMP24	MMP25	MMP26	MMP27	MMP28	
MMP1	YTD	DRF	FCP	SERLYTR	DGNADKPCQFPFI	FQGSY	SACTFDRSDGYRCWCTTANYDRDKLFG	FCPTRADSTW	MGGNSAGELCV	FPFTFLGKEY	STCTSEGRDGR	LWCATT	SNFDS	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fib-2

Fib-3



3. Les différents groupes de MMP

Sur la base de leur structure primaire et de leur spécificité vis-à-vis de certains substrats protéiques, les MMP peuvent être classées en 6 groupes.

a) Les matrilysines :

Les matrilysines (MMP-7 et MMP-26) sont structurellement les plus simples, car elles ne possèdent que le peptide signal, le prodomaine et le domaine catalytique. Ces MMP sont spécifiquement exprimées par les cellules cancéreuses d'origine épithéliale ; leurs spectres protéolytiques sont partiellement divergents mais incluent la fibronectine et la gélatine. La MMP-7 semble en plus jouer un rôle crucial dans la survie, en diminuant l'apoptose, un des substrats de la MMP-7 étant le ligand du récepteur Fas, FasL. L'E-cadhérine étant un autre de ces substrat, la MMP-7 est aussi impliquée dans le phénomène d'invasion dans la progression tumorale (Chantrain *et al.*, 2002; Visse *et al.*, 2003). La MMP-7 interviendrait également dans la maturation des défensines au niveau du tissu intestinal (Wilson *et al.*, 1999).

b) Les collagénases interstitielles :

Les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8, MMP-13) forment un second groupe de MMP et interviennent dans la dégradation du collagène fibrillaire, incluant les collagènes de type I, II, III et VI. Le clivage protéolytique du collagène fibrillaire par ces enzymes entraîne la formation de gélatine (collagène dénaturé), qui peut ensuite être dégradé par les gélatinases. La MMP-13 (collagénase-3) est caractérisée par un spectre enzymatique plus large et est essentiellement exprimée dans des zones nécessitant un remaniement rapide de la matrice extracellulaire, telles que le tissu osseux foetal en développement ou les sites d'inflammation chronique. Plusieurs

carcinomes et sarcomes ont aussi été associés à une hyperactivité de la MMP-13 (Chantrain *et al.*, 2002).

c) Les stromélysines :

Le troisième groupe de MMP est composé des stromélysines (MMP-3, MMP-10 et MMP-11). Les MMP-3 (stromélysine 1) et MMP-10 (stromélysine 2) sont principalement produites par les cellules épithéliales saines, mais ont aussi été décrites dans certains carcinomes. Leur spectre protéolytique relativement étendu inclut de nombreuses glycoprotéines et des protéoglycanes (Chantrain *et al.*, 2002). Comme mentionné ci-dessus, le gène de la MMP-11 (stromélysine 3) a été caractérisé, la première fois, comme un des principaux gènes s'exprimant dans les cancers du sein. Son expression dans différentes tumeurs est associée à un mauvais pronostic pour la survie du patient (Rio, 2005). La MMP-11 semble jouer un rôle mineur dans la dégradation de la matrice extracellulaire, par contre les inhibiteurs de protéases à sérine du type α 1-PI et la protéine de liaison au facteur de croissance de type insuline (IGFBP) ont été proposés comme des substrats physiologiques potentiels de la MMP-11 (Chantrain *et al.*, 2002).

d) Les gélatinases :

Le quatrième groupe est constitué des gélatinases (MMP-2 et MMP-9). Leur activité protéolytique principale est dirigée contre la gélatine (collagène interstitiel dégradé par les collagénases interstitielles) et les collagènes de type IV et V de la membrane basale. Une caractéristique structurale des gélatinases est la présence, au sein de la séquence du domaine catalytique, de trois séquences peptidiques répétitives analogues aux motifs de type II de la fibronectine. Ces derniers forment un domaine à part entière hors du domaine catalytique et n'altèrent pas la structure globale du domaine catalytique. Les motifs fibronectine permettent la liaison à la gélatine, les collagènes et la

laminine. La gélatine A (MMP-2) est physiologiquement exprimée par les cellules du stroma de la plupart des tissus. De plus, des mutations de la MMP-2 chez l'Homme, qui engendrent une absence d'activité de l'enzyme, sont liées à une forme d'ostéoporose ; il semble donc que, chez l'Homme, la MMP-2 jouerait un rôle important dans l'ostéogénèse. En revanche, l'expression de la gélatinase B (MMP-9) est faible ou absente dans les tissus normaux et limitée aux monocytes et aux macrophages. Toutefois, elle peut être induite en cas de remaniement tissulaire comme le développement embryonnaire, la cicatrisation des plaies ou l'invasion tumorale ; dans ce cas, elle est produite par les cellules stromales ou par les cellules malignes (Chantrain *et al.*, 2002; Visse *et al.*, 2003).

e) Les MMP transmembranaires (MT-MMP) :

Les MMP transmembranaires (MMP-14, -15, -16, -17, -24 & -25 aussi dénommées MT1-MMP à MT6-MMP) sont liées à la membrane plasmique soit par l'intermédiaire d'un domaine hydrophobe transmembranaire situé en C-terminal, soit par un pont inositolphosphate. Ces six MT-MMP sont capables de dégrader de nombreux composants de la matrice extracellulaire ; de plus, parmi ces MMP, certaines ont pour substrats des facteurs de croissance. La MT1-MMP, qui possède une activité vis-à-vis des collagènes de type I, II et III, joue aussi un rôle dans l'angiogénèse ; la MT5-MMP est spécifique de la région cérébrale et est principalement exprimée dans le cervelet. La MT6-MMP est exclusivement exprimée dans les leucocytes de sang veineux, dans les glioblastomes et les astrocytomes anaplastiques (Visse *et al.*, 2003). Outre un rôle dans la dégradation directe de la matrice extracellulaire, ces enzymes interviennent de manière séquentielle dans l'activation protéolytique des MMP, en particulier la MT1-MMP apparaît être l'un des principaux activateurs de la MMP-2 (Brinckerhoff *et al.*, 2002). On verra par la suite que la MT1-MMP est une des

rare MMP dont l'inactivation du gène entraîne un phénotype sévère chez la souris (Holmbeck *et al.*, 1999).

f) Le groupe hétérogène

Enfin, plusieurs MMP (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23A/B, MMP-27, MMP-28), plus récemment découvertes, forment un sixième groupe hétérogène.

La MMP-12 ou métalloélastase, dont le substrat principal est l'élastine, est essentiellement sécrétée par les macrophages et est essentielle pour leur migration. De plus, de récents travaux ont proposé l'implication de la MMP-12 dans la formation de l'emphysème (Hautamaki *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005), l'athérosclérose (Luttun *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005) et les anévrysmes de l'aorte abdominale (Curci *et al.*, 1998; Longo *et al.*, 2005). Dans toutes ces pathologies, la MMP-12 semble jouer le rôle du coupable en favorisant l'évolution de la pathologie. Des inhibiteurs sélectifs de la MMP-12, tels que ceux récemment développés dans notre groupe, pourraient être avantageusement utilisés dans ce type de pathologie à des fins thérapeutiques. Par contre, dans le cas de processus métastatique, la MMP-12 semble intervenir dans la réponse de l'hôte pour empêcher la dissémination des tumeurs primaires (Houghton *et al.*, 2006). Pour expliquer ces observations, la MMP-12 est proposée, dans ce contexte, pour favoriser la maturation de l'angiostatine, exerçant un rôle anti-angiogénique.

La MMP-19 a été identifiée, par clonage d'ADN complémentaire à partir du foie et de glande mammaire, comme un auto-antigène dérivé des cellules T chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Pendas *et al.*, 1997). La MMP-19 est capable de dégrader les composants de la membrane basale, tels que la laminine et le collagène de type IV, les tissus conjonctifs (fibronectine et gélatine) et le cartilage. Contrairement aux autres MMP, la MMP-19 est exprimée dans les

cellules mammaires humaines et les cellules épithéliales de la peau dans les conditions physiologiques normales ; mais celle-ci est sous-exprimée dans le cas de carcinomes invasifs (Jost *et al.*, 2006).

L'énamélysine (MMP-20), qui a pour substrat spécifique l'amélogénine, semble réguler la sécrétion de la matrice amélaire et sa minéralisation (formation de l'émail dentaire). Elle est principalement exprimée dans les améloblastes, mais on retrouve également une expression transitoire dans les odontoblastes à l'exclusion de la dentine. L'expression de son principal substrat, l'amélogénine précède toujours celle de la MMP-20 suggérant une régulation séquentielle dépendante des stades de développement. L'amélogénèse imparfaite, un dérèglement génétique provoquant la formation d'émail défectueux, est due à des mutations au niveau des sites de coupure de la MMP-20 (Bourd-Boittin *et al.*, 2004; Chaussain-Miller *et al.*, 2006).

L'expression de la MMP-21 est uniquement contrôlée par les facteurs de transcription Pax et Notch, essentiels dans la dernière phase de l'embryogenèse : l'organogenèse. La MMP-21 est exprimée de manière transitoire dans l'embryogenèse chez la souris et son expression augmente dans les tissus neuronaux chez l'embryon. Ces observations ont clairement indiqué la fonction spécifique importante de cette MMP en embryogenèse et tout particulièrement dans les cellules neuronales (Marchenko *et al.*, 2003).

La MMP-23, aussi appelée Cystein-Array MMP ou CA-MMP, est principalement exprimée dans les tissus génitaux. Cette MMP est la seule à ne pas posséder le « cystein-switch » dans son prodomaine ; à la place du domaine hémopexine, la MMP-23 présente en C-terminal un domaine riche en cystéines suivi d'un domaine de type immunoglobuline. Il semble que cette enzyme possède un domaine transmembranaire qualifié de type II inclus dans le prodomaine, donc en N-terminal, au lieu d'un domaine transmembranaire de type I en C-terminal,

comme pour les MT1 à MT3-MMP et la MT5-MMP. (Pei, 1999; Velasco *et al.*, 1999).

La MMP-27 n'a pas été sujette à des études poussées jusqu'à présent. Le taux d'expression de l'ARN messenger de la MMP-27 a été découvert élevé dans les os et les reins, mais faible dans le cœur et quelques autres tissus. Dans un sens, le taux d'expression élevé dans les os corrèle parfaitement avec les observations de Kevorkian *et al.* en 2004, qui ont montré que le taux d'expression élevé de l'ARN messenger correspondant à la MMP-27 dans le cartilage humain est impliqué dans l'ostéogenèse (Kevorkian *et al.*, 2004). Lors du développement de la souris, la MMP-27 a été observée à de faibles taux d'expression dans un grand nombre de tissus, excepté le système nerveux central (Nuttall *et al.*, 2004). De la même manière, l'ARN messenger de la MMP-27 n'a pu être qu'avec grand peine détecté dans la moëlle épinière, le tronc cérébral, le cervelet, le cortex et le prosencéphale (ou cerveau antérieur) chez le rat (Bernal *et al.*, 2005). Bien sûr, il est essentiel de rappeler que l'observation des ARN messagers ne permet pas de conclure de manière quantitative sur l'activité de la MMP-27.

La MMP-28 ou épilysine est particulièrement exprimée dans les kératinocytes. L'expression de cette MMP, aussi bien dans les tissus cutanés intacts que blessés, suggère que la MMP-28 doit jouer un rôle dans l'hémostase et la cicatrisation des blessures (Visse *et al.*, 2003).

4. Structure tridimensionnelle des MMP

La structure tridimensionnelle de la proMMP-2 résolue en 1999 par le groupe de K. Tryggvason illustre l'organisation de cette famille de protéines en plusieurs sous-domaines, chacun présentant une structure propre. Dans la séquence de cette MMP, en partant du résidu en N-terminal vers le résidu en C-terminal, on distingue : le prodomaine, le domaine catalytique, l'insertion du domaine fibronectine, spécifique aux MMP-2 et -9, et enfin le domaine hémapexine (figure 1.4) ; l'atome de zinc catalytique est signalé par une sphère jaune apparaissant au sein du domaine catalytique. Cette structure a permis de comprendre comment l'insertion du domaine fibronectine peut se faire sans perturber l'organisation des domaines catalytique et hémapexine (Morgunova *et al.*, 2002). Cette remarque est renforcée par la comparaison de cette structure avec des structures de MMP contenant le domaine catalytique sans insertion fibronectine de type II et le domaine hémapexine.

a) Le prodomaine :

Comme le montre la figure 1.4, ce domaine recouvre le domaine catalytique et interdit ainsi l'accès d'un substrat au site actif. Cette structure explique pourquoi l'activation de l'enzyme requiert le clivage du prodomaine. Dans toutes les séquences de MMP, un motif PRCGXPD hautement conservé figure dans le prodomaine. Dans ce motif, l'analyse structurale de la proMMP-2 indique que le résidu cystéine, par l'intermédiaire du groupe thiol, interagit directement avec l'atome de zinc du site catalytique. Ce résultat est en accord avec les données biochimiques indiquant que des agents chimiques capables de réagir avec les groupes thiols peuvent activer les MMP. L'activation des MMP par des protéases comme la plasmine, la furine ou bien des formes actives de MMP implique en général un clivage dans une zone non structurée du prodomaine, conduisant à

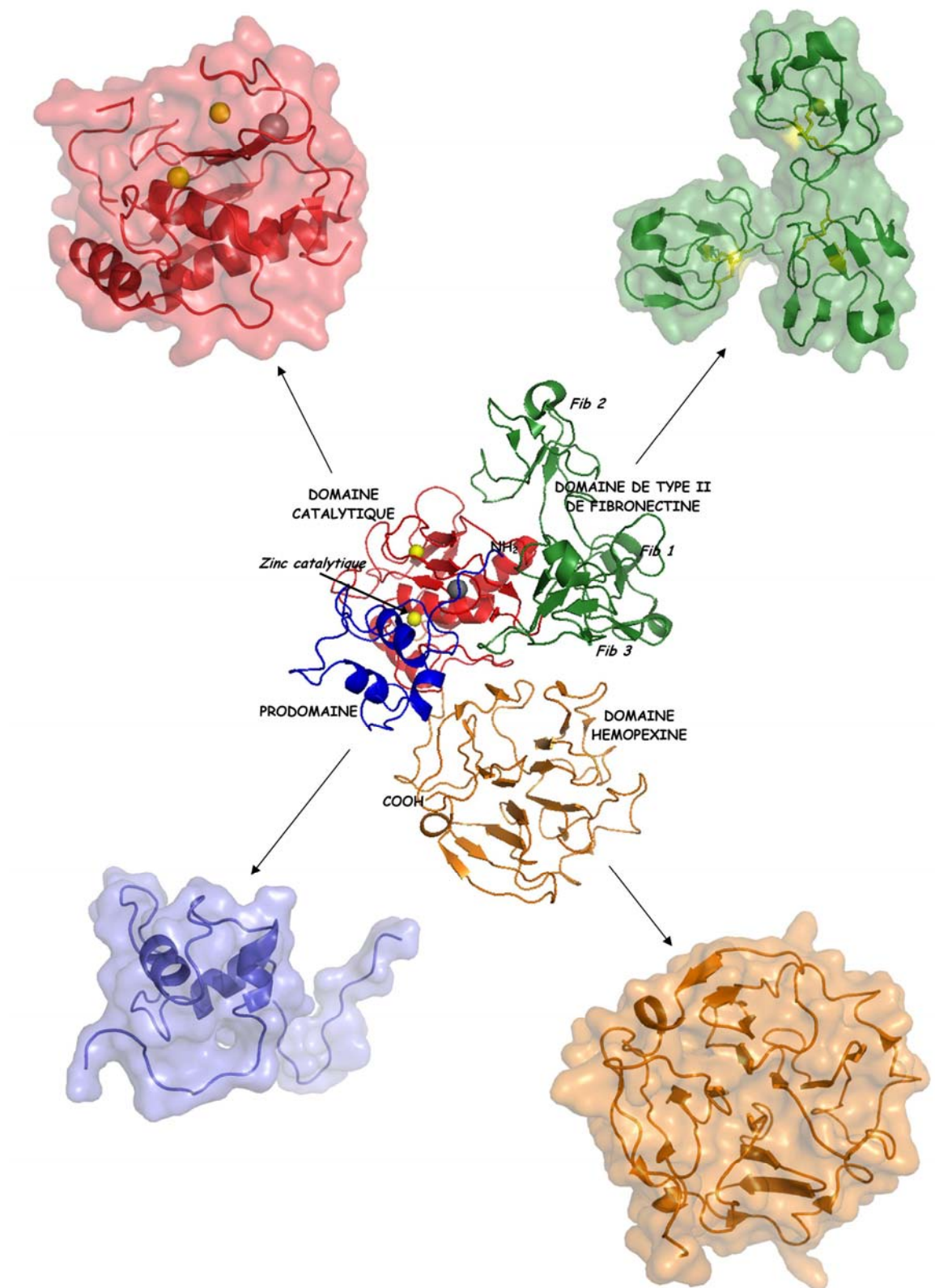


Figure 1.4 : Structure tridimensionnelle éclatée de la proforme de la MMP-2 (PDB : 1GXD) (Morgunova *et al.*, 2002), illustrant en bleu le prodomaine, en rouge le domaine catalytique, en vert le domaine de type II de fibronectine et en orange le domaine hémopexine.

fragiliser l'interaction du résidu cystéine avec l'atome de zinc. Une fois cette interaction rompue, l'élimination complète du prodomaine pourrait être réalisée par autolyse.

b) Le domaine catalytique :

Comme l'illustre la figure 1.5, la structure de ce domaine se présente sous une forme de sphère compacte, composée des trois hélices α et de cinq feuilletts β . Outre ces éléments de structure secondaire, la stabilité de ce domaine est aussi assurée par la présence de cations interagissant avec des résidus portés par des boucles situées à la surface de la protéine. On retrouve dans toutes les MMP, un atome de zinc additionnel et un atome de calcium, puis selon la nature des MMP, un deuxième voire, dans certains cas, un troisième atome de calcium dans les structures des différents domaines catalytiques. A ce jour, la structure du domaine catalytique des MMP suivantes a été résolue : MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -16.

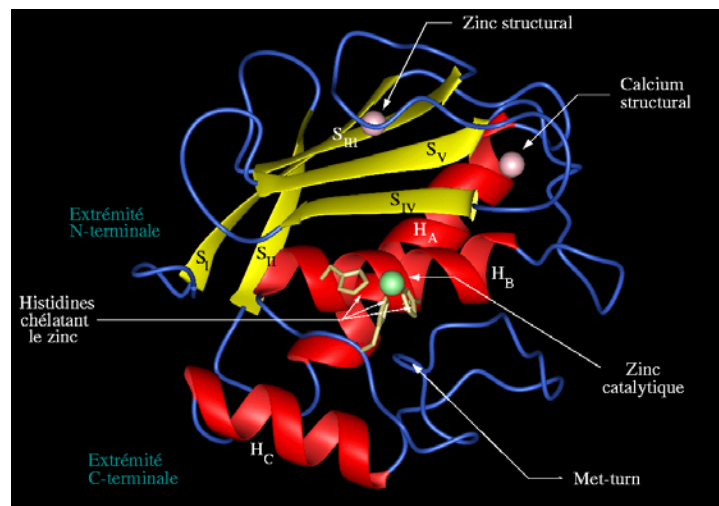


Figure 1.5 : Représentation du domaine catalytique archétype des MMP. Il est constitué de 3 hélices α (en rouge) et de cinq feuilletts β (en jaune).

c) Atome de zinc et catalyse :

La présence de l'atome de zinc dans le site catalytique est assurée par son interaction avec trois résidus histidines, dont deux se trouvent portés sur une

des hélices α . Séparés par trois résidus dans la séquence signature strictement conservée dans la plupart des protéases à zinc (HEXXH), ces deux résidus histidines sont situés sur un même côté de l'hélice α , dans une orientation idéale pour interagir avec l'atome de zinc du site catalytique. La troisième histidine est portée par un segment situé en C-terminal de l'hélice α du site actif. Celui-ci, au sortir de l'hélice, effectue un repliement en un tournant de type β -1,4, permettant une projection optimale du résidu histidine vers l'atome de zinc. La géométrie de coordination de l'atome de zinc est du type tétraédrique, trois positions étant occupées par les trois résidus histidines, la quatrième position étant occupée soit, dans le cas des proformes, par le résidu cystéine conservé du prodomaine, soit, dans le cas des formes actives, par une molécule d'eau participant à la réaction d'hydrolyse du substrat. Dans la représentation standard de la structure du domaine catalytique des MMP, la chaîne peptidique de l'hélice α du site actif progresse de la droite vers la gauche, ainsi dans cette direction, le résidu venant juste après la première histidine correspond au résidu glutamate du motif HEXXH.

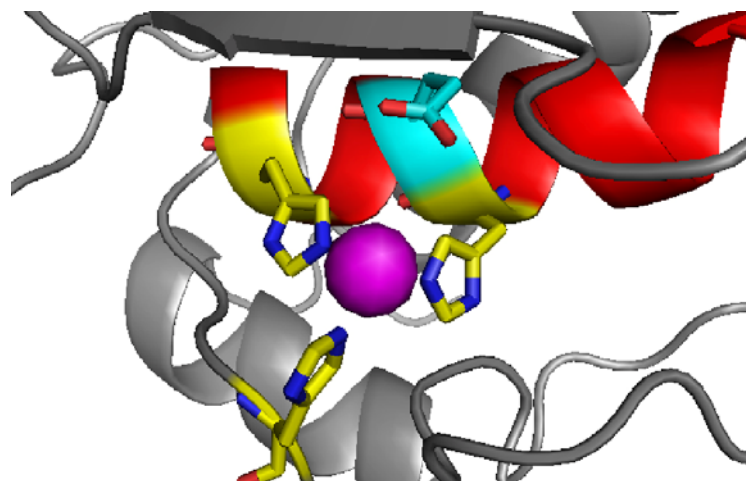
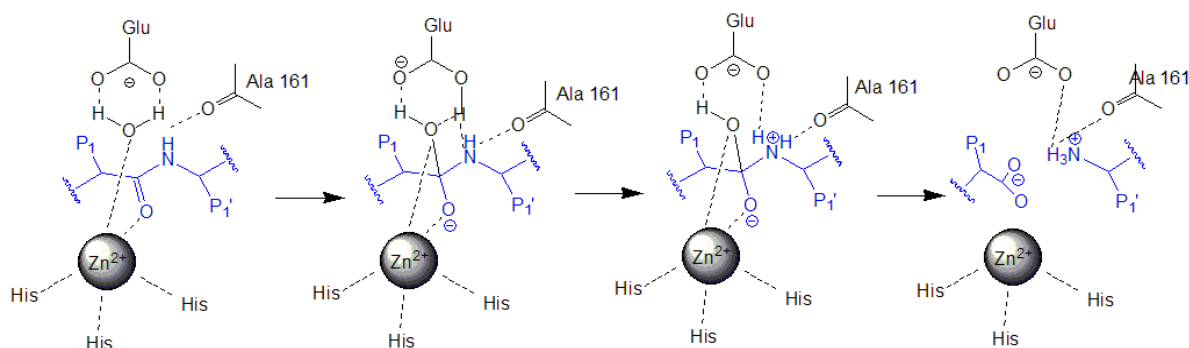


Figure 1.6 : Environnement structural de l'atome de zinc catalytique au sein du site actif des MMP.

Sur la figure 1.6, il apparaît clairement que, dans ce contexte structural, ce résidu glutamate pointe aussi vers l'atome de zinc, plus précisément

légèrement au-dessus de celui-ci, vers la molécule d'eau interagissant avec l'atome de zinc. Le rôle attribué à ce résidu glutamate est d'agir comme un accepteur/donneur de proton lors de la réaction enzymatique. Le mécanisme d'hydrolyse couramment admis est le suivant : l'interaction de la molécule d'eau via son oxygène avec l'atome de zinc induit une polarisation de cette molécule favorisant la formation d'un ion OH^- . La formation de cette espèce est favorisée par le départ du proton de la molécule d'eau vers le résidu glutamate, dont la fonction carboxylate de sa chaîne latérale passe de l'état COO^- à l'état COOH . Dans le même temps, le substrat à hydrolyser s'est positionné dans le sillon du site actif de telle manière que le carbonyle de la liaison peptidique scissile puisse aussi interagir avec l'atome de zinc. L'atome de zinc voit donc son état de coordination passer de l'état tétraédrique à l'état pentacoordonné. Cette structure transitoire permet l'attaque nucléophile du carbone du groupe carbonyle, polarisé par son interaction avec le zinc, par l'ion OH^- (schéma 1.1). Cette réaction engendre un état de transition caractérisé par le passage du carbone du groupe carbonyle de la liaison peptidique clivée d'un état sp^2 à un état sp^3 . Cet état de transition est stabilisé momentanément par l'interaction avec l'atome de zinc et le résidu glutamate. Après rupture de la liaison C-N de la liaison peptidique, le proton porté par le résidu glutamate reprotone l'azote formant ainsi une fonction amine libre (Whittaker *et al.*, 1999).



Source : Whittaker *et al.*, 1999, Chemical Reviews

Le cas présenté est celui de la MMP-8.

Schéma 1.1 : Mécanisme réactionnel d'une MMP (en noir) pour un substrat (en bleu) illustré par le cas de la MMP-8.

5. Différences avec les protéases à zinc.

Ce mécanisme enzymatique s'étendrait à l'ensemble des protéases à zinc, cependant avec une singularité propre aux MMP, singularité ayant été révélée par la résolution de structure tridimensionnelle entre des protéases à zinc et des inhibiteurs analogues de l'état de transition, notamment des inhibiteurs phosphiniques développés au laboratoire (Grams *et al.*, 1996). Les figures 1.7 et 1.8 illustrent une comparaison des modes de stabilisation d'un inhibiteur de type phosphinique en interaction avec le domaine catalytique de la MMP-9 humaine d'une part (Dive *et al.*, soumis pour publication) et d'autre part avec le domaine catalytique de l'astacine d'écrevisse (Grams *et al.*, 1996). La figure 1.7 concernant le complexe de la MMP-9 illustre l'interaction du groupement

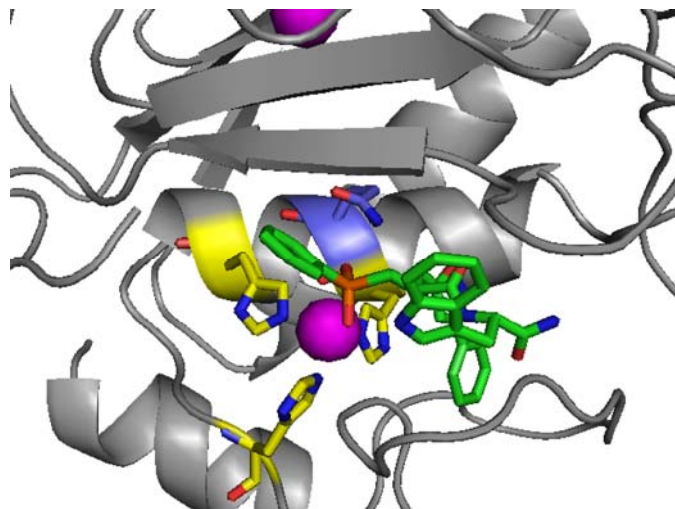


Figure 1.7 : Interaction entre un inhibiteur de type phosphinique et le domaine catalytique de la MMP-9 humaine.

phosphoryle (PO_2^-) de l'inhibiteur via ses deux oxygènes avec l'atome de zinc du site actif de cette enzyme. Par ailleurs, on constate que la chaîne latérale du glutamate catalytique se trouve très proche du groupement phosphoryle suggérant une interaction entre ces deux groupements. Pour que celle-ci soit stable, il faut néanmoins admettre que le groupement carboxylate du résidu glutamate se trouve sous sa forme protonée (COOH). Ainsi, l'un des deux atomes d'oxygène de ce résidu se protone et interagit avec l'un des deux oxygènes du

groupement phosphoryle. Sur la base de cette structure, on peut s'étonner que l'autre oxygène du groupe phosphoryle n'ait pas de partenaire d'interaction. En fait, l'inspection de cette structure révèle la présence d'une molécule d'eau très proche de cet atome d'oxygène. Ce mode d'interaction d'un inhibiteur phosphinique avec la MMP-9 renforce les propositions faites sur les mécanismes enzymatiques des protéases à zinc.

Dans le cas de l'astacine (figure 1.8), il est intéressant de noter que les mêmes interactions de base sont observées, mais dans ce cas l'interaction du groupe phosphoryle fait intervenir un résidu additionnel de la protéine, un résidu tyrosine, qui interagit via son groupe hydroxyle porté par la chaîne latérale avec l'un des oxygènes du groupe phosphoryle (Grams *et al.*, 1996). Une comparaison de la structure tridimensionnelle de nombreuses protéases à zinc indique que ce mode d'interaction, faisant intervenir un résidu supplémentaire, est conservé dans de nombreuses sous-familles de protéases à zinc. Dans la plupart des cas, ce résidu est une tyrosine. Ainsi, sur la base des structures de protéases à zinc actuellement disponibles, il semble que les MMP fassent exception, en mobilisant une molécule d'eau pour stabiliser l'état de transition, plutôt qu'un résidu de la protéine. Dans l'astacine, la mutation du résidu tyrosine mentionné ci-dessus conduit à une perte d'activité catalytique, observation compatible avec son rôle dans la stabilisation de l'état de transition (Yiallourous *et al.*, 2000).

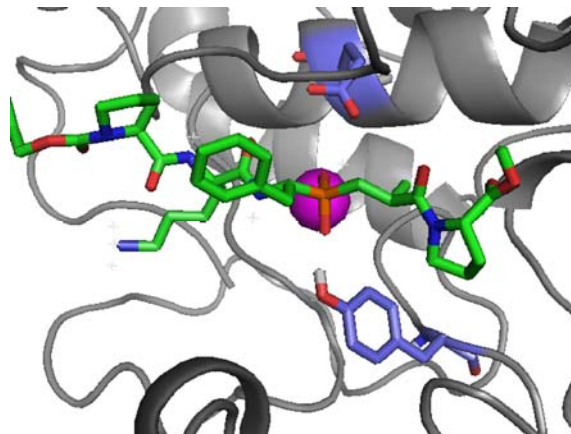


Figure 1.8 : Interaction entre un inhibiteur de type phosphinique et le domaine catalytique de l'astacine d'écrevisse.

6. Développement d'inhibiteurs de métalloprotéases à zinc.

a) Les premiers inhibiteurs :

La première structure tridimensionnelle d'une métalloprotéase à zinc, ayant une spécificité de type endopeptidase, a été publiée en 1972 ; il s'agissait d'une protéase bactérienne, la thermolysine (Colman *et al.*, 1972). Il a fallu attendre 20 ans après ce travail, pour obtenir la structure tridimensionnelle d'une autre métalloprotéase à zinc, de type endopeptidase, n'appartenant pas au groupe des protéases bactériennes. Il s'agissait d'une protéase à zinc secrétée dans le pseudo-estomac de l'écrevisse, l'astacine (Bode *et al.*, 1992). Les premiers inhibiteurs développés à des fins thérapeutiques, ciblant des protéases à zinc appartenant à la famille des endopeptidases, sont apparus dans les années 70-80. Le développement de ces inhibiteurs s'est donc fait en l'absence de données précises de la structure 3D de la cible. Les travaux les plus spectaculaires ont été consacrés à la mise au point d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE), ayant abouti, en quelques années, à l'utilisation en clinique d'inhibiteurs capables de réduire la pression artérielle de patients hypertendus (Zaman *et al.*, 2002). Les principes de base du développement de ce type d'inhibiteurs ont consisté, pour l'essentiel, à ajouter à des fragments peptidiques issus de la dégradation de substrats de l'ACE, un groupement chimique capable d'interagir avec l'atome de zinc présent dans le site actif de l'enzyme. Cette hypothèse de travail avait été retenue en se fondant, non pas sur la structure tridimensionnelle de la thermolysine, mais sur celle de la carboxypeptidase A, appartenant aussi à la famille des protéases à zinc. L'analyse de la structure tridimensionnelle de la carboxypeptidase A indiquait bien la présence de l'atome de zinc dans la cavité enzymatique et suggérait son implication dans la réaction d'hydrolyse, en accord avec les données biochimiques. Cette observation a conduit les chimistes à développer les inhibiteurs d'ACE reportés dans la figure 1.9.

Comme le révèle cette figure, en dehors du groupe thiol présent dans la structure du captopril, les chimistes ont eu aussi recours à l'utilisation d'un groupe carboxylate pour chélater l'atome de zinc (lisinopril). Par la suite, en suivant ce concept, d'autres groupements chimiques capables d'interagir avec l'atome de zinc ont été aussi utilisés pour développer des inhibiteurs de protéases à zinc, notamment le groupe hydroxamate pour ses propriétés d'interaction très forte avec le zinc (schéma 1.3, page 43).

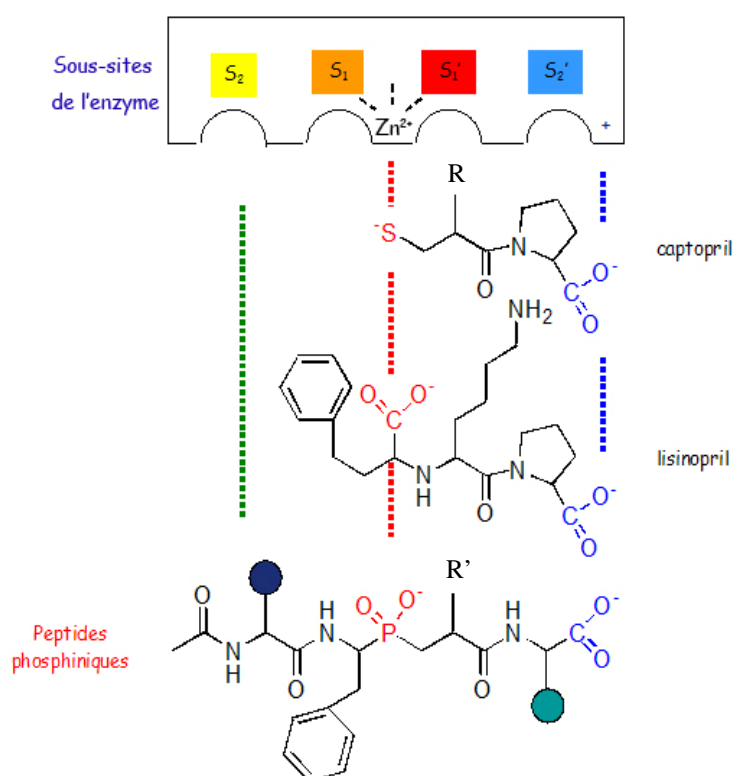


Figure 1.9 : Structures des inhibiteurs d'ACE développés sur la base des études de dégradation de substrats ; comparaison avec un peptide standard de type phosphinique du laboratoire.

b) Analogues de l'état de transition :

Une autre voie explorée par les chimistes, et en particulier par notre groupe, pour développer des inhibiteurs de protéases s'inspire des concepts sur la structure du substrat à l'état de transition, le but étant de pouvoir produire des composés chimiques mimant ce type de structure et, par ailleurs, stables du point de vue chimique. La théorie de l'état de transition stipule en effet que des

analogues de la structure du substrat à l'état de transition doivent se comporter comme des inhibiteurs très puissants. Par ailleurs, on peut penser que ces inhibiteurs devraient s'avérer plus spécifiques que des inhibiteurs exploitant uniquement des propriétés très générales appartenant à une famille de protéases.

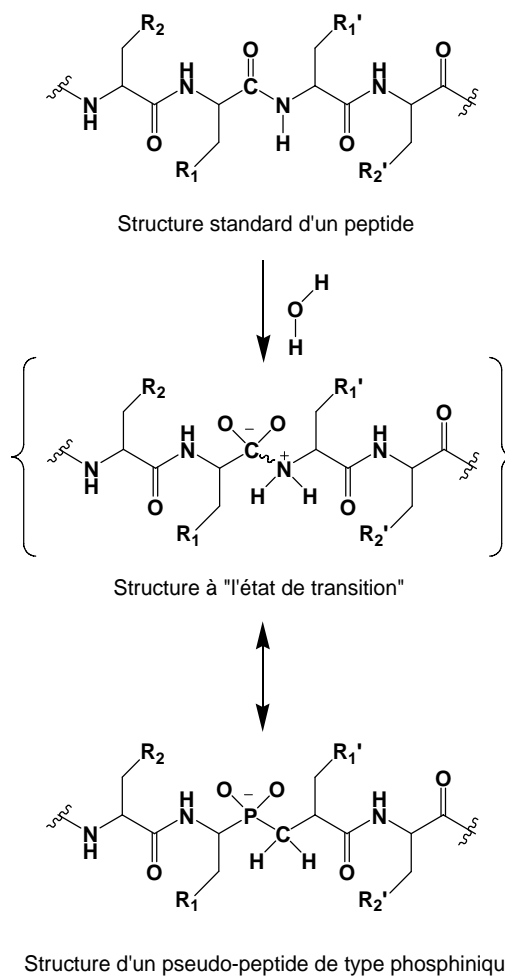


Schéma 1.2: Structure d'un inhibiteur peptidique de type phosphinique conçu à partir de la théorie de l'état de transition.

Le schéma 1.2 indique la structure putative d'un substrat peptidique dans l'état de transition. Cette structure a servi de base pour proposer les peptides phosphiniques comme composés pouvant raisonnablement mimer la structure du substrat à l'état de transition. Les critères pouvant justifier ce choix furent :

1) la nature tétraédrique du phosphore du groupement phosphinique ($\text{PO}_2\text{-CH}_2$) ;

- 2) la charge négative portée par ce groupement ;
- 3) la très grande stabilité chimique de la liaison P-C. Cette considération permet d'exclure l'utilisation de la liaison phosphonamide ($\text{PO}_2\text{-NH}$), car cette liaison est peu stable et facilement hydrolysable.

La première structure d'un complexe impliquant un peptide phosphinique en interaction avec une protéase à zinc a été publiée en 1996, dans le cadre d'une collaboration entre notre groupe et celui de W. Bode (Grams *et al.*, 1996). Ce travail a permis de confirmer nos hypothèses de travail, à savoir d'une part, la présence du peptide comme attendu dans le site actif de la protéase (figure 1.10) et d'autre part, l'interaction directe du groupe phosphoryle (PO_2) avec l'atome de zinc catalytique, mais aussi avec le résidu glutamate du motif HEXXH de cette protéase et un résidu tyrosine, strictement conservé dans la famille des astacines (figure 1.8).

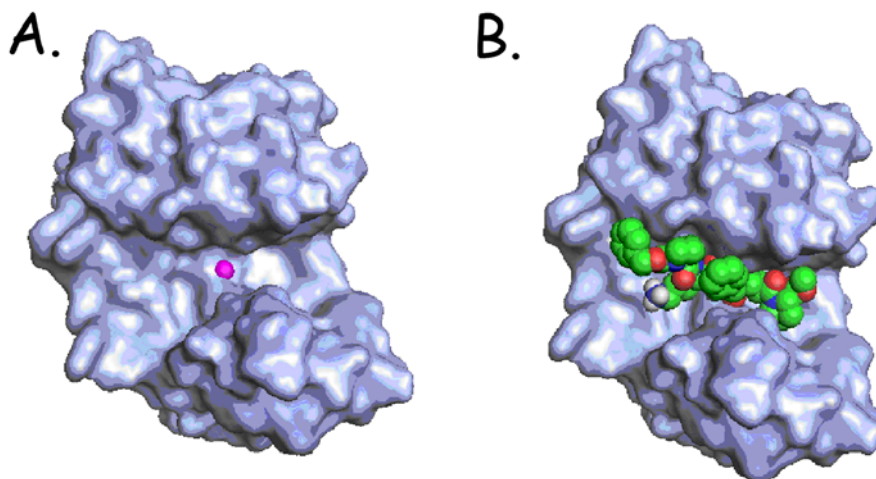
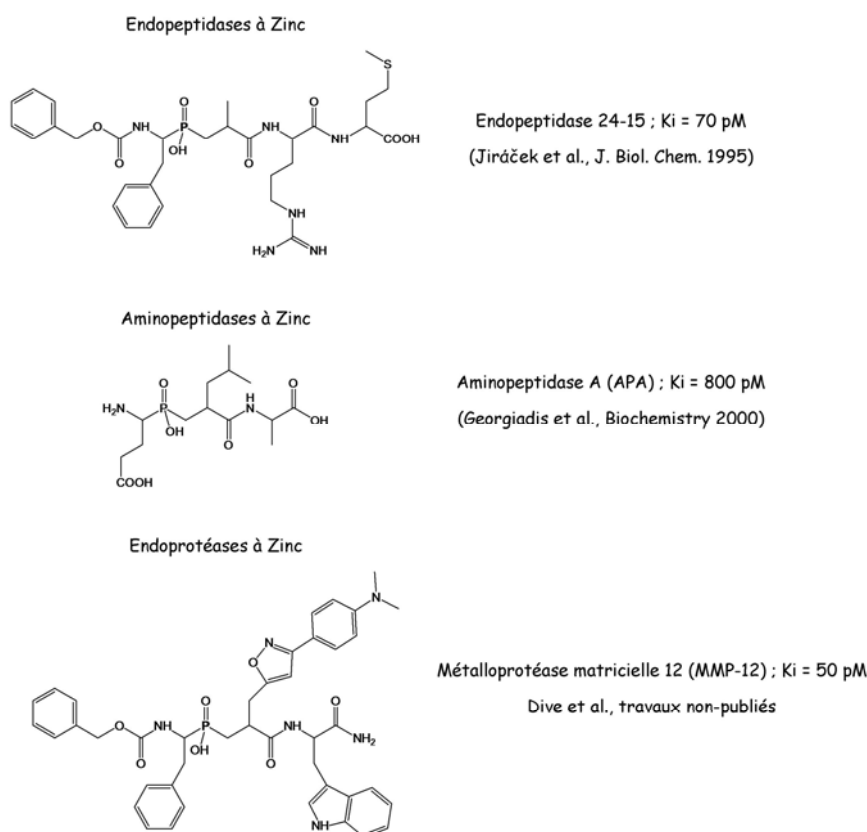


Figure 1.10 : Comparaison des représentations de structures tridimensionnelles de l'astacine (A) en interaction avec un inhibiteur de type phosphinique (B).

Le développement de la synthèse sur support solide de ce type de pseudo-peptide a ouvert la voie à la chimie combinatoire (Yiotakis *et al.*, 1996), une approche ayant permis de valider rapidement que les peptides phosphiniques peuvent se comporter effectivement comme des inhibiteurs puissants, mais

surtout comme des inhibiteurs très sélectifs (tableau 1.3), à condition de trouver les structures capables de discriminer différentes protéases à zinc, un travail impliquant chimie combinatoire et criblage des bibliothèques, jusqu'à l'identification du composé recherché (Jiracek *et al.*, 1995; Jiracek *et al.*, 1996; Dive *et al.*, 1999).

Tableau 1.3 : Exemples d'inhibiteurs de métalloprotéases très puissants de type phosphiniques développés au sein du laboratoire et de ses collaborateurs.



c) Les premiers inhibiteurs de MMP :

S'inspirant des travaux réalisés sur l'ACE, les premiers inhibiteurs de MMP ont été des pseudo-peptides, substitués en N-terminal par un groupement chimique chélateur de l'atome de zinc de ces enzymes. Pour des raisons d'opportunité de dépôt de brevets, la plupart des inhibiteurs de MMP développés présentaient la fonction hydroxamate, comme groupement chélateur (schéma

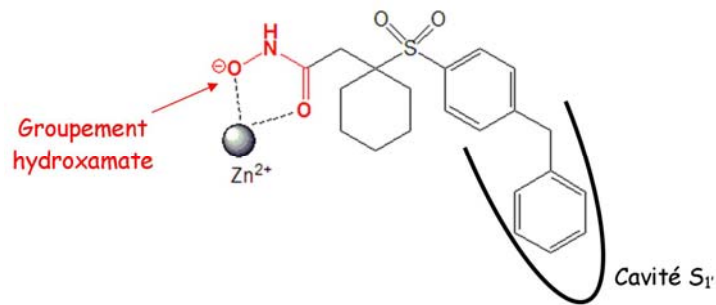


Schéma 1.3 : Cas des inhibiteurs de type hydroxamate

1.3). Sur la base des premières structures tridimensionnelles de domaines catalytiques de MMP, les premiers inhibiteurs de MMP, de nature pseudo-peptidiques, ont pu évoluer vers des structures non-peptidiques, exploitant la nature bien particulière du domaine catalytique des MMP. En effet, il est apparu très rapidement après la résolution de plusieurs structures tridimensionnelles de MMP, que leurs domaines catalytiques se caractérisaient par la présence d'un sous-site S_1' correspondant à une cavité très profonde, traversant de part en part tout le corps de la protéine, à l'exception de la MMP-1 et de la MMP-7 (figure 1.11).

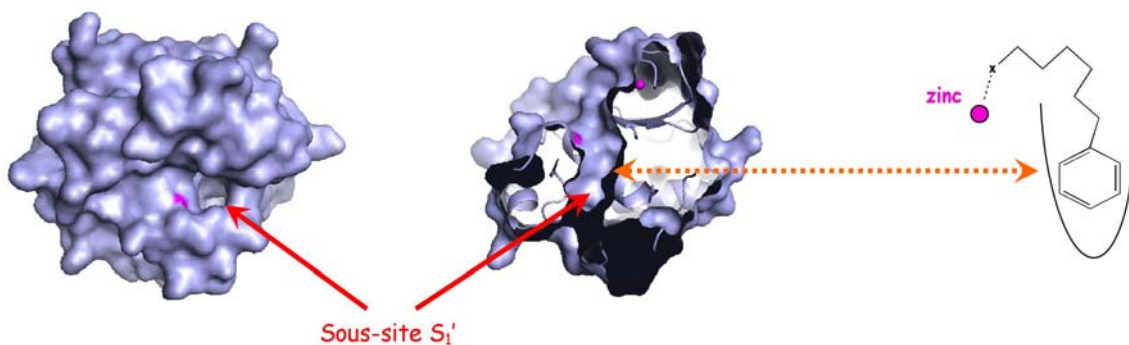


Figure 1.11 : Stratégie de conception d'inhibiteurs de MMP.

Cette observation a conduit naturellement les chimistes à incorporer dans la structure de leurs inhibiteurs des groupements chimiques capables de remplir cette cavité, comme l'illustre la figure 1.11 et le schéma 1.3 pour le cas des inhibiteurs incorporant un groupement de type hydroxamate.

Dans le cas des peptides phosphiniques, cette observation nous a conduit à développer le type de structure illustré par le schéma 1.4.

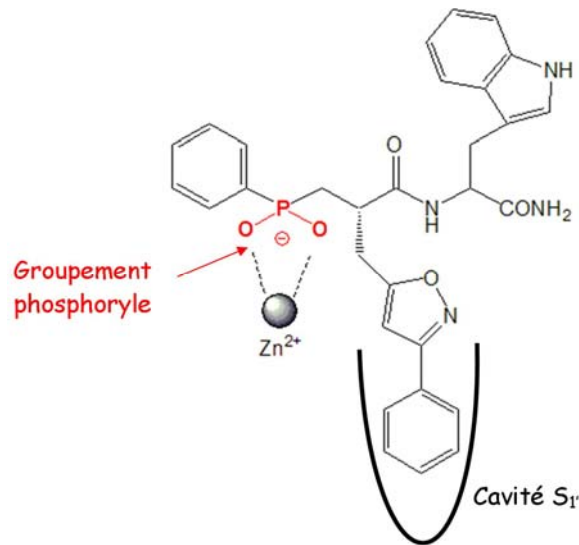


Schéma 1.4 : Cas des inhibiteurs de type phosphinique.

La résolution de la structure de cet inhibiteur en interaction avec le domaine catalytique de la mini-MMP-9 (forme dans laquelle le domaine fibronectine a été supprimé par mutagenèse), réalisée dans le laboratoire de W. Bode, permet de situer le contexte structural de cette interaction. Cette structure confirme que le groupe isoxazole-phényle se positionne bien dans la cavité S₁' de la MMP-9 (figure 1.12). On remarque, à cet égard, que cette cavité

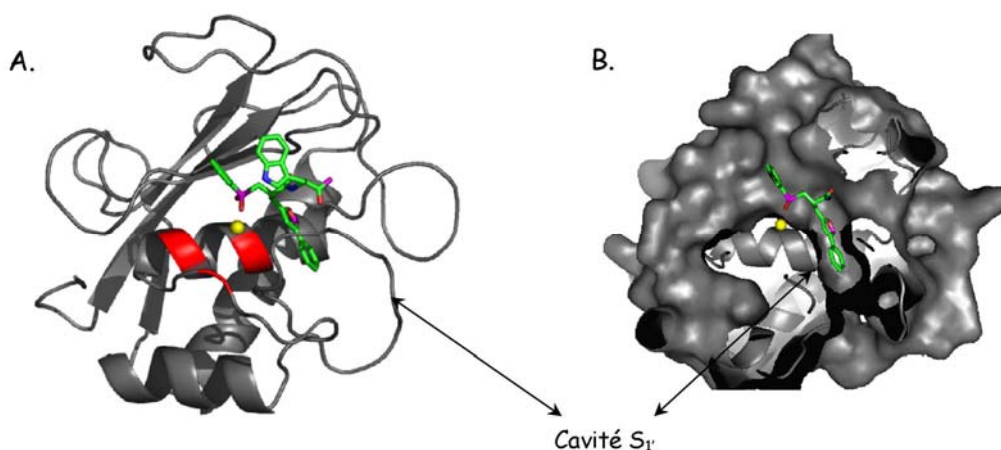


Figure 1.12 : Structures tridimensionnelles des MMP illustrant la cavité S₁'.

n'est pas totalement remplie par le groupe isoxazole-phényle. Ainsi, il serait envisageable de fonctionnaliser le groupe phényle pour remplir cette cavité.

La figure 1.12.A illustre que la cavité S_1' est constituée par une boucle (la boucle S_1') située à la surface de la protéine. De façon intéressante, la taille et la séquence de cette boucle varient selon la nature des MMP (tableau 1.4). Cette observation justifie les nombreux efforts de synthèse qui ont été consentis afin de développer des inhibiteurs présentant une grande variabilité de structure au niveau de la position P_1' , la position de l'inhibiteur se projetant dans la cavité S_1' .

Tableau 1.4 : Composition en aminoacides de la boucle S_1' des MMP humaines ; le premier résidu répertorié est la méthionine du Met-turn, numérotée 236 dans la séquence de la MMP-1. Les séquences sont groupées par longueur et ordonnées par l'augmentation de la taille de la boucle. Ni est le nombre de résidu différent pour chaque position.

	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245		246	247	248			
Ni	1	6	3	9	2	12	9	13	9	11	11	7	4	2	7	12	1
MMP-1	M	Y	P	S	Y	T	F	S	G	D					V	Q	L
MMP-2	M	A	P	I	Y	T	Y	T	K	N					F	R	L
MMP-9	M	Y	P	M	Y	R	F	T	E	G	P					P	L
MMP-11	M	S	A	F	Y	T	F	R	Y	P					L	S	L
MMP-23	M	H	L	N	A	T	L	R	G	W					K	A	L
MMP-19	M	A	P	V	Y	E	G	Y	R	P	H				F	K	L
MMP-21	M	Q	P	N	Y	I	P	Q	E	P	A				F	E	L
MMP-28	M	A	P	Y	Y	K	R	L	G	R	D	A				L	L
MMP-7	M	Y	P	T	Y	G	N	G	D	P	Q	N			F	K	L
MMP-8	M	Y	P	N	Y	A	F	R	E	T	S	N			Y	S	L
MMP-12	M	F	P	T	Y	K	Y	V	D	I	N	T			F	R	L
MMP-13	M	F	P	I	Y	T	Y	T	G	K	S	H			F	M	L
MMP-14	M	A	P	F	Y	Q	W	M	D	T	E	N			F	V	L
MMP-15	M	A	P	F	Y	Q	W	K	D	V	D	N			F	K	L
MMP-16	M	A	P	F	Y	Q	Y	M	E	T	D	N			F	K	L
MMP-20	M	Y	P	T	Y	K	Y	K	N	P	Y	G			F	H	L
MMP-24	M	A	P	F	Y	Q	Y	M	E	T	H	N			F	K	L
MMP-26	M	Y	P	T	Y	W	Y	H	D	P	R	T			F	Q	L
MMP-27	M	F	P	N	Y	V	S	L	D	P	R	K			Y	P	L
MMP-3	M	Y	P	L	Y	H	S	L	T	D	L	T	R		F	R	L
MMP-10	M	Y	P	L	Y	N	S	F	T	E	L	A	Q		F	R	L
MMP-17	M	R	P	Y	Y	Q	G	P	V	G	D	P	L	R	Y	G	L
MMP-25	M	R	P	F	Y	Q	G	P	V	G	D	P	D	K	Y	R	L

Malgré une décennie d'efforts, le nombre d'inhibiteurs hautement sélectifs des MMP reste peu élevé ; ce type de composés n'est en effet disponible que pour la MMP-12 et la MMP-13. Une sérieuse limite concernant l'exploitation du sous-site S_1' pour développer des inhibiteurs sélectifs concerne la flexibilité de

la boucle S_1' . En effet, la comparaison de structures tridimensionnelle de la MMP-3 en interaction avec différents inhibiteurs, possédant cependant le même type de chaîne latérale dans la position P_1' , indique que cette boucle prend des conformations différentes dans chacun de ces complexes, comme l'illustre la figure 1.13 (Cuniasse *et al.*, 2005).

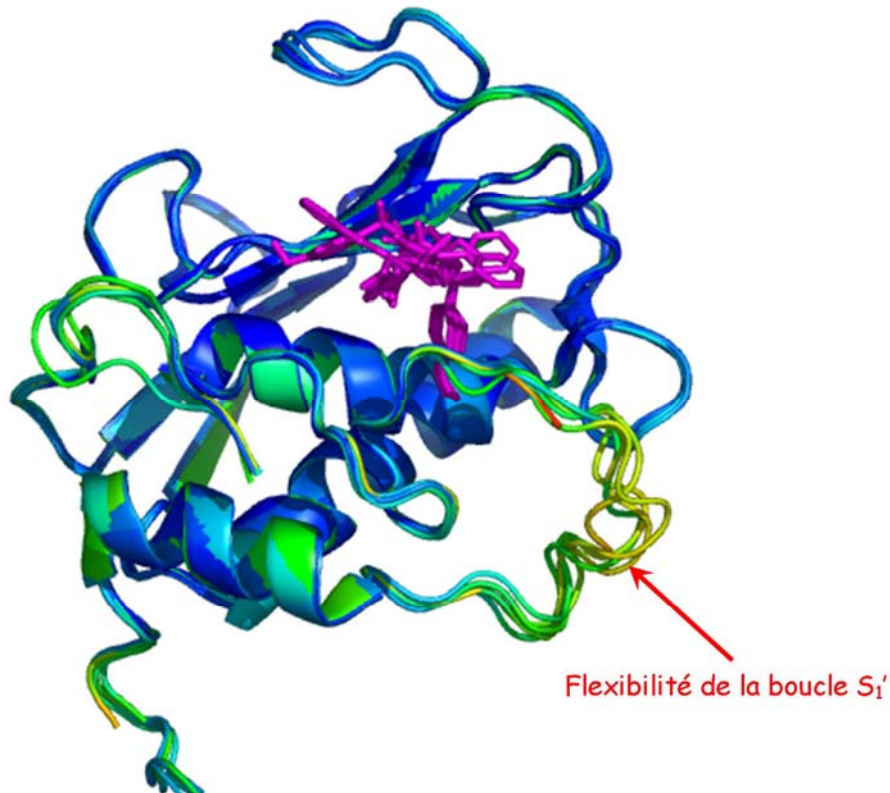


Figure 1.13 : Superposition de plusieurs représentations tridimensionnelles de MMP-3 en interaction avec des inhibiteurs différents, mais possédant le même type de chaîne latérale en position P_1' ; cette figure illustre la flexibilité et la propension de la boucle S_1' à s'adapter selon le type d'inhibiteur en interaction.

Ces observations faites en cristallographie ont pu être confirmées par des études RMN, notamment par le groupe de Bertini (Bertini *et al.*, 2005). Ce groupe a montré que les résidus figurant sur la figure 1.14 en bleu dans la boucle S_1' de la MMP-12 étaient complètement flexibles en solution. Ainsi, lorsque l'on cherche à occuper la cavité S_1' des MMP avec des groupements chimiques de plus en plus longs, il est parfaitement plausible que le sous site S_1' se réorganise en stabilisant différentes conformations de la boucle S_1' . Dans ce cas, on comprend

qu'il soit difficile d'anticiper ce type d'adaptation et que ce phénomène rend particulièrement laborieuse la mise au point d'inhibiteurs sélectifs sur une base structurale.

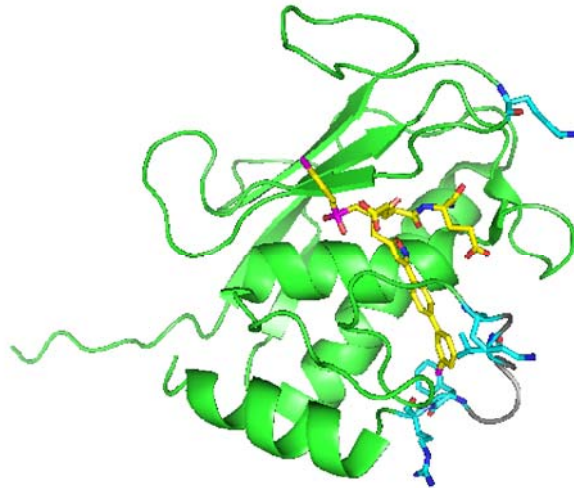


Figure 1.14 : Représentation tridimensionnelle du domaine catalytique de la MMP-12 humaine ; les résidus en bleu de la boucle S_1' sont complètement flexibles en solution (Bertini *et al.*, 2005).

d) Inhibiteurs sélectifs de la MMP-12 :

Ces inhibiteurs ont été obtenus par criblage de bibliothèques de peptides phosphiniques. Par optimisation des résidus figurant dans les positions P_1' , P_2' et P_3' des inhibiteurs, il a été possible d'identifier un composé hautement sélectif. Cet inhibiteur présente comme caractéristique un motif Glu-Glu dans sa structure. Une analyse comparative des domaines catalytiques des MMP a permis de proposer une hypothèse de travail pour expliquer la sélectivité de ce composé. En effet, le « docking » de cet inhibiteur dans le site actif de la MMP-12 révèle la présence à proximité du motif Glu-Glu de deux chaînes latérales de la MMP-12 qui sont respectivement une thréonine et une lysine (en bleu sur la figure 1.15). Il se trouve que la MMP-12 est la seule MMP à posséder ces deux résidus exactement à ces positions. Ainsi, notre approche par criblage de bibliothèques de composés phosphiniques a permis de mettre en évidence la présence de deux

résidus de la MMP-12 jouant un rôle critique dans la sélectivité de l'enzyme. La présence du motif *Glu-Glu* dans un substrat synthétique permet donc d'obtenir un substrat sélectif de la MMP-12 (Devel *et al.*, 2006).

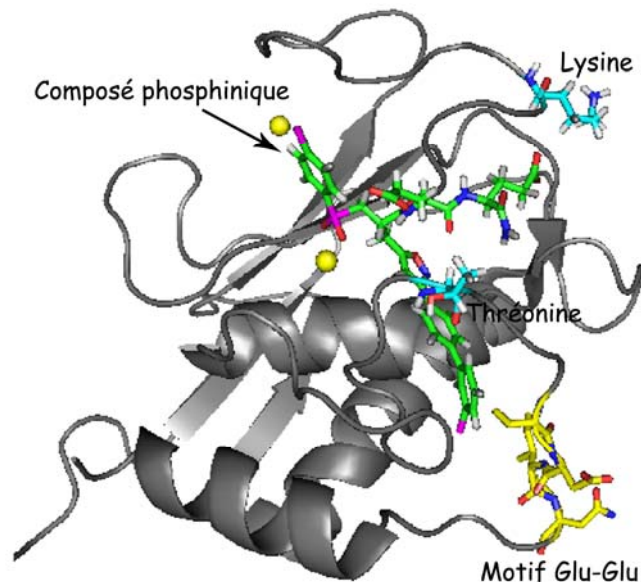


Figure 1.15 : Représentation tridimensionnelle du domaine catalytique de la MMP-12 illustrant le « docking » d'un inhibiteur de type phosphinique possédant le motif *Glu-Glu* ; les résidus à proximité des chaînes latérales des glutamates sont représentés en cyan (thréonine et lysine) ; elles interagissent directement avec les groupements carboxylates des glutamates.

e) Inhibiteur sélectif de la MMP-13.

Le criblage de banques de composés non-peptidiques dans différentes sociétés pharmaceutiques a abouti à identifier des composés capables de s'insérer dans la cavité S_1' , et ainsi d'inhiber l'enzyme. Dans ce type de complexe, l'atome de zinc n'est pas impliqué dans l'interaction de l'inhibiteur. Aussi, comme l'illustre la figure 1.16, en superposant la structure de la MMP-13 libre à la structure de cette protéase en interaction avec cet inhibiteur, on remarque que l'interaction de l'inhibiteur implique aussi un changement de conformation de la boucle S_1' de la MMP-13. La sélectivité de ces composés reposerait sur la présence d'un résidu glycine dans la boucle S_1' de la MMP-13 permettant à cette boucle de prendre une conformation particulière, favorable à la liaison de

l'inhibiteur. L'absence de ce résidu glycine dans les autres MMP expliquerait donc la sélectivité de ce composé envers la MMP-13 (Engel *et al.*, 2005).

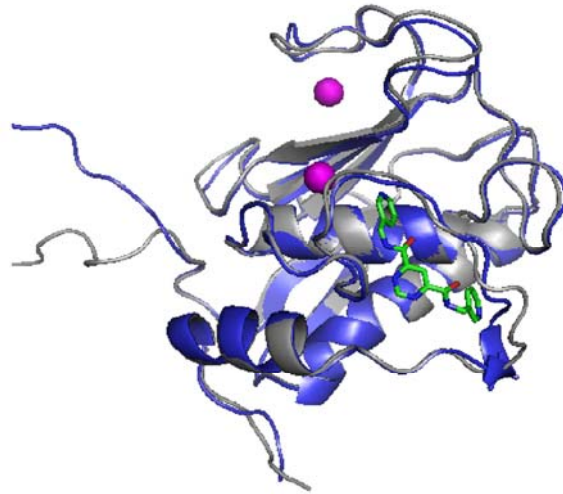


Figure 1.16 : Superposition des représentations tridimensionnelles du domaine catalytique de la MMP-13 sous forme libre (en bleu) et sous forme complexée (en gris).

7. Fonctions et généralités des MMP

a) Les fonctions physiologiques des MMP

La croissance de l'embryon et la morphogenèse des tissus sont des évènements fondamentaux qui requièrent la dégradation de la matrice extracellulaire, afin de permettre la migration des cellules et le remodelage du microenvironnement matriciel. Compte tenu de la capacité des MMP, à pouvoir dégrader l'ensemble des protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, leur possible implication dans ces processus a pendant longtemps été proposée. Afin de mieux préciser l'importance physiologique des différentes MMP, des lignées de souris, dans lesquelles un gène de MMP a été invalidé, ont été produites. De façon inattendue, la plupart de ces souris transgéniques ne présentent pas de phénotypes particuliers, à l'exception des souris *KO* pour la MT1-MMP. Bien entendu, on peut suggérer que le rôle d'une MMP particulière peut être difficile à déterminer si, après invalidation du gène, d'autres MMP sont capables de prendre le relais de la MMP manquante.

Ainsi, aujourd'hui, seules les souris MMP-14 *-/-* présentent donc un phénotype sévère : nanisme, ostéoporose, arthrite et synovite, accompagnée de fibrose du synovium. La déficience en MMP-14 chez les souris engendre des défauts dans les tissus conjonctifs et au niveau du squelette. L'ensemble de ces observations suggère une implication de la MMP-14 dans le métabolisme du collagène. De plus, cette déficience serait responsable d'une angiogenèse défectueuse, conduisant à une mort prématurée (Holmbeck *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000).

Il est intéressant de noter que lorsqu'elles ont été étudiées dans un contexte « pathologique », les différentes souris *KO* pour une MMP ont permis de suggérer un rôle particulier pour ces MMP dans le développement de la maladie. Par exemple, les souris MMP-12 *-/-*, contrairement aux souris MMP-12 *+/+*, après une exposition longue à la fumée de cigarette, ne développent pas

d'emphysème (Hautamaki *et al.*, 1997). De plus, il apparaît un phénomène primordial chez ces souris MMP-12 $-/-$: les macrophages sont incapables de franchir la barrière de la membrane basale (Shiplely *et al.*, 1996).

Les souris MMP-3 $-/-$ apparaissent plus susceptibles que les souris contrôles dans des modèles d'arthrite induit par le collagène. Cette observation semble étonnante dans la mesure où chez l'Homme on note une surexpression de la MMP-3 associée à cette maladie (Mudgett *et al.*, 1998).

Récemment, une forme sévère d'ostéolyse (« vanishing bone syndrome ») dans des familles d'Arabie Saoudite a pu être reliée à une mutation dans le gène de la MMP-2. Les altérations morphologiques observées dans ces sujets rappellent étonnamment celles faites dans les souris *KO* pour la MMP-14. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les souris MMP-2 $-/-$ ne présentent qu'un léger retard de croissance entre la naissance et la puberté. Ces différences peuvent suggérer une distinction fonctionnelle existant entre l'Homme et la souris pour ces MMP.

Dans tous les modèles de progression tumorale, le recours aux animaux transgéniques pour les MMP ont conduit en général à conclure que les MMP favorisent le développement des tumeurs, à l'exception de la MMP-8 pour laquelle il a été observé que les animaux *KO*, par rapport au contrôle, développaient des tumeurs plus importantes, suggérant ainsi que la MMP-8 participait à la défense de l'hôte pour lutter contre la progression tumorale (Balbin *et al.*, 2003).

L'étude des souris MMP-19 $-/-$ fournit une autre illustration des rôles contraires que peuvent jouer les MMP. Ainsi, bon nombre de MMP sont suspectées jouer un rôle facilitant l'obésité, en stimulant notamment la différenciation des adipocytes. Cependant, soumises à un régime riche en cholestérol, les souris MMP-19 $-/-$ développent un surpoids remarquable par rapport aux animaux contrôles, une observation laissant conclure que la MMP-19

aurait, quant à elle, un rôle négatif sur la différenciation des adipocytes ou de l'adipogénèse en général (Pendas *et al.*, 2004) (figure 1.17).

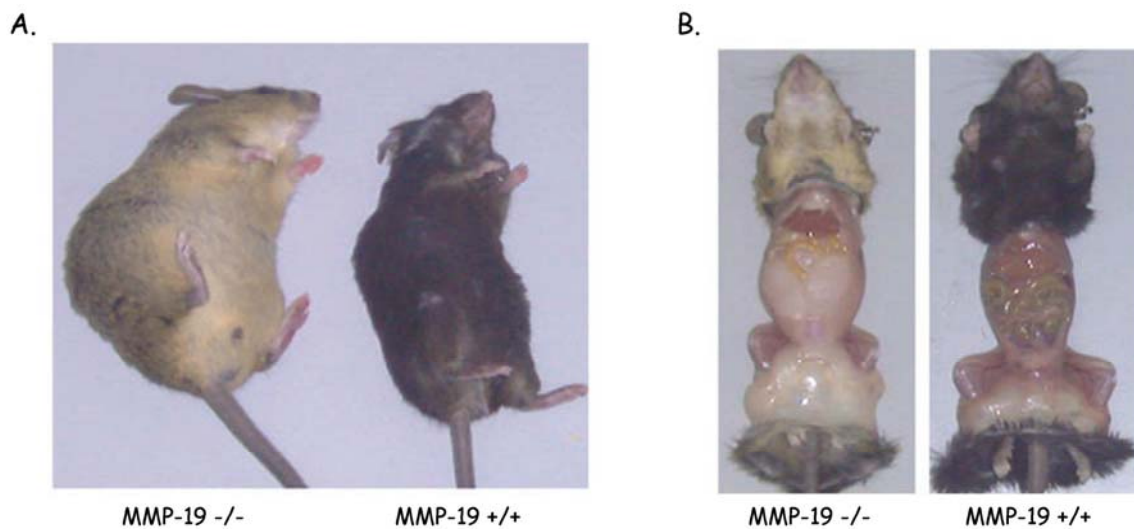


Figure 1.17 : A, Comparaison de la taille du corps des souris MMP-19 -/- et MMP-19 +/+ après un régime de 30 semaines excessivement riche en cholestérol ; B, observation chez les souris MMP-19 -/- de la phase d'hypertrophie des adipocytes, pouvant conduire à une phase d'hyperplasie (Pendas *et al.*, 2004).

Les quelques exemples discutés ci-dessus illustrent que la vision unitaire et naïve sur le rôle des MMP, forgée il y a 15 ans et basée sur le concept que ces protéases étaient essentiellement impliquées dans la dégradation de protéines de la matrice extracellulaire, doit être modifiée pour intégrer de nouvelles données. Parmi celles-ci, figure la notion que les MMP peuvent jouer des rôles opposés selon que l'on s'intéresse à des phénomènes physiologiques ou pathologiques. Dans une même pathologie, comme le cancer, cette notion s'applique même pour des MMP possédant des spécificités biochimiques proches, comme les différentes collagénases. La nature des cellules responsables de la sécrétion de ces protéases est certainement un élément important à prendre en compte, selon que la protéase est produite par exemple par une cellule cancéreuse ou bien par une cellule de la réponse immunitaire présente dans le tissu tumoral. Enfin, notre compréhension intime du rôle des MMP passera nécessairement par la connaissance des substrats clivés par ces enzymes. Une

liste de substrats pouvant être clivés par les MMP, mais n'appartenant pas à la matrice extracellulaire, est présentée par la suite en relation avec une étape particulière de la progression tumorale (tableau 1.5).

Les MMP semblent être mobilisées tout au long des phases initiales de la progression tumorale (prolifération, survie, angiogenèse, invasion et réponse immunitaire), comme l'illustre la figure 1.18. Elles seraient ainsi impliquées dans la régulation de la croissance de la tumeur en libérant des facteurs de prolifération cellulaire, tels que le facteur de croissance de type insuline (IGF) (Manes *et al.*, 1997). Elles pourraient aussi activer les précurseurs de facteurs de croissance liés à la membrane cytoplasmique ou présents dans la matrice extracellulaire péri-tumorale (Yu *et al.*, 2000).

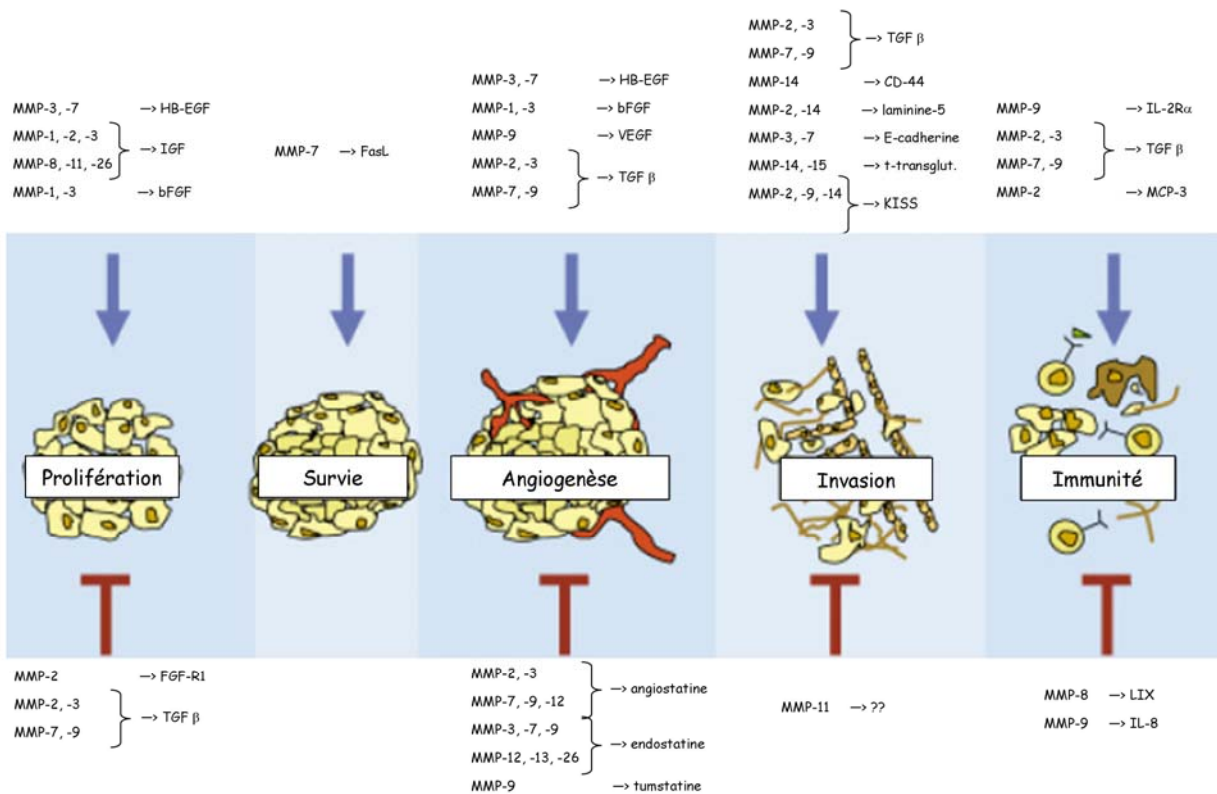


Figure 1.18 : Dualité fonctionnelle des MMP au cours de la progression tumorale. Le symbole bleu indique une activité pro-tumorale, alors que le symbole rouge indique un effet anti-tumoral.

source : Folgueras *et al.*, 2004

Chapitre I : Les MétalloProtéases Matricielles ou MMP

Tableau 1.5 : Récapitulatif des substrats bioactifs et matriciels des MMP.

source : (Folgeras *et al.*, 2004; Chaussain-Miller *et al.*, 2006)

MMP	Nom de la protéase	Substrats bioactifs	Substrats matriciels		
MMP-1	Collagénase 1 (collagénase intersti- tielle)	pro-TNF α IGFBP-2, -3, -5 MCP-1, -2, -3 IL-1 β	α 2-macroglobuline L-sélectine α 1-PI α 1-antichymotrypsine	Collagènes I, II, III, VII & X Gélatines Entactine	Caséine Aggrécane Protéine de liaison au cartilage
MMP-2	Gélatinase A	pro-TNF α IGFBP-3, -5 Endotheline-1 SDF-1	α 2-macroglobuline MCP-3 α 1-PI pro-TGF β	Collagènes I, IV, V, VII & XI Gélatines Fibronectine Grande téna-scine C	Laminine Aggrécane Elastine
MMP-3	Stromélysine 1	pro-TNF α IGFBP-3 E-cadhérine SDF-1 α 1-PI	α 2-macroglobuline MCP-1, -2, -3, -4 Endostatine Plasminogène Antithrombine III	Collagènes III, IV, IX & X Gélatines Fibronectine	Laminine Aggrécane Grande téna-scine C
MMP-7	Matriylsine	FasL pro-TNF α E-cadhérine pro- α -défensine	α 1-PI α 2-macroglobuline Endostatine Plasminogène	Aggrécane Fibronectine Elastine Laminine	Gélatines Collagène IV Entactine
MMP-8	Collagénase 2 (collagénase neutrophile)	pro-TNF α MCP-1 IGFBP	α 1-PI α 2-macroglobuline α 2-antiplasmine	Collagènes I, II & III Caséine	Aggrécane
MMP-9	Gélatinase B	IL-1 β IL-2R α proIL-8 pro-TNF α pro-TGF β IFN- β	α 1-PI α 2-macroglobuline Endostatine Plasminogène Tumstatine Substance P	Gélatines Aggrécane Entactine	Elastine Collagènes III, IV, V & XIV
MMP-10	Stromélysine 2			Aggrécane Fibronectine	Laminine Collagènes III, IV & V
MMP-11	Stromélysine 3	α 1-antitrypsine IGFBP-1	α 1-PI α 2-macroglobuline	Caséine	
MMP-12	Métalloélastase	pro-TNF α Endostatine	α 1-PI Plasminogène	Elastine Collagènes I & IV	κ -élastine Gélatine
MMP-13	Collagénase 3	pro-TNF α SDF-1 MCP-3	α 1-PI α 2-antichymotrypsine Endostatine	Collagènes I, II, III, IV, VI, IX, X & XIV Gélatine	Aggrécane Perlécane Fibronectine
MMP-14	MT1-MMP	pro-TNF α SDF-1 MCP-3 Intégrine $\alpha_v \beta_3$ syndécans	CD-44 Transglutaminase tissulaire α 1-PI α 2-macroglobuline KiSS-1/méstatine	Collagènes I & III Fibronectine Téna-scine	Nidogène Aggrécane Perlécane
MMP-15	MT2-MMP	pro-TNF α	Transglutaminase tissulaire	Fibronectine Téna-scine Laminine	Nidogène Aggrécane Perlécane
MMP-16	MT3-MMP	pro-TNF α syndécans	Transglutaminase tissulaire KiSS-1/méstatine	Collagènes I, II & III Gélatine I Vitronectine	Fibronectine Laminine
MMP-17	MT4-MMP	pro-TNF α	α 2-macroglobuline	Gélatine	
MMP-19	pas de nom usuel			Gélatine Caséine Fibronectine Collagène IV	Laminine Nidogène Fibrinogène Fibrine
MMP-20	Enamélysine			Amélogénine	Aggrécane
MMP-21	pas de nom usuel				
MMP-23	pas de nom usuel			Gélatine	
MMP-24	MT5-MMP	KiSS-1/méstatine		Gélatine Collagène I	Fibronectine Laminine
MMP-25	MT6-MMP (leukolysine)	α 1-PI		Collagène IV Gélatine	Fibronectine
MMP-26	Matriylsine 2 (endométase)	IGFBP-1	α 1-PI	Collagène IV Gélatine	Fibronectine
MMP-27	pas de nom usuel				
MMP-28	Epiylsine			Caséine	

La capacité des MMP à cibler des substrats impliqués dans le processus d'apoptose est particulièrement importante quant aux rôles des MMP dans le cancer. La MMP-3 présente un effet pro-apoptotique sur les cellules épithéliales voisines des cellules cancéreuses. La MMP-7 induit aussi l'apoptose, en favorisant la sécrétion du Ligand de Fas (FasL), lié à la membrane cellulaire (Powell *et al.*, 1999); celui-ci, une fois soluble, s'associe en trimère et interagit avec son récepteur Fas sous forme de trimère ; cette interaction conduit à l'apoptose des cellules qui présentent ce complexe Fas/FasL à leur surface. D'autres MMP participent aussi à la suppression du phénomène d'apoptose des cellules tumorales ; parmi ces MMP, nous pouvons citer la MMP-11 qui présente une dualité très intéressante. En effet, la MMP-11 jouerait un rôle de régulateur négatif de l'apoptose des cellules cancéreuses dans un contexte de tumeur primaire (Boulay *et al.*, 2001), une remarque en accord avec l'observation de tumeurs moins développées dans des souris MMP-11 $-/-$. Curieusement, la MMP-11 semble empêcher la formation de métastases (Andarawewa *et al.*, 2003). Les souris transgéniques déficientes en MMP-11 développent en effet plus de métastases que les souris MMP-11 $+/+$. Selon le contexte tumoral, la MMP-11 semble donc jouer un rôle soit pro- soit anti-tumoral. L'activité des MMP a aussi été associée aux phénomènes de protection des cellules cancéreuses contre la réponse immunitaire. Ainsi, la MMP-9 a pour substrat le récepteur α de l'interleukine-2 (IL-2R α), impliqué dans la voie de signalisation et de sécrétion des lymphocytes T (Sheu *et al.*, 2001). Cependant, les MMP sont aussi impliquées dans la défense de l'hôte en stimulant la réponse immunitaire. Un tel rôle est attribué à la MMP-8 dont on pense qu'elle serait capable de mobiliser des médiateurs de l'inflammation dans un contexte tumoral (Balbin *et al.*, 2003).

Depuis déjà quelques années, les expériences ont largement démontré que les MMP jouaient aussi un rôle très important dans l'angiogenèse de la tumeur. Plusieurs facteurs pro-angiogéniques, comme le facteur de croissance de

l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) ou encore le facteur de croissance transformant β (TGF- β), sont activés ou induits par ces enzymes, déclenchant le « switch » angiogénique pendant la progression tumorale et favorisant le remodelage vasculaire et la néovascularisation depuis des sites distants (Mohan *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000; Belotti *et al.*, 2003). En 2002, Hiratsuka *et al.* ont montré un nouveau lien entre les MMP et les facteurs angiogéniques, en décrivant l'induction de la MMP-9 par les macrophages des tumeurs et les cellules endothéliales, favorisant le développement de métastases au niveau du foie (Hiratsuka *et al.*, 2002). De plus, la MMP-9 produite par l'hôte contribue activement au comportement cancéreux des carcinomes ovariens en favorisant le développement de la vascularisation (Huang *et al.*, 2002). Cependant, plusieurs MMP sont impliquées dans la maturation de l'angiostatine et de l'endostatine, générant ainsi les formes actives de ces inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse (Cornelius *et al.*, 1998; Ferreras *et al.*, 2000). Hamano *et al.*, en 2003, ont observé que l'angiogenèse pathologique et la prolifération tumorale étaient liées à la synthèse de tumstatine, résultant de la dégradation de la chaîne $\alpha_v\beta_3$ du collagène de type IV par la MMP-9 de l'hôte (Hamano *et al.*, 2003).

Au vue de ces observations, il est évident que de nombreux membres de la famille des MMP présentent une dualité dans leurs fonctions physiologiques en participant directement ou indirectement à l'activation et à l'inhibition de protéines impliquées dans les différentes phases de la progression tumorale. Dans toutes les publications reportées ci-dessus, la nature des substrats dégradés par les MMP a été identifiée de façon intuitive par analyse des phénotypes, laissant un doute aux chercheurs les plus critiques. Clairement, des méthodes de protéomique doivent être développées et utilisées afin d'établir formellement la nature des substrats réellement clivés par les MMP (Lopez-Otin *et al.*, 2002). De même, une identification formelle des MMP présentes sous

forme active à un moment donné de l'évolution d'une pathologie doit être aussi abordée par de nouvelles approches de protéomique. Comme exposé dans les chapitres suivants, l'activation de certaines MMP repose sur des mécanismes complexes, d'autre part une fois activée ces formes de MMP sont sous le contrôle d'inhibiteurs naturels spécifiques, les TIMP. Une fois que les MMP sont exprimées par les cellules, ces protéases peuvent *a minima* exister sous trois formes : proMMP, forme active, forme inhibée par les TIMP ; on verra que d'autres interactions intermoléculaires ont été décrites, l'ensemble de ces mécanismes rendant plus complexe la réponse quant à la présence des taux réels de formes actives de MMP.

b) L'activation des MMP

i. Clivage du prodomaine à l'extérieur de la cellule :

Les MMP, comme beaucoup de protéases, sont synthétisées sous forme de zymogènes, impliquant dans le cas des MMP la présence d'une séquence de 80 résidus en N-terminal de la protéine. Outre le rôle de ce prodomaine dans l'inactivation de l'enzyme, celui-ci intervient aussi dans l'expression correcte de ces enzymes par la cellule. En effet, la transfection de cellules par des gènes ne codant que pour le domaine catalytique entraîne une très faible expression de la protéine, alors que si le prodomaine est présent, on observe une très bonne expression. Ces résultats suggèrent que le prodomaine jouerait un rôle important à différentes étapes dans la voie de sécrétion de ces protéines, dont l'un pourrait être le repliement correct de la protéine. Cependant, il est intéressant de noter qu'*in vitro* le repliement correct de ces protéines ne nécessite pas la présence du prodomaine.

Comme expliqué précédemment, l'activité des MMP requiert le clivage du prodomaine, cet évènement déclenché soit par une réaction chimique modifiant

l'atome de soufre de la séquence hautement conservée PRCGXPD du prodomaine des formes latentes des MMP, soit par coupure protéolytique.

L'activation des MMP répond à une régulation complexe, diverses protéases appartenant aux différentes classes de protéases (protéases à sérine et à cystéine et métalloprotéases à zinc) ont été montrées capables d'activer les MMP *in vitro*, renforçant la notion que l'activation *in vivo* des MMP pouvait être réalisée dans le contexte de cascade protéolytique. Nagase *et al.* ont montré en 1988 que la proforme de la collagénase dans un système de culture cellulaire pouvait être activée par une autre MMP : la MMP-3 (Ito *et al.*, 1988). La proforme de la MMP-3 est elle-même activée par coupure protéolytique du prodomaine par une autre protéase, la plasmine issue de l'action de l'activateur du plasminogène, l'urokinase, sur le plasminogène (Brinckerhoff *et al.*, 2002). La plasmine est elle-même impliquée dans plusieurs cascades de régulation.

En 1994, le groupe de Seiki a décrit une nouvelle MMP : la MMP-14, appartenant aux groupes des MMP transmembranaires. Ils ont montré que la MMP-14 a la capacité d'activer la proforme de la MMP-2. Le modèle résultant de ces observations implique des interactions intermoléculaires entre la MMP-14 ancrée à la membrane, la proMMP-2 et un inhibiteur tissulaire naturel des MMP de type protéique : TIMP-2 (Sato *et al.*, 1994). C'est à notre connaissance, l'un des rares exemples de la littérature où un inhibiteur naturel d'une protéase intervient dans l'activation de celle-ci. Ce mécanisme repose en fait sur la présence dans les TIMP de deux domaines, N-terminal et C-terminal, capables d'interagir respectivement avec le domaine catalytique des MMP (domaine N-terminal) et le domaine hémapexine (domaine C-terminal). Ce caractère « bivalent » du TIMP-2 en particulier lui permet d'engager d'une part une interaction avec le domaine catalytique d'une MT1-MMP et d'autre part d'interagir avec le domaine hémapexine de la proMMP-2 à activer, pour former un complexe trimérique à la surface de la cellule (schéma 1.5). Lorsque les

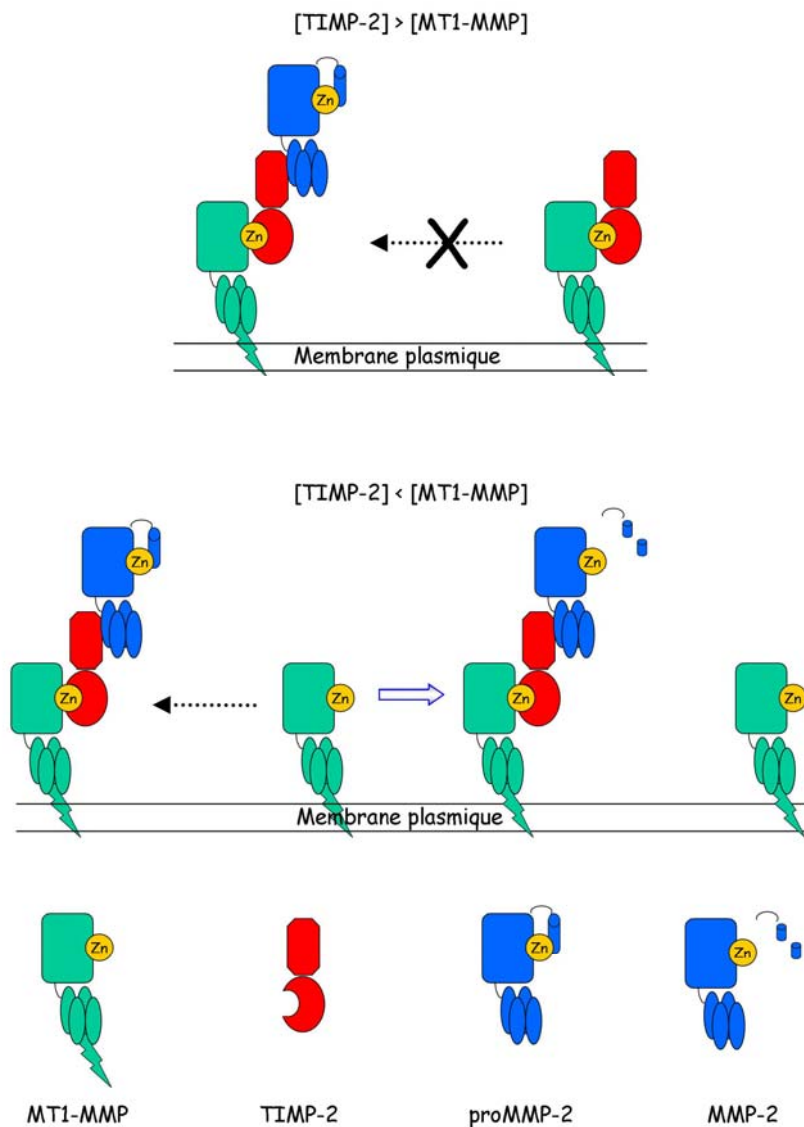


Schéma 1.5 : Activation de la proMMP-2 à la surface de la cellule par la MT1-MMP et TIMP-2.

concentrations de TIMP-2 à cette interface sont insuffisantes pour inhiber toute forme active de MT1-MMP, on pense que les quelques molécules de MT1-MMP restées sous forme active sont capables de cliver le prodomaine de la proMMP-2, déjà complexée avec une autre molécule de MT1-MMP. La localisation membranaire de la MT1-MMP est essentielle à la réalisation de ce processus remarquable d'activation de la proMMP-2, de même le fait que la MT1 - MMP fait partie des MMP pouvant être activée par la furine.

ii. Clivage du prodomaine à l'intérieur de la cellule :

En 1995, Weiss et Pei identifient pour la première fois dans une séquence de MMP en C-terminal du prodomaine de la MMP-11 un motif RRKR caractéristique d'une coupure par la furine : une convertase de pro-hormone. Cette séquence ne fut retrouvée par la suite que dans quelques MMP : la MMP-11, la MMP-21, la MMP-23, la MMP-28 et les MT-MMP, MMP ancrées à la membrane plasmique. Weiss et Pei introduisent alors le concept d'activation intracellulaire des MMP par la furine (Pei *et al.*, 1995).

c) L'inhibition des MMP

1979 : Welgus *et al.* ont montré que l'activité MMP est aussi contrôlée par une activité inhibitrice endogène, alors appelée anti-collagénase fibroblastique (Welgus *et al.*, 1979). Les inhibiteurs endogènes des MMP forment une famille de 4 protéines : les TIMP. En 1997, le groupe de W. Bode a montré que l'interaction entre le TIMP-1 et la MMP-3 impliquait, en partie, au niveau du site actif les 5 premiers résidus, ces cinq résidus se positionnant de façon identique dans le site actif à celle d'un substrat (Gomis-Ruth *et al.*, 1997). Ce type d'interaction put

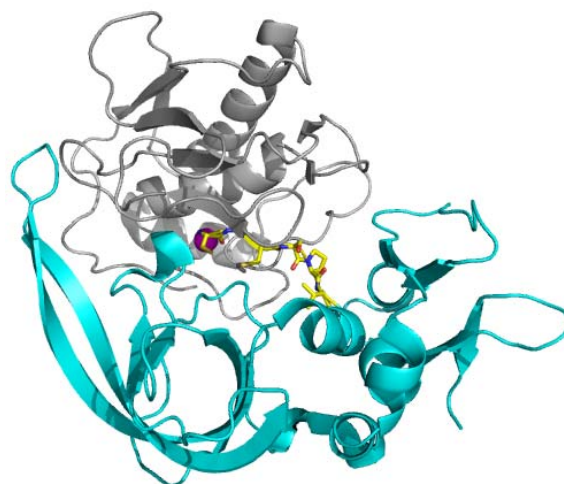


Figure 1.19 : Représentation tridimensionnelle de l'interaction entre le domaine catalytique de la MMP-13 (en gris) et des 5 résidus (en jaune) du domaine N-terminal du TIMP-2 (en bleu) se positionnant de façon identique dans le site actif à celle d'un substrat. L'atome de zinc catalytique est représenté en rose.

être aussi observée dans le cas de l'interaction du TIMP-2 avec d'autres MMP, notamment la MMP-13 (figure 1.19).

Outre la présence des cinq résidus en N-terminal des TIMP dans le site actif des MMP, on peut voir sur la figure que plusieurs boucles situées en surface du TIMP-2 projettent des résidus venant en contact avec une grande partie de la surface du domaine catalytique. Ce type de complexe implique donc un très grand nombre de résidus de ces deux protéines, cette multiplicité d'interactions étant en accord avec la très grande affinité des TIMP envers les MMP (schéma 1.6). Par ailleurs, une certaine spécificité d'interaction entre les couples MMP/TIMP pourrait être due aux interactions engagées au niveau des boucles des TIMP, modulées par la nature des résidus des MMP participant à cette interaction.

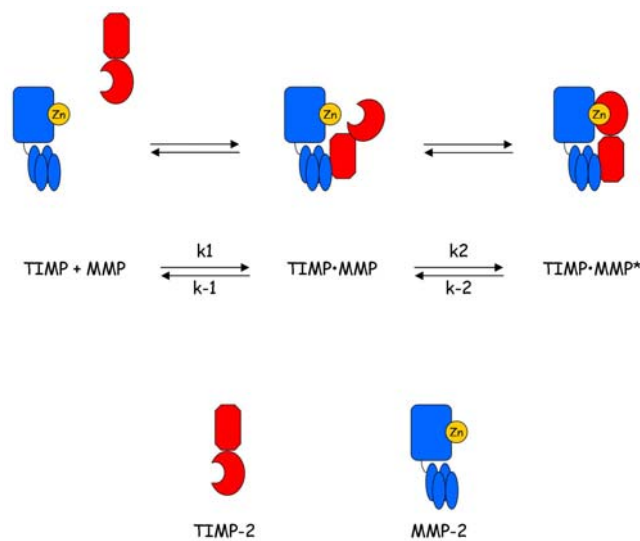


Schéma 1.6 : Illustration du mécanisme d'interaction entre un TIMP et une MMP ; les constantes de dissociation de ce type d'interaction en deux temps sont de l'ordre du picomolaire.

En 1992, Hayakawa *et al.* ont proposé que les TIMP, outre leur rôle de régulation de l'activité protéolytique des MMP et leur activité potentialisant la survie et la prolifération de lignées hématopoïétiques, étaient des protéines impliquées dans le contrôle d'autres processus biologiques (Hayakawa *et al.*, 1992), soulignant ainsi le rôle multifonctionnel de ces protéines.

8. Détection des formes actives de MMP.

Compte tenu des différentes formes dans lesquelles les MMP peuvent se retrouver après leur expression par la cellule, du fait de l'existence de différents mécanismes de régulation post-traductionnelle, la détection des ARN messagers codant pour ces protéines ne permet pas de conclure sur l'existence de formes actives des protéines correspondantes. Ces remarques ont donc conduit divers groupes de recherche à mettre au point des méthodes pour aboutir à la détection et la quantification des différentes formes actives de MMP. A cet égard, il convient de noter qu'il existe potentiellement une approche générale pouvant permettre la détection sensible des MMP, la zymographie. Cependant, comme mentionné ci-dessous, cette technique est essentiellement utilisée pour la détection des gélatinases (MMP-2 & -9), un cas où cette approche se révèle être redoutablement sensible, mais comportant plusieurs problèmes limitant les interprétations de ce type d'expériences.

L'objectif principal de ces travaux de thèse a consisté en l'élaboration d'une technique visant à détecter les formes actives de MMP présentes dans des tissus tumoraux, pouvant participer à la progression tumorale ou bien à la défense de l'hôte.

a) La zymographie appliquée à l'étude des gélatinases (MMP-2 et MMP-9)

Une méthode classique en biochimie pour détecter l'activité protéolytique des protéases est la zymographie (Rosenthal *et al.*, 1977; Lacks *et al.*, 1980).

Cette technique permet de détecter, de manière sensible, sur gel d'électrophorèse toute activité protéolytique capable de cliver un substrat de référence. Ce substrat co-polymérisé dans le gel d'acrylamide de manière uniforme doit répondre à différents critères ; le substrat choisi est en général macromoléculaire afin de ne pas migrer dans le gel d'électrophorèse lors de l'application du courant électrique. Il doit, bien entendu, être relativement

sélectif et efficacement dégradé par les enzymes recherchées. Dès lors que le substrat co-polymérisé répond à ces critères, la zymographie apporte des informations quant à la présence de protéases dans un échantillon biologique d'intérêt. La zymographie est basée sur la capacité des protéases dénaturées au SDS à recouvrer leur structure tridimensionnelle et ainsi leur activité enzymatique, une fois le SDS retiré.

Après la migration électrophorétique, le SDS, présent dans le gel et assurant le maintien des protéases sous leurs formes dénaturées, est éliminé par une solution de Triton X-100, puis un lavage à l'eau. Une incubation de 24 à 48 heures dans un tampon adéquat permet le repliement des protéases et conduit ainsi à la digestion du substrat présent dans le gel. La coloration du substrat co-polymérisé par du bleu de Coomassie engendre une coloration intense du gel, à l'exception de zones discrètes, non colorées, correspondant à des zones où le substrat a été partiellement ou complètement digéré par une protéase présente dans le gel, à cet endroit précis. Ainsi, en plus des indications de présence des protéases ciblées dans un échantillon, cette technique apporte des informations sur le poids moléculaire de ces protéases. Ainsi, en 1994, Woessner *et al.* (travaux non publiés) ont pu détecter une activité gélatinolytique par cette technique en utilisant comme substrat de la gélatine, observation depuis largement confirmée par de nombreux laboratoires (Murphy *et al.*, 1995).

La zymographie reportée sur la figure 1.20 illustre la détection des proformes et des formes activées des MMP-2 et -9, en utilisant la gélatine comme substrat. Cette méthode s'avère très sensible puisque des seuils de détection de l'ordre de 1 pg peuvent être atteints, correspondant à une dizaine d'attomoles de gélatinases sous forme active détectable par cette technique (Murphy *et al.*, 1995).

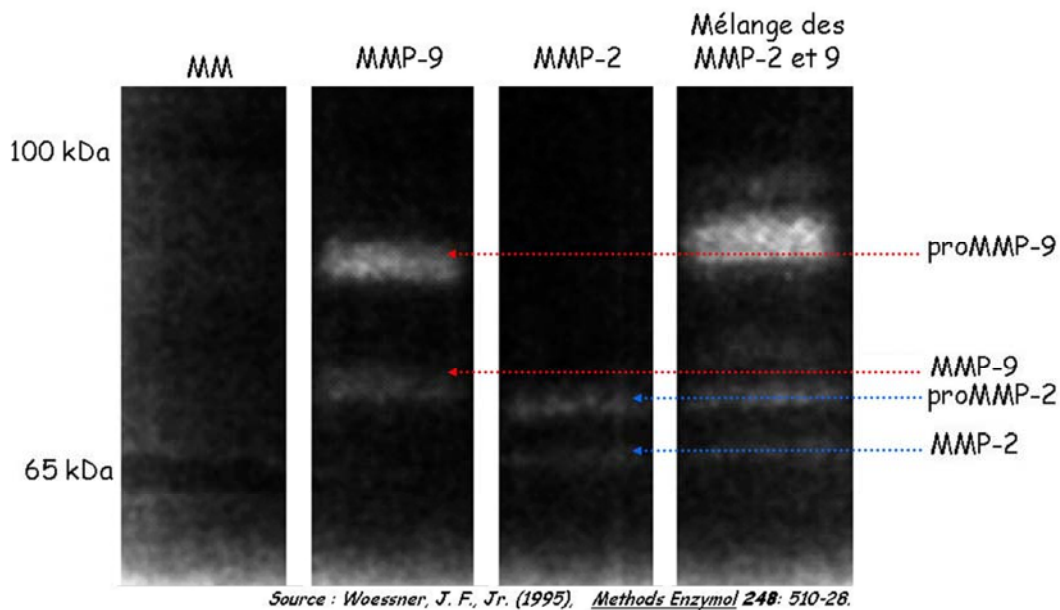


Figure 1.20 : Zymographie gélatine des gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) ;

- puits 1 : marqueurs de poids moléculaires ayant subi un traitement réducteur ;
- puits 2 : 150 pg de MMP-9 ;
- puits 3 : 1,5 ng de MMP-2 ;
- puits 4 : mélange des deux MMP.

Cependant, il faut noter que la zymographie permet d'accéder à la fois à la quantification des formes actives et des proformes. En conditions dénaturantes, mais non réductrices des échantillons, la présence de SDS rompt l'interaction entre le prodomaine et l'atome de zinc catalytique dans le cas des proformes. Après renaturation des protéines, le prodomaine ne reprenant pas sa place dans le site actif de la proMMP-2, cette forme est détectée en zymographie à un poids moléculaire plus élevé que celui correspondant à la forme activée de la MMP-2 ayant perdu le prodomaine.

La dénaturation de l'échantillon, en entraînant aussi la dissociation des complexes TIMP/MMP, confère à la zymographie un autre inconvénient majeur (Kleiner *et al.*, 1994). Cet effet conduit en général à surévaluer la quantité des formes actives de MMP-2 ou -9 dans un échantillon ; et finalement, on ne peut pas exclure avec cette technique la possibilité que l'échantillon ne contienne

aucune forme active, ces formes pouvant être complètement engagées dans une interaction avec des TIMP. S'agissant d'apprécier au plus près d'une situation physiologique, on peut penser que la dénaturation de l'échantillon inhérente à la zymographie, étape avant la révélation des activités protéolytiques, est un traitement de l'échantillon pouvant favoriser une altération des différentes formes de protéases, en autorisant par exemple des mécanismes d'activation/inactivation des systèmes protéolytiques et donc perturbant de façon profonde l'état du protéome représentatif de la situation physiologique.

Il apparaît donc essentiel de concevoir des méthodes permettant d'isoler ou de détecter, avant tout processus de dénaturation, les formes actives des MMP directement à partir de fluides biologiques ou de biopsies. Cependant, compte tenu de sa très grande sensibilité de détection, la zymographie reste une méthode utile permettant d'avoir des informations sur les quantités de MMP-2 et de MMP-9 pouvant être présentes dans un échantillon, quelques soient les formes de ces deux MMP.

b) ABPP pour la détection des MMP

La recherche de formes actives de MMP dans un protéome complexe requiert le développement de méthodes permettant d'étiqueter de façon différentielles les MMP des autres protéines présentes dans l'échantillon d'intérêt, en s'assurant que cet étiquetage se focalisera spécifiquement vers les formes actives de MMP, donc vers le site actif des MMP libres de toutes interactions. Ce type de problématique s'est développé au début des années 2000 en s'intéressant notamment à la détection d'enzymes dans des protéomes complexes (Evans *et al.*, 2006). Ce choix s'explique car les inhibiteurs d'enzymes représentent des étiquettes potentielles, capables de cibler spécifiquement les sites actifs correspondants. En introduisant dans la structure de tels inhibiteurs

d'une part un groupement chimique capable de modifier de façon covalente le site actif de ces enzymes et d'autre part un groupement permettant une détection sensible des enzymes ainsi modifiées (groupement fluorescent ou radioactif), les chercheurs ont mis en place une approche appelée Activity-Based Protein Profiling (ABPP). L'existence d'un lien covalent entre cette sonde d'affinité covalente et ses cibles potentielles permet d'envisager le recours à l'électrophorèse mono- ou bidimensionnelle en conditions dénaturantes comme méthode de séparation des différentes protéines de l'échantillon et l'utilisation de scanner de fluorescence pour détecter spécifiquement sur des gels d'électrophorèse les seules protéines modifiées par la sonde.

En résumé, la stratégie ABPP implique la synthèse d'une sonde comportant trois éléments (figure 1.21) :

a. une unité de ciblage composée par un inhibiteur capable d'interagir spécifiquement avec le site actif des enzymes d'intérêt. La spécificité de cet inhibiteur ne doit pas être nécessairement trop étroite, au contraire un inhibiteur capable d'interagir avec tous les membres appartenant à une même sous-famille d'enzymes peut être extrêmement utile pour détecter plusieurs enzymes à partir d'une seule sonde.

b. une unité réactive, c'est-à-dire un groupement chimique capable, lorsque l'unité de ciblage est en interaction avec sa cible, de former avec celle-ci un lien covalent. En général, la présence d'un groupe nucléophile hautement conservé dans une famille d'enzyme sera utilisée comme cible de la modification covalente. Ainsi, dans le cas des protéases à sérine ou à cystéine, la présence de ces deux résidus dans le site actif de ces enzymes a été exploitée pour concevoir des inhibiteurs capables de modifier de façon covalente ces enzymes. L'absence de tels groupements nucléophiles dans le site actif d'enzyme d'intérêt requiert d'avoir recours à l'utilisation de groupements chimiques photoactivables, pouvant être activés après interaction de l'inhibiteur avec ses cibles.

c. une unité de détection, permettant de repérer facilement les protéines modifiées de façon covalente par la sonde parmi toutes les protéines présentes dans l'échantillon analysé. Cette unité peut être un groupement fluorescent ou un élément radioactif pour une détection sensible en gel d'électrophorèse mono- ou bidimensionnelle.

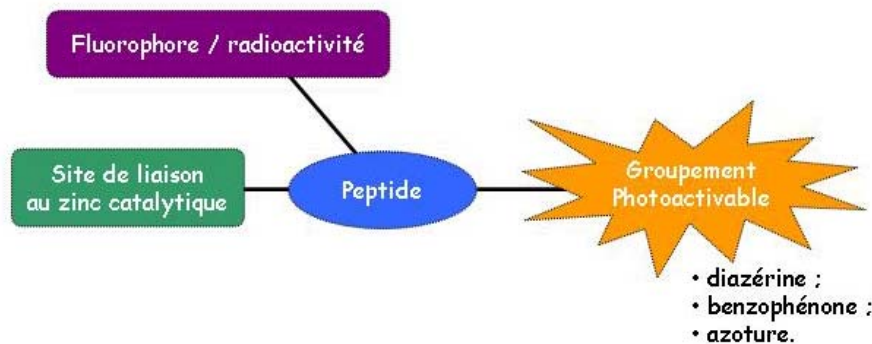


Figure 1.21 : Schéma général d'une sonde trifonctionnelle pour une détection extrêmement sensible de protéines en très faible quantité dans les protéomes.

Depuis 1999, diverses sondes se sont révélées efficaces pour cibler quelques familles d'enzymes, comme les protéases à sérine (Liu *et al.*, 1999) et les protéases à cystéine (Greenbaum *et al.*, 2002). Les premières sondes visant les métalloprotéases à zinc ont été développées à partir d'inhibiteurs peptidiques puissants de ces enzymes (Chan *et al.*, 2004; Saghatelian *et al.*, 2004). L'activité des métalloprotéases à zinc ne repose pas sur la présence de groupements nucléophiles portés par des résidus présents dans le site actif de ces enzymes, mais met en jeu une molécule d'eau activée par l'atome de zinc présent dans leur site actif catalytique. La modification chimique covalente de telles enzymes impose donc l'utilisation de groupements photoactivables. A l'heure actuelle, les 2 sondes utilisées pour cibler les MMP ont été élaborées à partir d'inhibiteurs de MMP de type hydroxamate.

En 2004, Chan *et al.* présentent le développement de sondes à partir d'un squelette peptidique substitué par un groupement hydroxamate permettant de

cibler les MMP ainsi que d'autres métalloprotéases comme la thermolysine. Cette sonde possède comme groupement photoactivable une diazirine (schéma 1.7). La particularité et l'originalité des travaux de Chan *et al.* sont dues aux diverses facettes des sondes développées ; celles-ci peuvent avoir en effet différents rôles selon l'unité révélatrice greffée : une unité cyanine (Cy3) pour une détection sensible ou un groupement biotine pour un enrichissement en MMP de l'échantillon. D'après ces résultats, la meilleure sonde présente une sensibilité de détection atteignant 1ng pour la MMP-9. Néanmoins, ce résultat, en terme de sensibilité, est obtenu pour une MMP pure.

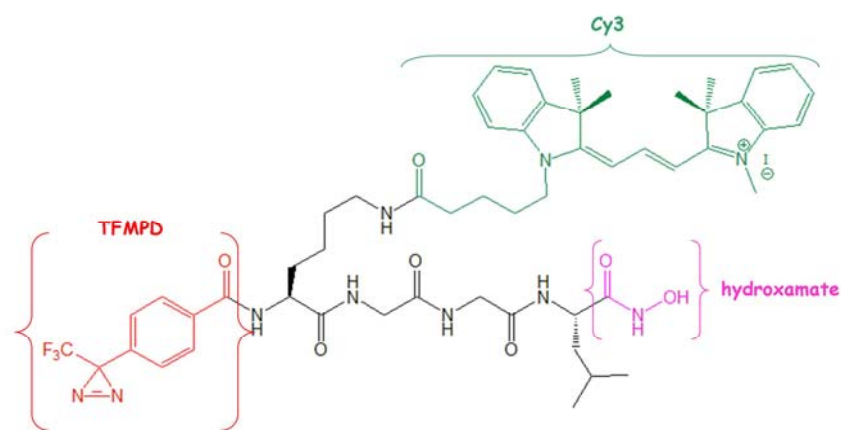
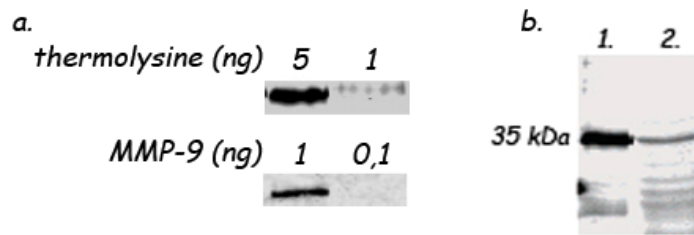


Schéma 1.7 : Sonde développée par l'équipe de E. Chan.

- Cy3 est une cyanine, l'unité de détection ;
- TFMPD est le groupement qui porte le groupement diazirine : 4-(3-trifluorométhyle)phényldiazirine ;
- Le nom de la sonde est : TFMPD-Lys(Cy3)-Gly-Gly-Leu-NHOH.

La détection par la sonde de la MMP-9 n'a pas été réalisée par l'équipe de E. Chan en présence de protéome complexe. Cependant, comme l'illustre la figure 1.22, il est intéressant de noter que la sonde peut détecter jusqu'à 5 ng d'une autre protéase à zinc, la thermolysine pure et 0,03 % de thermolysine ajoutée à un extrait brut de levure. En extrapolant ces données, on peut imaginer une détection de 0,006 % de MMP-9 en présence de protéome complexe.



Source : Chan, E. W. *et al.* (2004), *J Am Chem Soc* 126(44): 14435-46.

Figure 1.22 : Résultats de l'étude de Chan *et al.* ; a, test de la sensibilité de détection de la sonde développée sur une gamme de thermolysine et de MMP-9 (Les résultats les plus sensibles sont présentés) ; b, détection de 200 ng de thermolysine pure (piste 1) et en présence de 640 µg de protéines de protéome issu d'extrait brut de levure (piste 2). La piste 2 correspond à la détection de thermolysine de l'ordre de 0,03 % de la totalité des protéines soumises à l'expérience.

Saghatelian *et al.* ont aussi développé une sonde pour cibler les MMP sur la base d'un inhibiteur de type hydroxamate. Contrairement à Chan *et al.*, Saghatelian *et al.* ont choisi d'utiliser comme groupement photoactivable une benzophénone ; le groupement rapporteur de la sonde de l'équipe de A. Saghatelian est une rhodamine, un groupement détectable par émission de fluorescence (schéma 1.8). Ce groupement peut être introduit de façon élégante après l'étape de photoactivation, grâce à une réaction de « click chemistry » aboutissant à la formation d'un cycle triazole.

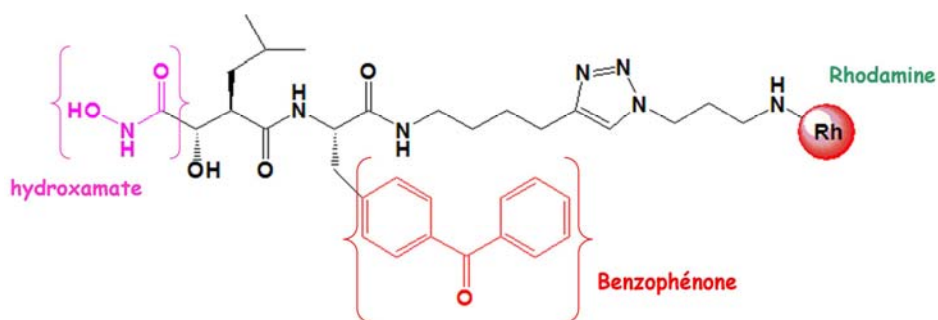
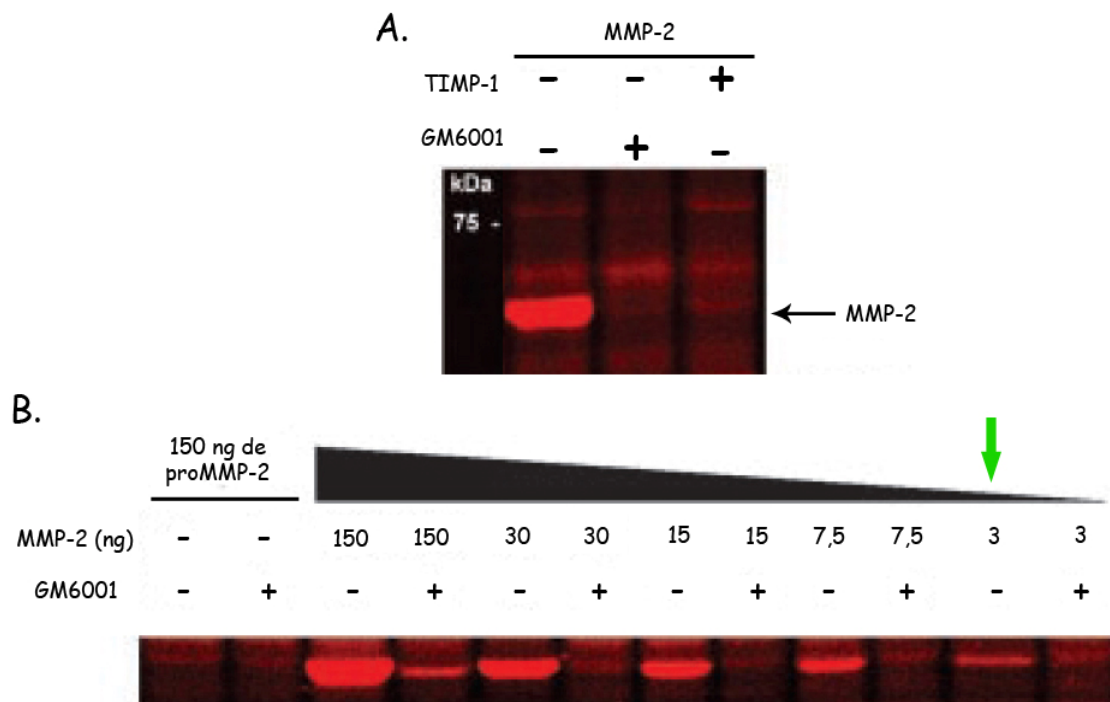


Schéma 1.8 : Sonde développée par l'équipe de B. Cravatt.

- La rhodamine est l'unité de détection ;
- La benzophénone est le groupement photoactivable.

Les expériences de compétition avec un inhibiteur de synthèse des MMP (GM6001) ou bien du TIMP-1 indiquent que cette sonde ne modifie que le site

actif de la MMP-2 (figure 1.23.A). La sensibilité de cette sonde à détecter les MMP a été évaluée en introduisant différentes quantités de MMP-2 (150 à 3 ng) à un broyat rénal. La figure 1.23.B montre que 3 ng de MMP-2 mélangée à 15 μ g de protéines issues de protéome sont détectables par cette sonde, ce qui équivaut à une concentration de 3 nM de MMP-2 et à un rapport MMP-2 / protéome de 0,02 %, valeur sensiblement identique à celle obtenue par Chan *et al.* pour la thermolysine.



Source : Saghatelian, A. *et al.* (2004), Proc Natl Acad Sci USA 101(27): 10000-5.

Figure 1.23 : Résultats de l'étude de Saghatelian *et al.* ; A, test de détection par la sonde développée de 30 ng de MMP-2. Les expériences en présence de 80 ng de TIMP-1 et de 5 μ M de GM6001 (un puissant inhibiteur de type hydroxamate de MMP) ont pour but de démontrer que seules les formes actives sont ciblées ; B, gamme de sensibilité de détection de 150 à 3 ng de MMP-2 pure en présence de 15 μ g de protéines de protéome. La piste désignée par une flèche verte correspond à la détection de MMP-2 de l'ordre de 0,02 % de la totalité des protéines présentes dans l'échantillon.

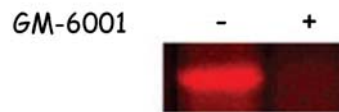
Cette sonde a par la suite été utilisée pour vérifier si elle était capable de détecter des MMP exprimées dans des lignées de cellules tumorales. Aucune MMP n'a pu être visualisée par cette sonde, en revanche d'autres

métalloprotéases à zinc n'appartenant pas à la famille des MMP ont été modifiées par cette sonde, comme l'illustre la figure 1.24.

A. Cas de la Néprilysine



B. Cas de la Leucine-aminopeptidase



C. Cas de la DPP-III



Source : Saghatelian, A. *et al.* (2004), Proc Natl Acad Sci USA 101(27): 10000-5.

Figure 1.24 : Résultats de traitement de 15 μ g de protéines issues de protéome complexe par 100nM de sonde. La sonde développée par l'équipe de B. Cravatt est capable de détecter dans ces protéomes des protéases qui ne font pas partie de la famille des MMP, en particulier :

A, la NEP ; B, la Leucine-aminopeptidase ; C, la DPP-III (Dipeptidylpeptidase III).

Pour chacun de ces cas, cette figure illustre la bande révélée par l'analyse de l'équipe de B. Cravatt en présence et en absence de 5 μ M de GM-6001 (un inhibiteur puissant des métalloprotéases).

La détermination des constantes d'inhibition de cette sonde vis-à-vis de ces cibles, la Néprilysine (NEP), la Leucine-Aminopeptidase (LAP) et la Dipeptidylpeptidase III (DPP-III), s'avère intéressante. En effet, cette étude montre que la sonde utilisée présente une bonne affinité vis-à-vis de ces cibles, respectivement 17, 111 et 76 nM de constantes d'inhibition. La non-détection des MMP dans ce contexte suggère que ces protéases ne sont probablement exprimées qu'en très faible quantité, quantité non détectable pour ce type de sonde. On sait par ailleurs que les protéases détectées dans cette étude, comme la NEP, sont en général exprimées en grande quantité à la surface des cellules.

De plus, la faible sélectivité de la sonde s'explique par le choix du groupe chélatant l'atome de zinc, le groupe hydroxamate, connu pour interagir très fortement avec le zinc, une propriété qui confère en général à ce type d'inhibiteur une faible sélectivité.

La difficulté à détecter les formes actives des MMP suggère que seule une très faible fraction des MMP existent sous cette forme et que les formes majoritaires pourraient être soit les proformes, soit des formes inhibées par les TIMP. Si cette hypothèse est juste, les seuils de détection des sondes constitueront un paramètre essentiel pour détecter les MMP. La sélectivité est un autre paramètre important, notamment pour éviter des phénomènes de déplétion de la sonde par des interactions non-spécifiques impliquant les protéines abondantes dans l'échantillon d'intérêt.

d) Photoactivation

Le marquage par photoaffinité est une approche biochimique qui permet d'identifier et de caractériser des interactions entre un ligand et son récepteur et d'envisager une cartographie structurale pour mieux comprendre les interactions mises en jeu dans ces complexes récepteur/ligand réversibles. Le schéma 1.9 illustre le principe de cette technique.

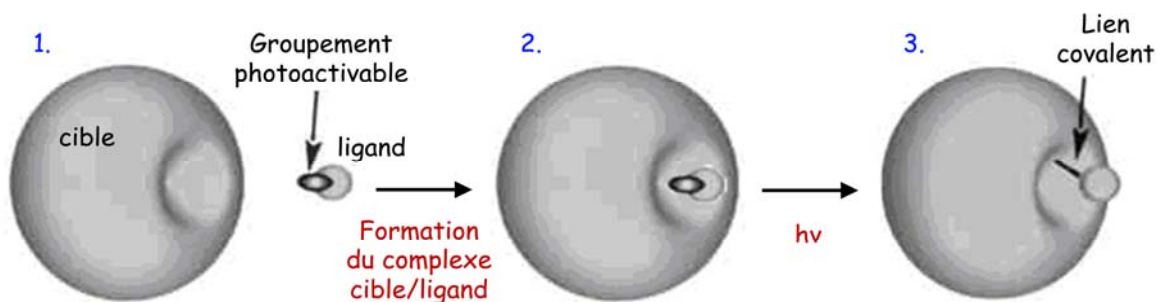


Schéma 1.9 : Principe schématisé du marquage par photoaffinité (Hatanaka *et al.*, 2002).

Cette technique nécessite un ligand incorporant un groupement photoactivable capable d'interagir avec un récepteur cible pour former un complexe. Typiquement, le marquage par photoaffinité requiert une modification chimique du ligand, si bien que la photoirradiation du complexe ligand/récepteur entraîne un intermédiaire réactionnel pouvant générer un lien covalent entre le ligand et son récepteur (Fleming, 1995).

Puisque cette technique implique la formation d'un complexe irréversible entre le ligand et sa cible, il est possible d'étudier les interactions entre des protéines et leurs ligands ; de plus, dans la mesure où le ligand peut incorporer un groupement rapporteur (radioactivité, fluorescence ou biotine), il devient possible d'isoler et de caractériser le site de la modification covalente (Dennis *et al.*, 1988; Nachon *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2006; Mourot *et al.*, 2006; Tomizawa *et al.*, 2007). Il est cependant important de ne pas perdre de vue que le marquage par photoaffinité ne donne pas accès uniquement à des données de type structurale, mais aussi potentiellement à des informations d'ordre biologique ; il est en effet tout à fait envisageable d'utiliser le marquage par photoaffinité pour étudier l'expression de certaines protéines dans des conditions physiologiques données (Liu *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2004; Saghatelian *et al.*, 2004; David *et al.*, 2007).

Le tableau 1.6 récapitule les divers groupements photoactivables pouvant être incorporés au ligand (les azotures d'aryles, les sels d'aryldiazonium, les diazirines, les benzophénones et les composés de type diazo) ainsi que leur espèce réactive correspondante. Malgré la diversité des groupements photoactivables, en dehors des benzophénones, les espèces réactives sont générées par perte d'une molécule d'azote, un gaz inerte, qui rend la réaction irréversible. Comme l'indiquent le tableau 1.6, il existe 4 espèces réactives : le nitrène, le carbocation, le carbène et l'espèce radicalaire.

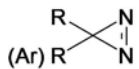
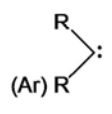
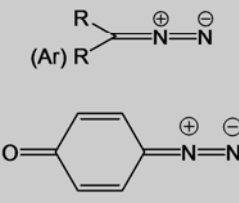
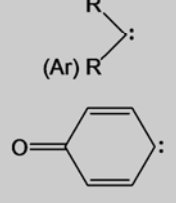
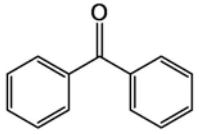
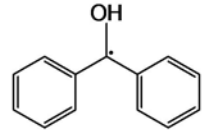
Noms des groupements photoactivables	Structure chimique des groupements photoactivables	Noms de l'espèce réactive	Structure chimique de l'espèce réactive
Azoture d'aryle	$\text{Ar}-\text{N}=\text{N}=\overset{\ominus}{\text{N}}^{\oplus}$	Nitrène	$\text{Ar}-\ddot{\text{N}}$
Sels d'aryldiazonium	$\text{Ar}-\overset{\oplus}{\text{N}}\equiv\text{N}^{\ominus}\text{X}$	Carbocation	Ar^{\oplus}
Diazirine		Carbène	
Composé diazo : 1) isomère linéaire des diazirines 2) <i>p</i> -diazocyclohexadiènone		Carbène	
Benzophénone		Espèce radicalaire	

Tableau 1.6 : Récapitulatif des espèces utilisées pour le marquage par photoaffinité.

Le nitrène est l'espèce réactive produite par photoirradiation d'un azoture d'aryle. Il semble que le devenir du nitrène à l'état singulet passe essentiellement par la conversion en état triplet ou par le réarrangement en cétènimine, dont la réactivité est limitée aux groupements nucléophiles (Kotzyba-Hibert *et al.*, 1995) (schéma 1.10). La stabilité de la cétènimine peut poser un problème de photomarquage non-spécifique ; en effet, à cause de la stabilisation de l'intermédiaire réactionnel, le complexe ligand/récepteur peut se dissocier et la cétènimine peut ainsi former un lien covalent avec tout nucléophile en dehors du site de liaison. Afin de pallier ce problème, des études ont montré que l'introduction de fluor sur le groupement phényle stabilise le nitrène en augmentant la barrière d'énergie d'activation E_a nécessaire à la formation de

l'intermédiaire céténimine (Karney *et al.*, 1997). Il est ainsi possible de favoriser le devenir du dérivé nitrène essentiellement dans son état triplet.

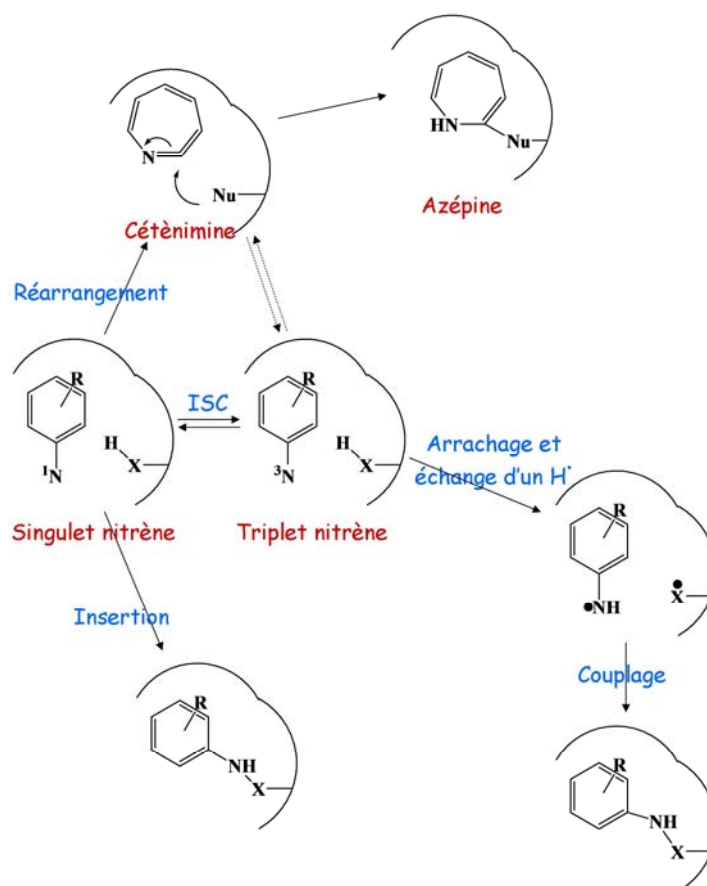


Schéma 1.10 : Devenir de l'intermédiaire nitrène.

Les sels d'aryldiazonium sont souvent considérés difficiles à obtenir et à isoler du point de vue chimique, ce qui est vrai pour les sels d'aryldiazonium substitués par des accepteurs d'électrons, car ils sont généralement peu stables. Si le substituant est un donneur d'électrons en position *ortho*- ou *para*-, les sels de diazonium acquièrent une meilleure stabilité et présentent ainsi de bonnes caractéristiques pour faire d'excellents groupements pour le marquage par photoaffinité. L'espèce obtenue par irradiation des sels d'aryldiazonium est un carbocation, pouvant subir une réduction donnant l'espèce radicalaire correspondante. Les substituants de type donneur d'électrons ont tendance à favoriser la formation des intermédiaires de type carbocation, alors que les

substituants de type accepteur d'électrons ont tendance à favoriser la formation des intermédiaires de type radicalaire (Fleming, 1995; Kotzyba-Hibert *et al.*, 1995). Ces composés sont peu utilisés et n'apparaissent que dans les travaux de M. Goeldner et P. Kessler.

L'intermédiaire réactionnel de type carbène est généré par photoirradiation des diazirines et des groupements diazo (tableau 1.6). Le carbène est une unité très réactive et stable, beaucoup utilisé actuellement par les groupes de E. Chan et B. Cravatt pour les études de protéomique fonctionnelle (Chan *et al.*, 2004; Saghatelian *et al.*, 2004).

Les groupements photoactivables comme la benzophénone, dont le groupement carbonyle est excité par photoirradiation, génèrent des espèces radicalaires. Cependant, le temps de demi-vie de l'état excité est long par rapport au carbène, au nitrène et au carbocation. Ainsi, comme dans le cas de l'espèce cétènimine, il est possible de générer du photomarquage non-spécifique. Malgré ce handicap, les groupements de type benzophénone sont utilisés, mais demandent des temps d'irradiation plus longs pour générer l'espèce réactive et la formation de la liaison covalente que les groupements azotures et diazirines. Chan *et al.* ont montré dans leurs travaux de protéomique fonctionnelle dédiée aux métalloprotéases que leur composé incorporant une benzophénone est moins efficace pour détecter de faibles quantités de thermolysine que leur composé incorporant une diazirine (Chan *et al.*, 2004).

Il apparaît que les groupements photoactivables les plus utilisés sont les diazirines, les azotures d'aryles et les composés incorporant une benzophénone. Il semble évident que le matériel protéique et le thème de recherche sont importants à prendre en compte au cas par cas. Certes, il s'avère tout de même extrêmement important de garder en mémoire le fait que :

- Bien que la diazirine génère une espèce réactive, l'intermédiaire carbène, permettant de former rapidement un lien covalent entre le ligand et sa cible, sa synthèse est longue et laborieuse ;
- l'azoture d'aryle est facilement incorporable sur un composé et génère une espèce réactive, l'intermédiaire nitrène ; ce type de composé est facilement disponible ;
- la benzophénone est un composé stériquement important et nécessite de long temps d'irradiation, comparée aux azotures et aux diazirines ; cependant, il est beaucoup utilisé, car il est insensible à la lumière ambiante et est facilement disponible ;
- les sels d'aryldiazonium semblent aussi de bons candidats pour le marquage par photoaffinité, mais sont peu utilisés, car leur synthèse implique un véritable projet de chimie et ils possèdent une charge positive, qui peut être un inconvénient majeur selon la cible étudiée ;

Il semble donc que le panel de groupements photoactivables est large et que le choix de l'expérimentateur est souvent basé sur la disponibilité et la facilité de synthèse du composé.

En ce qui concerne la technique que nous avons développée au laboratoire, le choix s'est orienté vers un groupement azoture, groupement facilement incorporable à notre base peptidique de type phosphinique. Le but de ces travaux n'étant pas d'identifier le site d'ancrage de la sonde, mais de détecter les MMP sous forme active présentes dans un échantillon biologique, les aspects de photochimie n'ont pas été considérés cruciaux pour cette étude et un groupement azoture présentait un bon compromis entre réactivité et facilité de synthèse pour le développement de notre sonde.

Chapitre II

Développement d'une sonde radioactive
pour une détection sensible des MMP

1. Conception de la sonde

a) Choix du groupement photoactivable

L'efficacité de sondes basées sur l'incorporation d'un groupement photoactivable et capable de modifier de façon covalente une cible d'intérêt dépend en grande partie du rendement de la modification chimique, ce paramètre pouvant varier de plusieurs ordres de grandeur, de 0.1% jusqu'à 50%, selon la nature du groupement photoactivable choisi. Parmi différents facteurs à prendre en compte pour optimiser l'efficacité d'une sonde, on peut citer :

- la proximité entre le groupe photoactivable et les atomes de la cible ;
- le contexte structural dans lequel se situera la réaction de crosslinking ; un environnement bien structuré ne conduira pas aux mêmes résultats qu'une zone de la protéine cible de grande flexibilité.
- la présence de molécules d'eau au voisinage du groupe photoactivable. En effet, la présence de molécules de solvant pouvant préférentiellement réagir avec le groupe photoactivable limitera le pourcentage de modification covalente de la protéine cible.

Ayant à disposition une solide base de données du type structure-activité dans le cas des MMP et d'inhibiteurs du type phosphinique, nous avons choisi d'incorporer le groupe photoactivable sur la position P_1' d'un inhibiteur phosphinique (figure 2.1). En effet, ce choix nous place dans un contexte structural où le groupe photoactivable se retrouvera enfoui dans le sous-site S_1' des MMP, un site peu exposé aux molécules d'eau. Concernant le contexte structural, les données de la littérature indiquent qu'une partie du sous-site S_1' des MMP possède une certaine flexibilité, notamment le bas de la boucle S_1' , constituant la face externe de la cavité S_1' . Le reste de cette cavité possède une structure très bien définie dans toutes les MMP.

Chapitre II : Développement d'une sonde radioactive pour une détection sensible des MMP

Le choix d'insérer le groupement photoactivable dans une position de l'inhibiteur, impliquant son interaction avec le sous-site S_1' , a imposé des contraintes sur la nature chimique du groupe photoactivable à retenir pour développer notre sonde. En effet, la taille du groupe photoactivable devait être en relation avec celle du sous-site S_1' , afin d'éviter des conflits d'ordre stériques. En ajoutant à cette considération les aspects de synthèse chimique, notre choix s'est arrêté sur le groupe azoture. Ce choix pouvait être par ailleurs renforcé par un modèle d'interaction entre un inhibiteur phosphinique, possédant en position P_1' un cycle isoxazoline substitué par un phényle, et une MMP (MMP-12) (figure 2.1). Sur la base de ce modèle, la position en para- du groupement phényle sur le groupement isoxazoline a été choisie pour l'incorporation du groupement azoture.

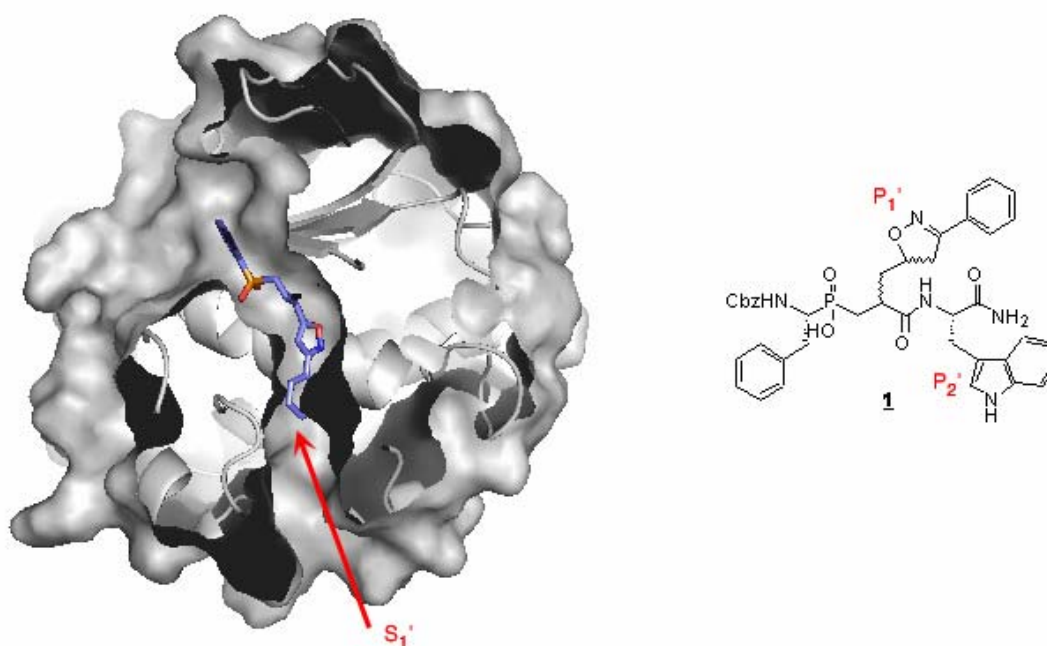
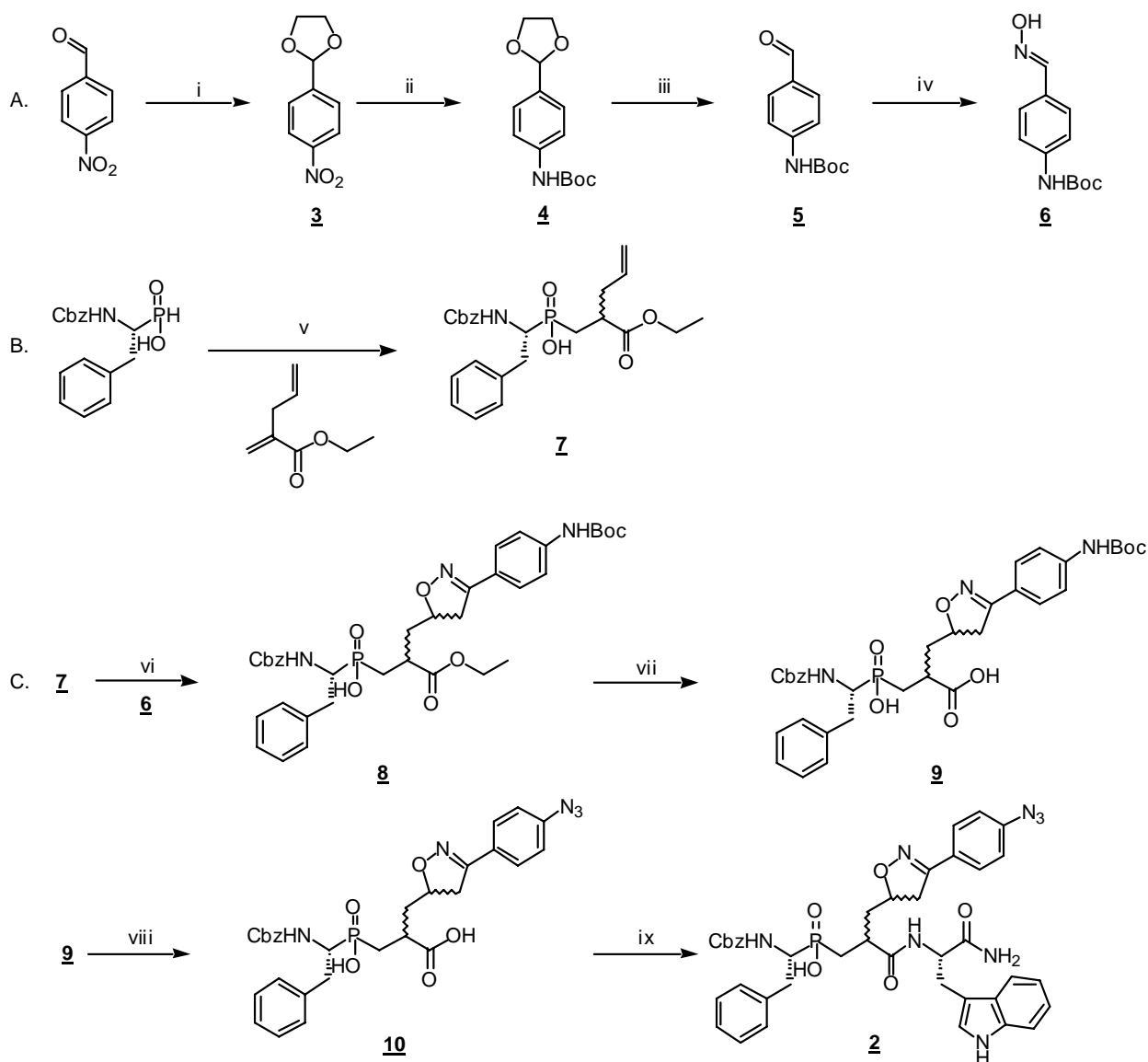


Figure 2.1 : Illustration d'un modèle d'interaction entre un inhibiteur phosphinique, possédant en P_1' un cycle isoxazoline substitué par un phényle (composé **1**), et le domaine catalytique de la hMMP-12 (à gauche) ; structure du composé **1** (à droite).

D'après ce modèle, il devait être possible d'introduire un tel groupement dans cette position, tout en maintenant une bonne reconnaissance de la sonde avec les MMP. Par ailleurs, des tests d'affinité effectués avec des composés

proches en structure indiquaient de très bons pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis de différentes MMP. Dans le schéma 2.1, les différentes étapes de synthèse conduisant à l'obtention d'une sonde incorporant un groupe azoture sont reportées. Il est important de noter que cette conception de la sonde comporte un inconvénient, à savoir l'impossibilité probable d'utiliser cette sonde pour détecter la MMP-1 et la MMP-7. En effet, comme mentionné dans l'introduction, ces deux MMP par la présence d'un sous-site S_1' de faible profondeur constituent une exception dans la famille des MMP. Ainsi, la sonde envisagée aura certainement un très mauvais pouvoir inhibiteur vis-à-vis de ces deux MMP. Malgré ce handicap, nous avons quand même opté pour cette sonde, car la possibilité de pouvoir cibler le sous-site S_1' de la plupart des MMP comportait potentiellement des attraits importants quant à l'efficacité de cette sonde à modifier de façon covalente les MMP.

Chapitre II : Développement d'une sonde radioactive
pour une détection sensible des MMP



i - PTSA, éthylène glycole, toluène ii - H_2/PtO_2 , THF/ H_2O puis Boc_2 , NaOH 1M, dioxane/ H_2O iii - PTSA, acétone iv - NH_2OH , NaOH 1M, $H_2O/EtOH$ v - HMDS, Δ vi - NCS, $CHCl_3$, Et_3N vii - LiOH, Et_3N , THF viii - $NaNO_2$, TFA puis NaN_3 , H_2O/CH_3CN ix - HCl.TrpNH₂, EDC, HOBT, DIEA, CH_2Cl_2

Schéma 2.1 : Voie de synthèse du composé **2**, sonde incorporant un groupement azoture.

b) Site d'incorporation de la radioactivité

Afin d'obtenir relativement aisément une sonde radiomarquée au tritium, un résidu tryptophane en position P_2' a été retenu dans la structure de la sonde (figure 2.1). Ce choix se justifie, d'une part parce que les MMP montrent une préférence marquée pour la présence d'un résidu aromatique dans cette position, d'autre part parce que la présence du résidu tryptophane dans ce composé offre une stratégie de radiomarquage déjà éprouvée au laboratoire.

c) Radiospécificité de la sonde

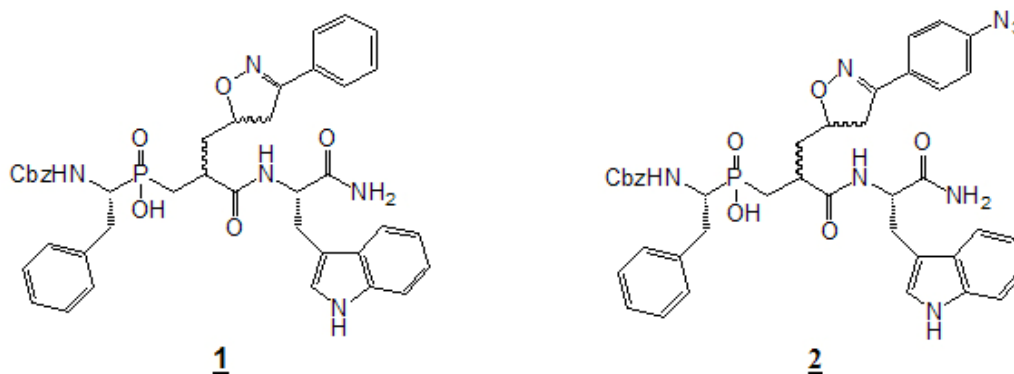
En raison de la présence de deux centres asymétriques dont la stéréochimie n'est pas contrôlée, la synthèse du composé **2** (schéma 2.1) conduit à l'obtention de quatre diastéréoisomères. La séparation de ces diastéréoisomères par HPLC en phase inverse et l'évaluation du pouvoir inhibiteur des différents diastéréoisomères, nous a conduit à ne retenir qu'un diastéréoisomère pour le radiomarquage de la sonde, celui se montrant le plus affin vis-à-vis des MMP. Le radiomarquage au tritium de ce composé optiquement pur a permis le développement d'une sonde, dont la radioactivité spécifique est de l'ordre de 8 Ci/mmoles. En supposant que la modification covalente des MMP par cette sonde se fasse de façon stœchiométrique, cette valeur de RAS indique que des seuils de comptage de l'ordre du picocurie devraient permettre de détecter des femtomoles de MMP. Une telle sensibilité de détection de l'électron β émis par le noyau tritium implique d'avoir recours à des détecteurs extrêmement sensibles. Actuellement, les seuls détecteurs sur le marché permettant d'offrir ce type de sensibilité sont des radioimageurs de la société Biospace (β -imager 2000), capables de détecter une picocurie de rayonnement tritium, soit 2.2 dpm (désintégrations par minute).

2. Affinité de la sonde vis-à-vis des MMP

L'évaluation du pouvoir inhibiteur de cette sonde (non photoactivée, composé **2**) indique que celle-ci se comporte comme un inhibiteur très puissant (sub-nanomolaire) vis-à-vis de différentes MMP (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Constante d'inhibition des fractions purifiées des composés **1** et **2** présentant le meilleur pouvoir inhibiteur vis-à-vis de plusieurs MMPs.

MMPs	2	3	8	9	11	12	13	14
1 F_1 : K_i (nM)	1.1	215	1.2	0.9	1	0.4	0.45	5
2 F_1 : K_i (nM)	0.7	13	0.8	0.75	0.2	0.65	0.4	3.5



Dans cette série de MMP, la sonde développée présente une affinité légèrement inférieure vis-à-vis de la MMP-3 et de la MMP-14. Il est cependant intéressant de constater que le pouvoir inhibiteur de cette sonde est équivalent à celui montré par un composé parent (composé **1**) ne comportant pas le groupe azoture. Ce résultat indique que la présence du groupe azoture est bien tolérée par le sous-site S_1' des MMP, une donnée conforme avec le modèle d'interaction entre le composé **1** et la hMMP-12. Il est à noter que, dans le cas de la famille des protéases ADAMs, notre sonde ne bloque pas l'activité protéolytique de l'ADAM-17 (TACE) à des concentrations micromolaires. Cette donnée est d'autant plus intéressante que les ADAMs forment un groupe de protéases présentant de fortes analogies structurales avec les MMP. Vis-à-vis d'autres

protéases comme l'ACE, la NEP et l'APN, notre sonde se montre peu efficace aussi pour bloquer l'activité protéolytique de ces enzymes.

3. Sensibilité de détection de la sonde

Pour évaluer l'efficacité de cette sonde à modifier de façon covalente une MMP et démontrer que le site de cette modification ne concerne que le site actif des MMP, nous avons choisi d'étudier en premier lieu le domaine catalytique de la MMP-12 humaine. Ce choix s'est essentiellement effectué sur un critère de disponibilité de cette enzyme. Afin de démontrer l'existence d'une modification covalente de la hMMP-12 par notre sonde, le protocole mis en place, après photoactivation du complexe hMMP-12/sonde, comporte les étapes suivantes :

- 1° l'isolement du complexe covalent par migration de ce complexe dans un gel d'électrophorèse, en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ;
- 2° le transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane fine en nylon de type PVDF ;
- 3° une détection et une quantification des protéines radioactives transférées sur la membrane, à l'aide d'un radioimageur Biospace.

Ce protocole suppose que les complexes hMMP-12/sonde, non-covalents, soient effectivement dissociés lors de l'étape de dénaturation des protéines avant migration sur gel, permettant ainsi d'attribuer à l'observation de bandes de radioactivité la présence univoque de complexes covalents. Cette séparation par un gel d'électrophorèse devrait aussi permettre d'éliminer les formes libres de l'inhibiteur radioactif, formes qui sont toujours en excès par rapport à la cible dans les conditions de saturation de celle-ci.

Après incubation de la sonde en présence de hMMP-12, puis photoactivation de la sonde, le protocole d'analyse décrit ci-dessus permet de mettre en évidence une bande de radioactivité, dont la position sur le gel s'accorde avec le poids moléculaire de la hMMP-12. De façon importante, l'expérience contrôle, en

absence de photoactivation, ne révèle aucune présence de radioactivité. Ce résultat démontre que le signal de radioactivité, observé sur la membrane de PVDF, implique la modification covalente de la hMMP-12 (figure 2.2.A).

a) Site de modification covalente

Pour démontrer que le site de la modification de la hMMP-12 par notre sonde ne concerne que le site actif de l'enzyme, la même expérience que celle décrite ci-dessus a été réalisée en ajoutant au préalable un compétiteur non photoactivable et non radioactif, le composé **1**, que nous avons défini précédemment comme étant un inhibiteur de type phosphinique capable d'interagir à haute affinité avec le site actif de la MMP-12. La constante d'inhibition K_i pour la hMMP-12 de ce composé est la suivante : $K_{i(hMMP-12)} = 0.4$ nM.

En présence de ce compétiteur en excès ($[composé\ 1] = 5*[sonde]$), seule une très faible bande de radioactivité est observée, ce qui permet de conclure que le site de modification de notre sonde ne concerne effectivement que le site actif de la hMMP-12 (figure 2.2.A).

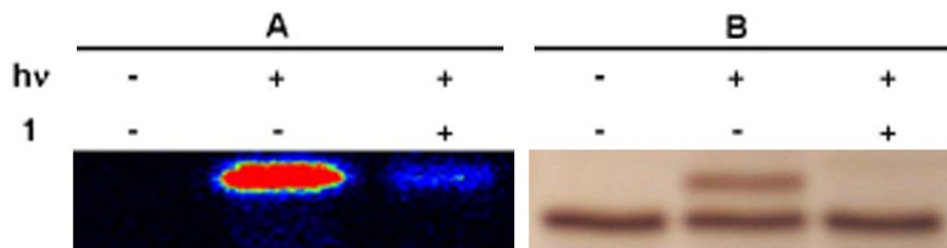


Figure 2.2 : Modification covalente de la hMMP-12 par la sonde photoactivable, composé **2**. 50 ng hMMP-12 ont été incubés en présence de 2 μ M de composé **2** pendant 10 min, en absence et en présence de 11 μ M de composé **1**, avant 2 min d'irradiation UV ; pour les expériences contrôles les complexes hMMP-12/sonde, en absence de compétiteur, n'ont pas été photoactivés. Les complexes photoactivés ou non ont été séparés par SDS-PAGE 12%, puis :
A, les protéines, présentes dans le gel d'électrophorèse, ont été transférées sur une membrane de PVDF pour une lecture de radioactivité au β -imager ;
B, les protéines présentes dans le gel 12% ont été colorées au nitrate d'argent.

b) Rendement de modification covalente

Il est intéressant de noter que la coloration au nitrate d'argent d'un gel SDS-PAGE, sur lequel a été chargée la hMMP-12 photoirradiée en présence de la sonde (figure 2.2.B), révèle deux bandes de poids moléculaires distinctes, alors qu'une seule bande est révélée lorsque l'on fait migrer la hMMP-12 non-photoirradiée. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour les mêmes échantillons analysés par le β -imager montre que la bande supérieure, de plus haut poids moléculaire, visualisée en coloration au nitrate d'argent, représente la hMMP-12 modifiée par la sonde azoture, alors que la bande inférieure, de plus bas poids moléculaire et non radioactive, correspond à la hMMP-12 non modifiée. L'expérience de compétition analysée par coloration au nitrate d'argent confirme cette interprétation, puisque dans ces conditions une seule bande, celle de plus bas poids moléculaire, est visualisée. Ces observations donnent accès à un moyen de calcul simple du pourcentage de modification covalente de la hMMP-12 par la sonde. Ce paramètre peut être facilement déterminé en calculant le rapport des intensités de ces deux bandes révélées par coloration au nitrate d'argent (logiciel Biorad : Quantity-One®). Cette approche permet d'estimer un pourcentage de modification covalente de la hMMP-12 par notre sonde de l'ordre de 42 ± 5 %, un excellent résultat laissant présager une très bonne sensibilité de détection des formes actives de MMP-12 par cette sonde.

c) Seuil de détection

Afin de déterminer le seuil de détection de formes actives de hMMP-12 pouvant être atteint par notre sonde, différentes quantités de hMMP-12 (1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 et 0.005 ng) ont été incubées en présence d'une quantité constante de sonde ($2 \mu\text{M}$). Comme le montre la figure 2.3, après migration sur gel et analyse des membranes au β -imager, 50 pg de hMMP-12 peuvent être

Chapitre II : Développement d'une sonde radioactive pour une détection sensible des MMP

détectés grâce à cette sonde, soit un seuil de détection de 2.5 femtomoles de hMMP-12 (une concentration de 100 pM de hMMP-12).

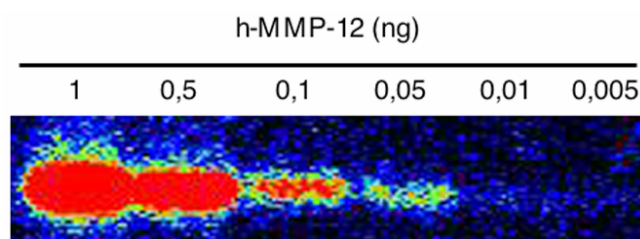


Figure 2.3 : Sensibilité de la sonde (2 μ M) pour détecter la hMMP-12 (de 2nM à 10pM).

4. Spécificité de la sonde vis-à-vis d'autres partenaires protéiques

Afin de confirmer la spécificité de notre sonde, des expériences de photoactivation ont été réalisées en présence de quelques protéases à zinc : l'ADAM-17 (TACE), l'ACE et la NEP. Ces enzymes ont été sélectionnées, car des études utilisant des inhibiteurs de type hydroxamate spécifiques des MMP ont révélé, contre toute attente, que de tels inhibiteurs pouvaient se comporter comme des inhibiteurs puissants de ces différentes protéases à zinc, non apparentées du point de vue structural aux MMP. Comme l'indiquent les résultats reportés dans la figure 2.4, une concentration de 1 μ M du composé 2 apparaît peu efficace pour radiomarquer 500 nM de ces protéases. La sérum albumine de

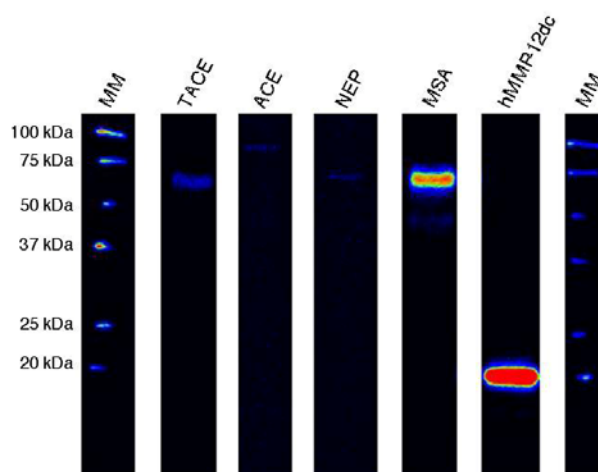


Figure 2.4 : Modification covalente de plusieurs protéases à zinc non apparentées à la famille des MMP détectée par analyse au β -imager et en comparaison de la modification covalente de la hMMP-12 dans les mêmes conditions expérimentales.

souris (MSA) a été aussi considérée dans ce test de spécificité, puisque que cette protéine est présente à très haute concentration dans certains échantillons biologiques, ce facteur pouvant permettre la formation de complexe sonde/albumine. Par ailleurs, nos travaux sur un certain nombre d'inhibiteurs phosphiniques, possédant notamment un résidu tryptophane, indiquent que ces inhibiteurs peuvent interagir avec ces protéines avec des constantes d'affinité de l'ordre du micromolaire. Dans nos conditions, pour lesquelles notre sonde est utilisée dans des gammes de concentration du microlaire à 50 nM, une formation de complexe sonde/albumine peut être attendue.

Cette hypothèse se trouve en partie vérifiée par le résultat reporté dans la figure 2.4, où l'on voit effectivement apparaître une bande de radioactivité associée à la présence de sérum albumine. Si le niveau de radioactivité observé pour la sérum albumine est 70 % inférieur à celui mesuré pour la hMMP-12, cette observation suggère que, dans un mélange complexe contenant de grande quantité de sérum albumine, un radiomarquage de cette protéine pourra être observé.

5. Discussion

Ces premiers résultats indiquent que la stratégie que nous avons choisie pour développer une sonde capable de détecter les formes actives de MMP s'avère extrêmement efficace, au moins pour la détection de la hMMP-12, puisque des seuils de détection de 50 pg ont pu être atteints pour cette MMP. Pour rappel, en développant des inhibiteurs capables de modifier de façon covalente des MMP, un seuil de détection de 3000 pg a été reporté par le groupe de B. Cravatt pour la MMP-2 (Saghatelian *et al.*, 2004), tandis qu'un autre groupe (Chan *et al.*, 2004) a pu obtenir un seuil de détection de 1000 pg pour la MMP-9. La sonde développée dans ce travail apparaît donc beaucoup plus sensible. La sélectivité de notre sonde apparaît aussi meilleure que celles reportées par les deux groupes mentionnés ci-dessus. La sonde développée par le groupe de B. Cravatt s'est en effet révélée être capable de modifier plusieurs protéases à zinc non-apparentées du point de vue structural aux MMP, en particulier la NEP. Nos expériences avec la NEP n'indiquent pas de radiomarquage de cette enzyme par notre sonde. Par ailleurs, les nombreuses études publiées sur la très bonne affinité des inhibiteurs de MMP de type hydroxamate vis-à-vis de l'ADAM-17, nous a conduit à tester cette enzyme, en observant là encore des résultats négatifs.

Concernant le seuil de détection atteint par les sondes photoactivables, il convient de noter que des comparaisons strictes restent difficiles à réaliser, puisque les cibles sont à chaque fois différentes. Il faut aussi relever que les groupes photoactivables mis en jeu dans ces études ne sont pas les mêmes, benzophénone dans le cas de l'étude de Saghatelian *et al.* et diazirine pour l'étude de Chan *et al.*. Dans cette dernière étude, il est fait mention que de meilleurs résultats ont été obtenus, dans le cas de la modification de la thermolysine, lorsque le dérivé diazirine est utilisé, en comparaison d'une benzophénone. On sait que les dérivés diazirines, par rapport aux

benzophénones, forment des espèces réactives ayant des temps de demi-vie extrêmement courts. Cette propriété favorise un type de modification unique entre le groupement photoactivable et les atomes de la cible se trouvant en général le plus près de ce groupement. Cette dernière propriété rend l'utilisation des dérivés diazirines préférables pour réaliser une topographie précise de sites des cibles concernées. En effet, à cause de durées de demi-vie beaucoup plus « longues » dans le cas des benzophénones, il a été reporté dans la littérature que ce type de groupement photoactivable pouvait modifier des résidus positionnés dans le complexe sonde/protéine relativement loin du site d'interaction du groupement photoactivable (Clement *et al.*, 2005; Clement *et al.*, 2006). Malgré ces commentaires, le choix quant aux meilleurs dérivés photoactivables à utiliser n'est jamais non-ambigu, puisque les contraintes de synthèse chimique et d'encombrement stérique doivent être aussi considérées lors de la conception de la sonde.

A cet égard, on peut mentionner que dans les études citées ci-dessus, l'incorporation de la sonde photoactivable a été réalisée essentiellement en prenant en compte les aspects de synthèse chimique et très peu en considérant les aspects structuraux des cibles. Notre travail est le seul à avoir conjugué ces différents aspects, en incorporant en particulier le groupement photoactivable dans la sonde dans une position impliquant l'interaction de ce groupe avec le sous-site S_1' . La meilleure sensibilité de notre sonde pourrait ainsi provenir de la nature des sites des MMP concernés par la modification covalente. En effet, dans les études mentionnées ci-dessus, le site de modification présumé des MMP concerne un site situé à l'interface de la protéine et du solvant (position P_2' pour les travaux de Saghatelian *et al.* et possiblement P_4' pour ceux de Chan *et al.* (Chan *et al.*, 2004; Saghatelian *et al.*, 2004). On peut donc supposer que, dans cette situation, le pourcentage de modification se trouve altéré par la présence de molécules d'eau en grande quantité, venant désactiver la sonde. Le

développement d'un modèle d'interaction avec un composé parent, nous a permis de mettre au point une sonde présentant une affinité de l'ordre du nanomolaire vis-à-vis de différentes MMP. La très bonne affinité de notre sonde nous autorisera à utiliser de faible concentration de celle-ci dans des mélanges complexes (50 nM). A cette concentration, compte tenu des constantes d'affinité reportées dans le tableau 2.1, une quasi-saturation des différentes MMP devrait être atteinte, tout en limitant la formation de complexes non-spécifiques avec notre sonde. Cette dernière remarque justifie les efforts de prise en compte de la structure des cibles protéiques envisagées.

Le recours à la radioactivité, plutôt qu'à la fluorescence, comme moyen de détection offre peut-être potentiellement une meilleure sensibilité, cependant l'utilisation de groupes possédant de très bons rendements quantiques de fluorescence, associés à de très bonnes caméras CCD, permet d'atteindre de très faibles seuils de détection. Pourtant des différences notoires existent entre ces approches. Les avantages de la radioactivité concernent l'absence de modification de la sonde par des groupements hydrophobes et volumineux, propriétés de nombreux groupements fluorescents. Cet avantage peut s'avérer décisif pour développer des inhibiteurs possédant les meilleures affinités possibles vis-à-vis des cibles concernées et développer des sondes possédant une relativement bonne solubilité dans l'eau. La présence de nombreux groupements hydrophobes dans une molécule flexible peut engendrer des conformations particulières de la sonde en solution aqueuse, dans lesquelles les groupements hydrophobes interagissent entre eux pour éviter un contact avec les molécules d'eau. De telles conformations peuvent favoriser des interactions non-spécifiques avec des sites hydrophobes présents à la surface des cibles protéiques. Mais de plus, l'interaction de ce type de sonde avec sa cible peut impliquer un coût énergétique, pour passer de la conformation stabilisée en solution à la conformation retenue à l'état lié, ce qui se traduit par une

diminution de l'affinité de la sonde. Un autre inconvénient associé à l'utilisation de la fluorescence concerne le bruit de fond que l'on peut observer lorsque des gels sont analysés par fluorescence. Cet artéfact provient du fait que les photons émis par le composé fluorescent peuvent être détectés à une certaine distance du composé émetteur, générant ainsi la présence d'un bruit de fond relativement « intense ». Dans le cas de la radioactivité, l'absorption complète du rayon β émis par le noyau tritium au delà de 3 microns de matière limite la présence d'un bruit de fond et donne par ailleurs une très bonne résolution de détection des spots de radioactivité. Cet avantage de la radioactivité dans le cas du tritium comporte néanmoins un inconvénient, qui se traduit dans l'obligation de transférer les protéines présentes dans le gel sur une membrane fine en nylon de type PVDF, l'épaisseur du gel (1 mm) interdisant toute détection de radioactivité tritium. Enfin, on peut citer en dernier avantage de la radioactivité, la possibilité de faire des observations quantitatives, sur plusieurs échelles de grandeur, permettant dans les cas favorables de calculer la quantité exacte de protéines radiomarquées ou bien de faire des comparaisons quantitatives entre différentes protéines radiomarquées. Dans le cas du tritium, on doit finalement retenir, que compte tenu de la durée de vie du rayonnement, les molécules préparées restent disponibles pour une dizaine d'années, un avantage, mais aussi une contrainte en terme de stockage de produit radioactif.

Au cours de cette étude avec la hMMP-12, nous avons pu de façon fortuite déterminer un pourcentage de modification covalente, grâce à la séparation sur gel SDS-PAGE des espèces de hMMP-12 intacte et modifiée par la sonde. Lorsque des groupes azotures sont utilisés pour développer des sondes de photoaffinité, la littérature considère que les limites supérieures de pourcentage de modification de la cible se situent vers 30% (Fleming, 1995). La détermination d'un pourcentage de modification de l'ordre de 42% dans le cas de notre sonde constitue donc un très bon résultat, à mettre au compte peut être

Chapitre II : Développement d'une sonde radioactive pour une détection sensible des MMP

de notre effort pour développer celle-ci sur des bases structurales, impliquant un site de liaison du groupement photoactivable dans une cavité profonde de la cible, à l'abri des molécules d'eau du solvant. Curieusement, dans les études publiées sur le développement de sondes photoactivables pour modifier de façon covalente des protéases à zinc, aucune mention n'est faite sur le pourcentage de modification. Pourtant, toute variation à la baisse de ce pourcentage contribuera à diminuer la sensibilité de la sonde. Dans le cas des MMP, même si le sous-site S_1' est relativement bien conservé (à l'exception de MMP-1 et MMP-7), il reste difficile de prédire quels seront les pourcentages de modification observés vis-à-vis des différents membres de cette famille. Les pourcentages de modification covalente peuvent non seulement être affectés par des différences faibles dans la composition des résidus de la cible situés à proximité du groupe photoactivable, mais aussi par des différences de mobilité de ces mêmes résidus. Ainsi, il semble impératif de ne pas perdre de vue ce paramètre dans le cas d'une utilisation de la sonde pour détecter des MMP différentes. Ces réflexions nous ont conduit à examiner l'efficacité de modification de notre sonde vis-à-vis d'autres MMP.

Chapitre III
Validation de la sonde pour la détection
des MMP *in vitro* et *ex vivo*

1. Evaluation *in vitro* de l'efficacité de la sonde à modifier diverses MMP

Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné une série de MMP en prenant comme critère de retenir un panel représentatif des MMP sous leurs différentes formes : domaine catalytique seul (MMP-11, -12 & -14), domaine catalytique en présence du domaine hémapexine (MMP-3 & -13) et domaine catalytique présentant l'insertion domaine fibronectine, en présence du domaine hémapexine (MMP-2 & MMP-9). Comme mentionné précédemment, la sonde présente des affinités de l'ordre du nanomolaire vis-à-vis de ce panel de MMP.

Pour évaluer la capacité de cette sonde à modifier de façon covalente ces différentes MMP, des expériences de photomarquage de 500nM de MMP ont été réalisées en présence d'1 μ M de sonde. Au préalable, l'ensemble des MMP soumises à ces travaux de thèse a été sujet à des expériences de titration en utilisant TIMP-1 comme inhibiteur très puissant, pour déterminer ainsi le nombre de sites fonctionnels de chacune. Les résultats présentés sur la figure 3.1 montre que dans l'ensemble on peut observer un signal de radioactivité pour les différentes MMP, à des positions sur la membrane correspondant aux poids

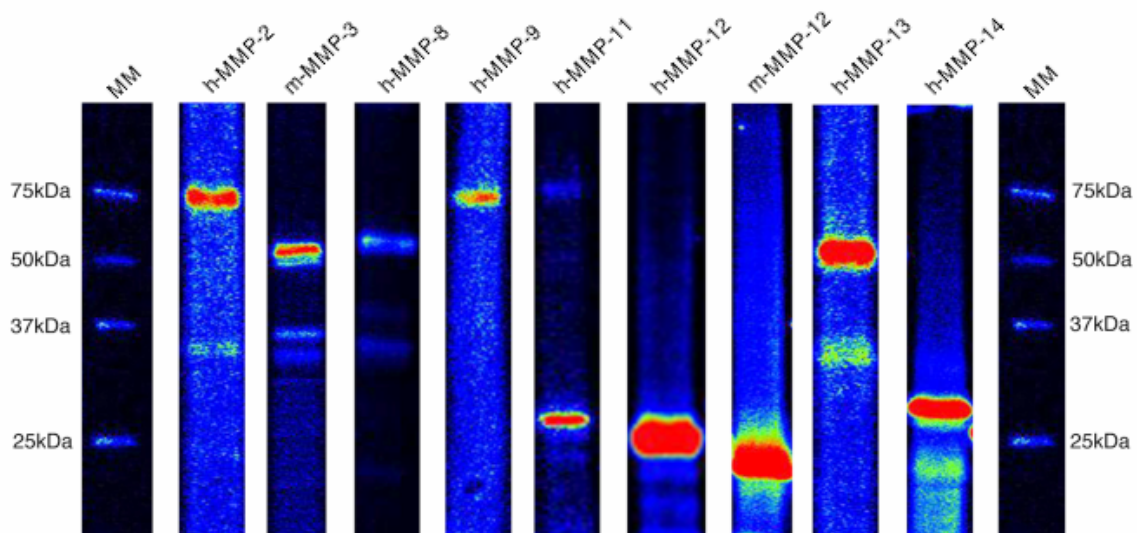


Figure 3.1 : Modification covalente de plusieurs MMP détectée par analyse au β -imager ; les quantités déposées sur SDS-PAGE en MMP sont de 100ng pour chaque MMP.

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

moléculaires attendus pour les différentes MMP examinées dans cette expérience.

En revanche, si l'on prend comme indice de pourcentage de modification covalente l'intensité des bandes radioactives, on peut constater que certaines MMP, notamment la MMP-3 et la MMP-8, présentent un taux d'incorporation de radioactivité plus faible comparé aux autres MMP. Des expériences de compétition avec un inhibiteur phosphinique ont été réalisées afin de démontrer, comme pour la MMP-12, que les incorporations de radioactivité constatées dans ces expériences correspondaient uniquement à la modification covalente du site actif de ces MMP, ce qui s'est révélé être le cas pour toutes ces MMP.

Les variations constatées sur l'intensité des bandes, à quantité molaire équivalente pour toutes les MMP, indiquent que les rendements de modification chimique par notre sonde dépendent de la nature des MMP mises en jeu (tableau 3.1). Tenant compte de la position du groupement photoactivable lorsque la sonde interagit avec le site actif des MMP, ce résultat suggère que de faibles variations dans la composition en acides aminés des différents sous-sites S_1' des MMP peuvent entraîner des modifications de rendement de photomodification.

Tableau 3.1 : Récapitulatif des pourcentages d'incorporation déterminés pour les MMP par rapport à celui observé pour la hMMP-12 en coloration au nitrate d'argent.

MMP	h-2	m-3	h-8	h-9	h-11	h-12	m-12	h-13	h-14
% _{incorp.}	24	5	1	15	11	42	19	35	19

a) Modification de la MMP-12 murine

Afin de conforter nos conclusions sur l'influence de la nature des sous-sites S_1' des MMP sur les rendements de photomodification, nous avons étudié une MMP présentant la plus grande analogie de séquence et de structure avec la

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

hMMP-12. Pour ce faire nous avons choisi la forme murine de la MMP-12, qui présente 60% d'identité de séquence avec la forme humaine. Il s'avère intéressant de noter que six acides aminés varient dans la séquence de la boucle S₁' entre les MMP-12 humaine et murine (figure 3.2). Sous des conditions parfaitement identiques, la figure 3.2 démontre que les rendements de photomodification varient là encore entre ces deux MMP, confirmant donc que de faibles changements dans la structure des sites des protéines ciblées par le groupement photoactivable peuvent altérer l'efficacité de la modification chimique.

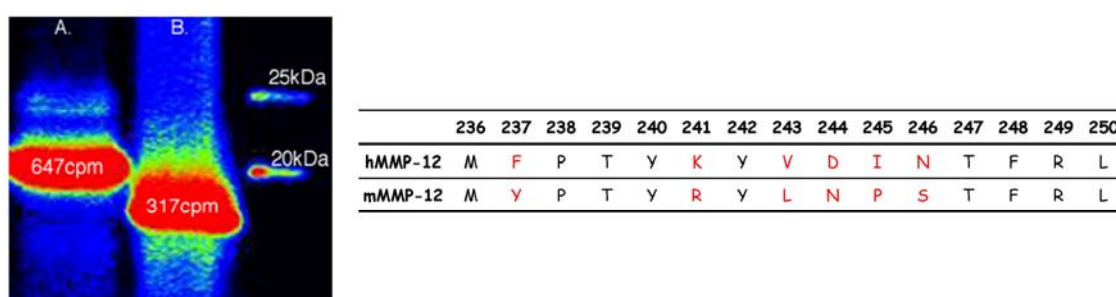


Figure 3.2 : Comparaison de la modification covalente des MMP-12s humaine (piste A) et murine (piste B), à gauche ; la tableau sur la droite illustre les variations de séquences (en rouge) entre les MMP-12 humaine et murine.

b) Influence du prodomaine sur l'efficacité de la sonde

Les résultats reportés dans la figure 3.3 sur la MMP-3 démontrent que la présence du prodomaine empêche toute incorporation de radioactivité, ce qui nous permet de conclure que la sonde développée ne détecte que les seules formes actives des MMP possédant un site actif parfaitement accessible.

En revanche, des formes de MMP dont le site actif est occupé soit par un prodomaine (proforme), soit par un inhibiteur (du type TIMP) ne seront pas détectées par cette sonde.

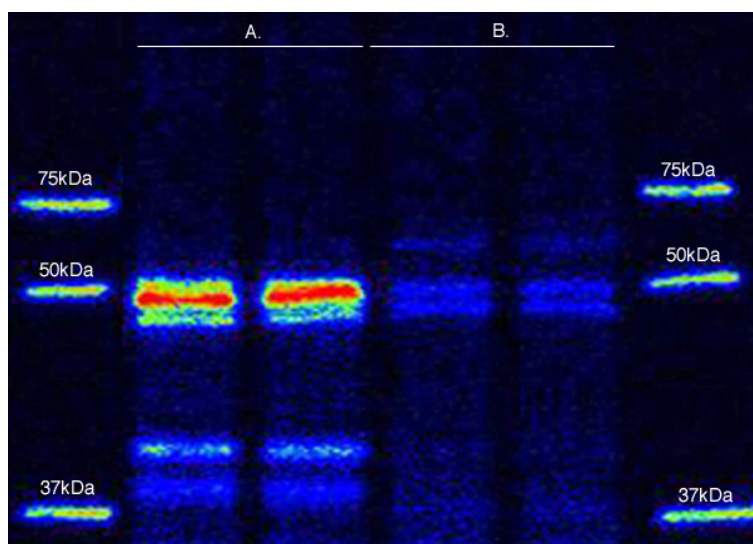


Figure 3.3 : Influence du prodomaine sur la modification covalente : cas de la mMMP-3. 500 nM de MMP-3 (proforme ou forme activée) ont été photoirradiés en présence de 1 μ M de composé 2. A, photoirradiation de la mMMP-3 ; B, photoirradiation de la pro-mMMP-3.

2. Evaluation de l'efficacité de la sonde à modifier des MMP sous forme active en présence de broyat tumoral

Les objectifs finaux de cette étude étant de pouvoir être capable à l'aide de notre sonde de détecter des formes actives de MMP dans différents fluides biologiques ou extraits de tissus, il était impératif de démontrer que notre sonde avait la capacité de modifier une MMP, même dans le contexte d'un mélange très complexe, pouvant contenir des protéines variées, dont certaines présentes en très grande quantité.

a) Stabilité d'un complexe hMMP-12/sonde dans un broyat tumoral

Pour aborder cette question, la première expérience envisagée avait pour but de tester la possibilité de détecter la radioactivité d'un complexe MMP-12/sonde mis en présence d'un extrait de broyat tumoral. En effet, cette observation suppose que le complexe hMMP-12/sonde soit stable dans ces conditions, c'est-à-dire en présence d'un mélange complexe susceptibles de

contenir différents types de protéases. La figure 3.4.A illustre le type de spot de radioactivité que l'on peut observer lorsque l'on soumet un complexe hMMP-12/sonde préalablement photoactivé à une électrophorèse bidimensionnelle (1 μM de hMMP-12 photoactivée en présence de 2 μM de sonde).

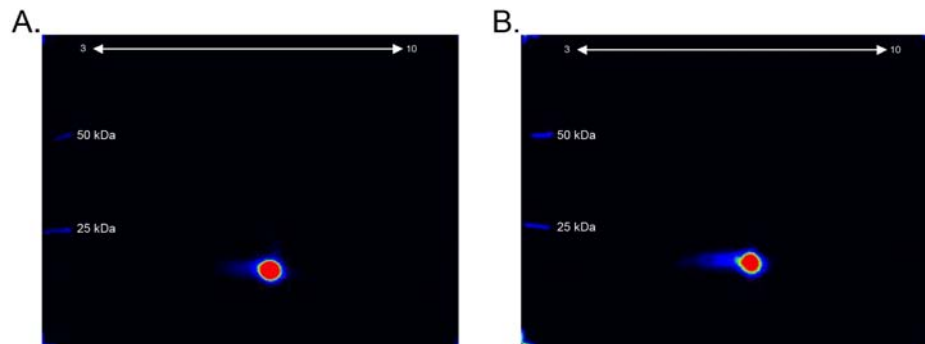


Figure 3.4 : Electrophorèses bidimensionnelles du complexe hMMP-12/sonde (A) et hMMP-12/sonde en présence de broyat (B).

Lorsque la même quantité de complexe radioactif est mis en présence de 10 μg de protéines issues de broyat tumoral pendant une durée de 10 minutes, l'analyse de cet échantillon par électrophorèse 2D indique que 70% de la radioactivité mesurée dans l'expérience contrôle est observée dans l'échantillon mis en présence de broyat tumoral (figure 3.4.B). Ce résultat valide la possibilité d'observer, au moins pour la hMMP-12, des complexes MMP/sonde dans des mélanges complexes.

b) Sensibilité de détection de la hMMP-12 au sein d'un broyat tumoral

Notre démarche s'est poursuivie pour vérifier s'il était possible de réaliser la photoactivation par notre sonde d'une quantité connue de hMMP-12 (10 ng) au sein d'un broyat tumoral (10 μg), puis de vérifier si notre sonde pouvait conserver ces propriétés de modification covalente vis-à-vis de la MMP-12 exogène. La figure 3.5 démontre qu'il est effectivement possible d'observer un spot de radioactivité à la position attendue pour la hMMP-12, indiqué pour chaque figure par une flèche jaune, ainsi qu'un ensemble d'autres spots représentatifs

des protéines endogènes de la tumeur qui sont modifiées de façon covalente par notre sonde.

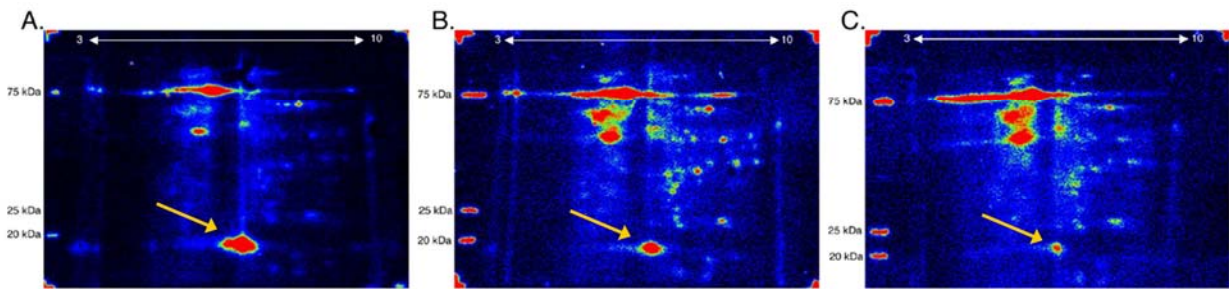


Figure 3.5 : Sensibilité de détection par 50 nM de sonde de la hMMP-12 au sein d'un broyat tumoral ;
A, 10 ng de hMMP-12 photoirradiée en présence de 10 μ g de broyat tumoral ;
B, 1 ng de hMMP-12 photoirradiée en présence de 10 μ g de broyat tumoral ;
C, 100 pg de hMMP-12 photoirradiée en présence de 10 μ g de broyat tumoral.

Cette expérience s'est poursuivie en diminuant les quantités de hMMP-12 rajoutées au broyat tumoral, soit 1 et 0.1 ng de hMMP-12, respectivement. Comme l'illustre la figure 3.5, dans toutes ces expériences, la sonde est capable de détecter et de modifier de manière covalente la hMMP-12. Par ailleurs, on peut noter que cette approche débouche sur une modalité de détection extrêmement sensible de la hMMP-12 active dans un mélange complexe, puisque 5 femtomoles de hMMP-12 peuvent être facilement observées dans ces conditions. Cette quantité minimale de hMMP-12 exogène détectable par la sonde équivaut à 0,001 % de la quantité totale de protéines de l'extrait tumoral.

c) Modification de MMP en mélange

Un autre point à prendre en considération pour la validité de notre approche concernait la possibilité effective de notre sonde à pouvoir modifier simultanément toutes les MMP pouvant être présentes dans un mélange donné. Pour écarter toute possibilité de biais expérimental pouvant exister dans ces conditions, nous avons testé le comportement de notre sonde lorsque celle-ci se trouve en présence d'un mélange de quatre hMMP (MMP-2, -9, -12 & -13). La figure 3.6.A indique qu'au moins trois spots de radioactivité peuvent être

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

aisément attribués au radiomarquage de la hMMP-2, -12 et -13, montrant ainsi la capacité de la sonde à cibler et modifier des MMP en mélange.

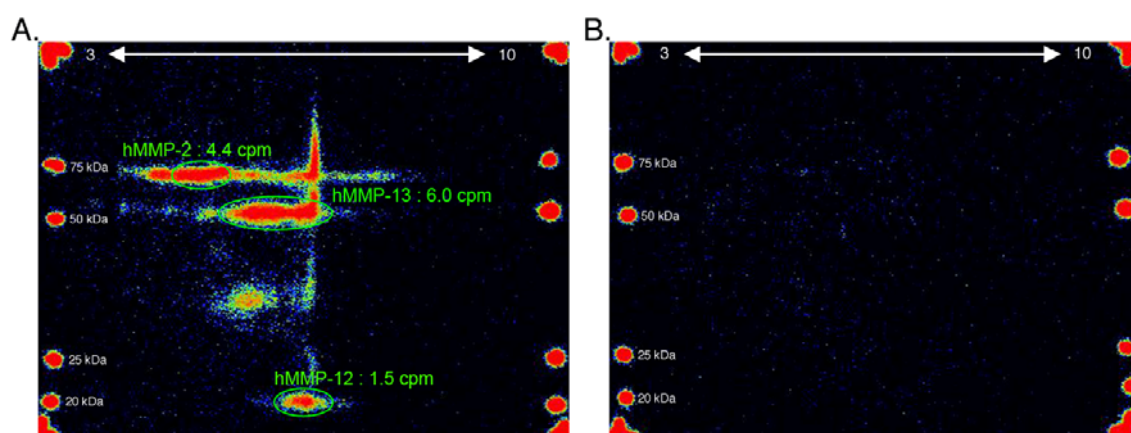


Figure 3.6 : A, Photoactivation en mélange de 4 hMMP recombinantes en présence de 50 nM de la sonde ; les quantités des hMMP ont été choisies selon le pourcentage de modification observé individuellement ; ces quantités sont de 100 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng pour la hMMP-9, la hMMP-2, la hMMP-13 et la hMMP-12 respectivement. B, même expérience en présence de 5 μ M LD-243, un inhibiteur puissant et spectre large des MMP.

Le signal résultant de la modification de la hMMP-9 n'est pas facilement repérable dans cette expérience. Ceci nous a conduit à réaliser des expériences de photoactivation de hMMP-2 (figure 3.7.A) et hMMP-9 (figure 3.7.B), traitées séparément et analysées tour à tour par électrophorèse 2D.

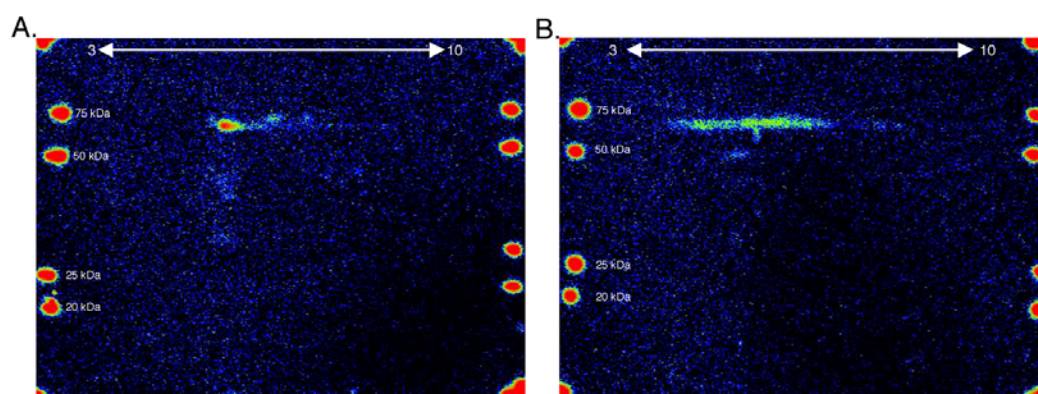


Figure 3.7 : Cartographie des gélatinases sur électrophorèse 2D; A, hMMP-2 (20 ng, 15 nM) en présence de 50 nM de la sonde ; B, hMMP-9 (50 ng, 38,5 nM en présence de 50 nM de la sonde).

Ces expériences rejoignent les observations faites ci-dessus et confirment que le traitement de ces hMMP conduit à l'observation de spots de radioactivité,

bien défini dans le cas de la hMMP-2, mais s'étalant sur une gamme de points isoélectriques dans le cas de la hMMP-9, générant pour cette MMP une traînée de radioactivité diffuse, au lieu d'un spot de radioactivité très bien défini. Cette dernière remarque sur la hMMP-9 explique la difficulté à repérer facilement le radiomarquage de la hMMP-9 par notre sonde dans le cas de mélange complexe par analyse sur des gels d'électrophorèse 2D. L'existence de tels spots s'étalant sur plusieurs valeurs de point isoélectrique suggère que les lots de hMMP-9 que nous manipulons présentent des modifications post-traductionnelles hétérogènes, reflétant probablement l'existence d'une grande hétérogénéité quant à la nature des sucres modifiant cette protéine (existence de plusieurs isoformes pour la hMMP-9). Un autre résultat étonnant concerne le fait que la hMMP-2 et la hMMP-9 migrent à des positions de poids moléculaire identiques. Cette observation est inattendue dans la mesure où l'activation de ces enzymes, après clivage du prodomaine, génère normalement des bandes situées à des poids moléculaires de 66 kDa pour la hMMP-2 et de 82 kDa pour la hMMP-9. L'observation de poids moléculaire similaire entre ces deux hMMP, après activation de ces enzymes, suggère que, dans le cas de la hMMP-9, notre procédure d'activation par l'APMA entraîne certainement aussi une autolyse du domaine hémopexine, pouvant générer une espèce migrant vers 65 kDa. L'existence de cette forme de hMMP-9 a déjà été reportée dans la littérature, notamment dans le cas d'une activation à l'APMA (Murphy *et al.*, 1995).

Lorsque les hMMP-2, -9, -12 et -13 en mélange sont préalablement mis en présence d'un inhibiteur puissant des MMP (LD-243 ; 5 μ M ; schéma 3.1), suivi par une photoactivation et une électrophorèse 2D, l'analyse des membranes par le radioimageur indique dans ce cas une complète extinction du signal de radioactivité (figure 3.6.B). Ce résultat démontre que l'incorporation de radioactivité dans ces hMMP ne concerne que le site actif de ces enzymes,

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

validant ainsi l'utilisation de cette sonde pour mettre en évidence uniquement la présence de formes actives des MMP.

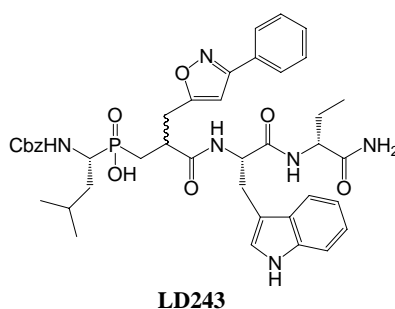


Schéma 3.1 : Structure du LD-243, inhibiteur puissant à spectre large des MMP.

d) Modification de MMP en mélange en présence de broyat tumoral

Les mêmes expériences que celles présentées ci-dessus, mais cette fois-ci en ajoutant les quatre hMMP à un broyat tumoral avant d'ajouter la sonde, indiquent là encore que notre sonde est capable de cibler les hMMP lorsque celles-ci sont présentes dans un mélange complexe (figure 3.8.A). L'expérience de compétition avec l'inhibiteur LD-243 entraîne comme attendu l'extinction de la radioactivité associée aux spots représentatifs de la hMMP-2, -12 et -13,

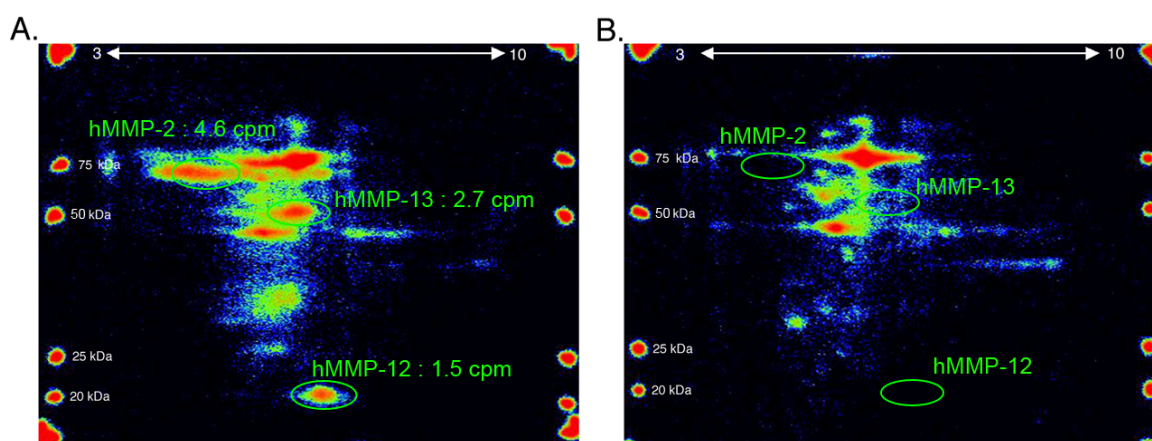


Figure 3.8 : A, Photoactivation en mélange de 4 hMMP recombinantes en présence de 10 µg de protéines issues de broyat tumoral et de 50 nM de la sonde ; B, même expérience en présence de 5 µM LD-243.

N.B. : Les quantités des MMP ajoutées au broyat tumoral sont de 100 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng pour la hMMP-9, la hMMP-2, la hMMP-13 et la hMMP-12 respectivement.

l'effet sur la hMMP-9 restant difficile à cerner à cause des remarques faites ci-dessus (figure 3.8.B).

L'ensemble des expériences reportées dans ce chapitre permet de valider la capacité de notre sonde à pouvoir détecter la présence de formes actives de MMP dans un contexte de mélange complexe. Ce résultat nous a conduit à nous intéresser à la nature des protéines modifiées, lorsque notre sonde est utilisée pour traiter un broyat tumoral.

e) Analyse des protéines d'un extrait tumoral modifiées par la sonde

Les expériences de radiomarquage par la sonde d'extraits de tumeur révèlent qu'un nombre limité de protéines apparaissent être les cibles de notre sonde, celles-ci étant situées entre 45 et 75 kDa (figure 3.8). Afin d'affiner ce résultat, nous avons réalisé des gels 2D permettant d'obtenir une meilleure lisibilité des taches de radioactivité observées dans cette zone. Ainsi, nous avons remplacé nos conditions classiques d'électrophorèse 2D, incluant un pourcentage d'acrylamide de 12 % et une gamme de points isoélectriques allant de 3 à 10 unités de pH, par un pourcentage d'acrylamide de 7.5 % et une gamme de points isoélectriques allant de 4 à 7 unités de pH. En absence d'ajout de MMP exogènes, ces conditions d'expériences laissent apparaître une traînée radioactive de forte intensité, située vers 75 kDa, et une série de spots de radioactivité bien focalisés au-dessus et en-dessous de 50 kDa (figure 3.9.A).

Le traitement préalable de cet échantillon de tumeur par un inhibiteur puissant, large spectre des MMP (LD-243 ; 5 μ M), avant l'addition de la sonde et sa photoactivation, entraîne une réduction de l'intensité des spots de radioactivité, mais pas d'extinction complète de la traînée radioactive située vers 75 kDa. Les zones montrant des réductions de radioactivité sont signalées par des flèches jaunes sur la figure 3.9.B.

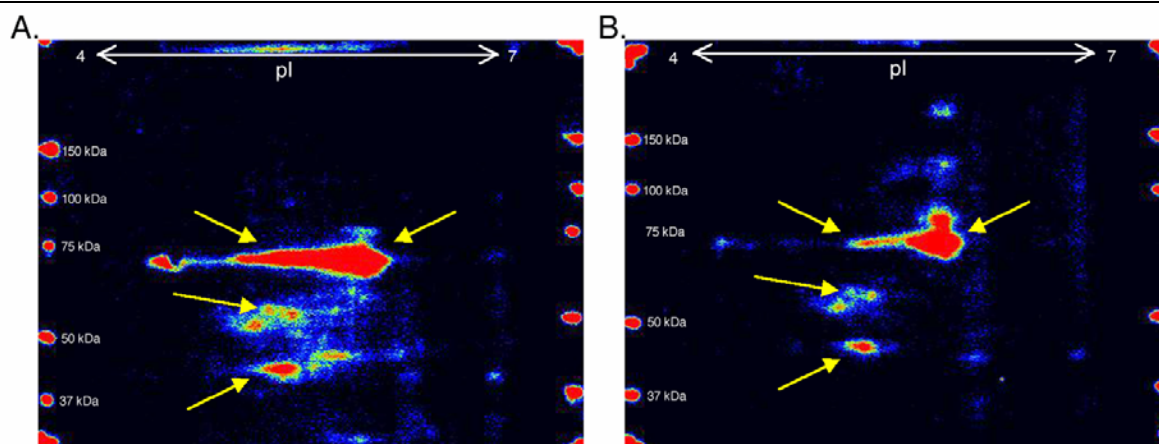


Figure 3.9: A, Analyse des protéines d'un extrait tumoral modifiées par la sonde en électrophorèse 2D. B, même expérience en présence de 5 μ M LD243.

Sur la base de cette expérience de compétition, nous pouvons conclure que le broyat tumoral contient quelques formes actives de MMP, qu'il pourrait être intéressant d'identifier formellement. Notre première intention pour l'identification formelle de ces MMP fut de recourir à la spectrométrie de masse. Cependant, en s'appuyant sur l'intensité des spots de radioactivité observés entre broyat tumoral et broyat tumoral auquel une MMP exogène est ajoutée, nous avons pu rapidement nous convaincre que dans notre échantillon tumoral (10 μ g), la quantité de MMP radiomarquées était extrêmement faible. En effet, sur la base de l'intensité de radioactivité observée lorsqu'on ajoute 10 ng de hMMP-12 (soit 0.5 pmoles de protéines) à un broyat tumoral, on peut estimer que l'ensemble des protéines endogènes de la tumeur radiomarquées doit représenter une quantité de protéines de l'ordre de 0.5 pmoles en totalité. Ces quantités de protéines dans le gel interdisent le recours à la spectrométrie de masse pour identifier la nature des MMP ou des protéines radiomarquées. En effet, ce type d'analyse requiert de disposer d'au moins une picomole de protéine par spot, sous forme pure dans le gel.

Ce constat nous a conduit à recourir à une approche indirecte pour préciser la nature des MMP présentes dans le broyat. La position des spots de

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

radioactivité, notamment la position de la traînée de radioactivité, vers 75 kDa, peut laisser supposer que notre échantillon de tumeur pourrait contenir des MMP sous forme active, de haut poids moléculaire, c'est à dire des gélatinases, soit la MMP-2 et la MMP-9. Pour étayer cette hypothèse de travail, nous avons analysé nos échantillons de tumeurs par zymographie 1D, en utilisant des gels contenant de la gélatine, une protéine substrat particulièrement bien dégradée par les MMP-2 et MMP-9. Les résultats reportés dans la figure 3.10.A indiquent la présence de bandes intenses de protéolyse de la gélatine, situées vers 100 kDa et 62 kDa, et une faible bande de lyse vers 57 kDa. L'incubation des gels dans une solution contenant 1 μ M d'inhibiteur puissant des MMP (LD-243), avant l'étape d'hydrolyse de la gélatine, réduit de façon importante la présence des bandes de lyse. Ce résultat constitue une forte indication que les protéases responsables de cette lyse de la gélatine sont des MMP, du type MMP-2 et MMP-9 (Figure 3.10.B).

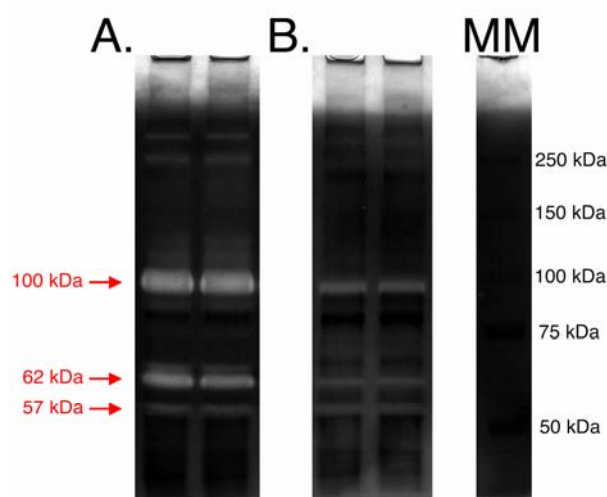


Figure 3.10 : Zymographie gélatine 1D d'un extrait tumoral (50 μ g) ;
A, digestion gélatinolytique à 37°C pendant 48 h ;
B, même expérience en présence de 1 μ M de LD-243.

La technique de zymographie gélatine est extrêmement sensible et constitue une approche de choix pour détecter de façon simple la présence de MMP-2 et MMP-9, en faible quantité dans des échantillons complexes.

Cependant, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, cette technique souffre d'un biais expérimental majeur, en particulier pour le type de projet qui nous intéresse, puisqu'elle permet d'accéder à la quantification de toutes les formes de MMP-2 et MMP-9, aussi bien les formes actives qu'inactives, pouvant être présentes dans un échantillon complexe. Ce biais provient de l'étape de dénaturation au SDS des échantillons avant la migration des protéines dans le gel, étape conduisant à la dissociation du prodomaine du site actif de l'enzyme, générant ainsi une forme de l'enzyme de haut poids moléculaire contenant encore le prodomaine, mais douée d'activité. De même, tous les complexes MMP/TIMP sont dissociés par la dénaturation de l'échantillon, produisant une forme active de MMP détectable en zymographie ; la présence du SDS durant l'électrophorèse maintient en effet les protéines sous leurs formes dénaturées. En conséquence de ce biais expérimental, les résultats d'une zymographie doivent être interprétés avec précaution, surtout lorsqu'il s'agit de conclure à la présence de formes actives de MMP-2 et MMP-9 dans l'échantillon d'intérêt, avant l'étape de dénaturation.

Ces mises en garde faites, certaines hypothèses peuvent être proposées pour expliquer nos observations en zymographie. La bande de plus haut poids moléculaire située vers 100 kDa pourrait être attribuée à la mMMP-9, sous sa proforme. Les données de la littérature indiquent un poids moléculaire apparent sur gel d'électrophorèse de 92 kDa pour la forme humaine de MMP-9, une protéine de 688 résidus qui devrait avoir un poids moléculaire théorique de 76240 Da. Cet écart provient de la présence de nombreux sites glycosylés dans cette enzyme. Cette forme glycosylée conduit, après activation, à l'observation d'une bande située vers 82 kDa. Des études indiquent que la forme murine est plutôt observée vers 103 kDa en gel d'électrophorèse, une donnée étayant notre suggestion que la bande observée en zymographie vers 100 kDa représente la proforme de la mMMP-9. Pour ce qui concerne l'observation des bandes de lyse

situées vers 57 et 62 kDa, les données de la littérature indiquent que la MMP-2 humaine est observée en gel d'électrophorèse vers des poids moléculaires de 72 et 66 kDa, pour la proforme et la forme activée, respectivement. Mais là encore, des données de la littérature reportent des valeurs de 64 et 57 kDa pour les formes murines de MMP-2 (proforme et forme active). Ainsi, sur ces bases, on pourrait donc conclure, que les données de zymographie sont en accord avec la présence dans notre broyat tumoral de pro-mMMP-9 (100 kDa) et de mMMP-2 sous forme pro et active (62 et 57 kDa).

f) Analyse par zymographie 2D du broyat tumoral

Afin de pouvoir mieux comparer nos données de zymographie 1D avec celles provenant de notre sonde radioactive sur gels 2D, nous avons analysé le broyat tumoral par zymographie 2D. Comme l'illustre la figure 3.11, les données en zymographie 2D reproduisent celles observées en zymographie 1D, avec seulement deux différences notoires. La bande observée en zymographie vers 100 kDa apparaît très diffuse et une légère bande de lyse apparaît vers 72 kDa.

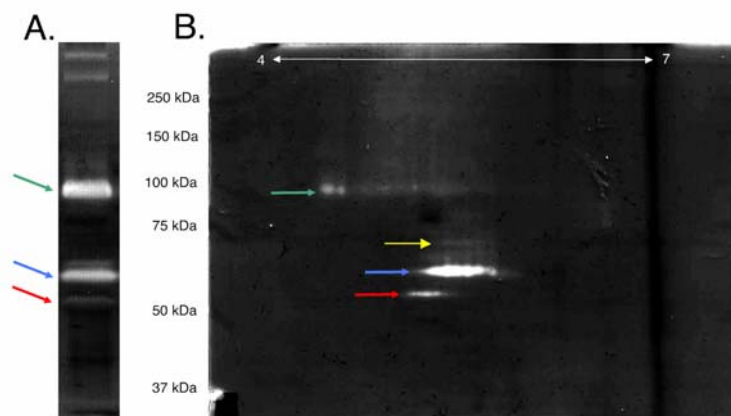


Figure 3.11 : Comparaison des zymogrammes gélatine 1D (A) et 2D (B) d'extraits de tumeur ; les flèches indiquent les activités gélatinolytiques à 100 kDa (vert), 62 kDa (bleu) et 57 kDa (rouge) ; la flèche jaune indique la bande à 72kDa.

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

En comparant les données des gels 2D obtenus par zymographie et par traitement avec notre sonde (figure 3.12), les conclusions suivantes peuvent être faites quant à la nature des protéines observées aux différents poids moléculaires (récapitulatif dans le tableau 3.2) :

100 kDa : on observe un signal de zymographie, mais pas de radiomarquage par la sonde. Ces données sont donc compatibles avec la présence d'une proforme de MMP, attribuable à la pro-mMMP-9, compte tenu du poids moléculaire observé.

62 kDa : les mêmes remarques faites pour la bande à 100 kDa s'appliquent, et sont donc compatibles avec la présence de pro-mMMP-2.

57 kDa : les résultats sont positifs en zymographie et en radioactivité, ces résultats concordent avec une présence de MMP-2 sous forme active.

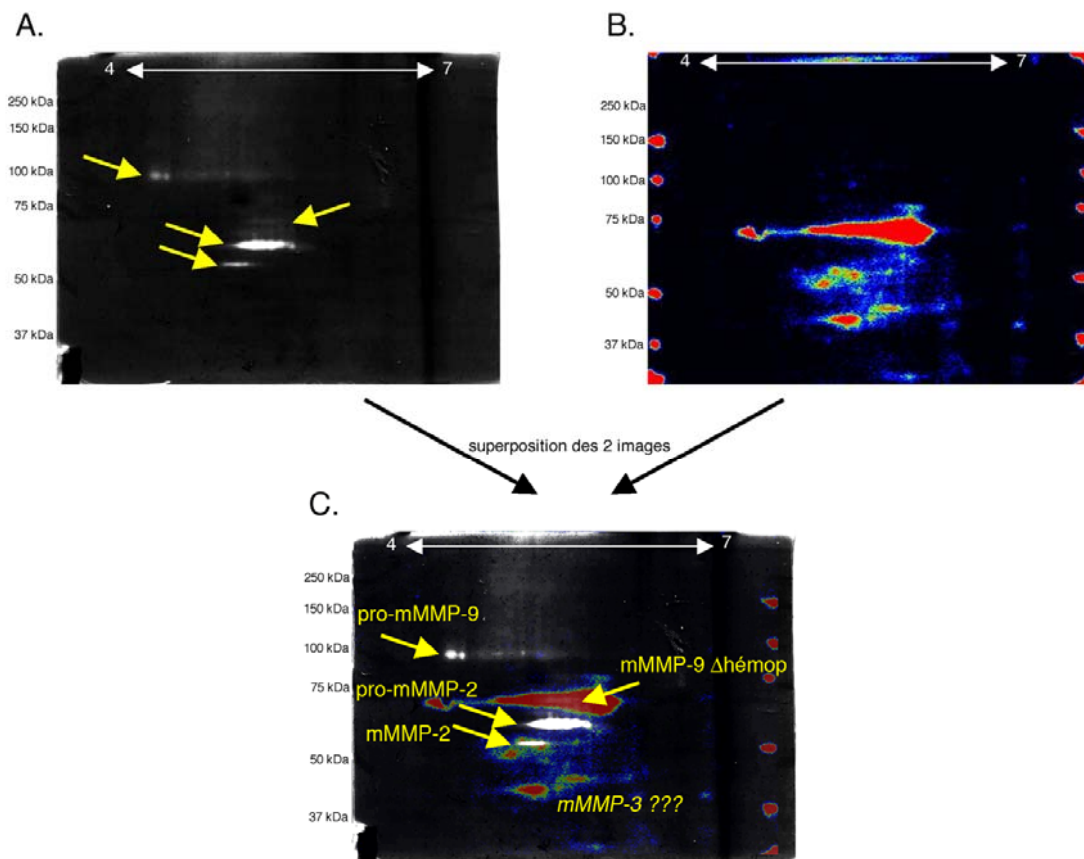


Figure 3.12 : Comparaison des électrophorèses 2D : zymogramme de 500 µg de protéines d'extrait tumoral (A) et analyse au β-imager de 10 µg du même extrait tumoral traité par la sonde (B) ; superposition de ces deux résultats pour l'attribution des spots (C).

72 kDa : un faible signal est observé en zymographie, par contre un signal intense est observé en radioactivité. Le signal de radioactivité indique qu'il s'agit d'une forme active de MMP, donc sur cette base différents complexes avec les TIMP, bloquant le site actif, peuvent être exclus. Par ailleurs, cette bande ne peut pas représenter la MMP-2, puisque nous suggérons que la MMP-2 est représentée par la bande à 57 kDa. Dans cette gamme de poids moléculaire, une forme de MMP-9 active ayant perdu son domaine hémapexine peut être proposée. Cependant, il convient de noter que les expériences de compétition reportées dans la figure 3.9 indiquent la présence, dans cette gamme de poids moléculaire, de protéines qui sont radiomarquées dans ces conditions. Ces protéines ne peuvent donc être considérées comme appartenant à la famille des MMP. Compte tenu de nos observations de radiomarquage de la sérum albumine de souris par notre sonde et du poids moléculaire de cette protéine, nous pouvons interpréter nos données comme reflétant la présence de sérum albumine dans notre échantillon, voire des protéines du cytosquelette telles que l'actine et le tubuline, puisque, suite à des expériences de spectrométrie de masse, ces deux protéines du cytosquelette se sont montrées majoritaires.

45 kDa : aucun signal de zymographie n'est observé, mais un signal de radioactivité est détecté. Plusieurs possibilités existent, puisque de nombreuses MMP, sous forme active, possèdent des poids moléculaires équivalents et ne possèdent pas de capacité à dégrader de la gélatine. La MMP-2 sous forme active, mais sans domaine hémapexine, possède également un poids moléculaire correspondant à cette valeur. Ces remarques s'appliquent aussi au spot radioactif situé légèrement au-dessus du spot à 45 kDa, mais ayant un pI légèrement plus basique.

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

Tableau 3.2 : Récapitulatif des protéines observées en zymographies 1D et 2D et en électrophorèse 2D avec analyse en radioactivité.

Poids moléculaire	Zymographie 1D	Zymographie 2D	Radioactivité 2D	MMP
100 kDa	++++	diffus	-	pro-mMMP-9
72 kDa	-	+	++++	mMMP-9 (Δ hémop)
62 kDa	+++	+++	-	pro-mMMP2
57 kDa	+	++	++	mMMP-2
45 kDa	-	-	++	mMMP-3 ???

à 72 kDa, il s'agit de mMMP-9 ayant perdu le domaine hémopexine.

N.B. : il est important de noter que d'après la littérature, la gélatinase B (MMP-9) de souris peut être présente sous différentes formes dont les poids moléculaires apparents sont les suivants : la pro-mMMP-9 103 kDa, la mMMP-9 active 90 kDa et la mMMP-9 active ayant perdu le domaine hémopexine 76 kDa ; et la gélatinase A (MMP-2) de souris : pro-mMMP-2 64 kDa et les formes actives de mMMP-2 57 & 59 kDa.

3. Discussion

Les expériences de photoactivation réalisées avec notre sonde sur un panel de MMP démontrent sa capacité à modifier de façon covalente les cibles considérées. Ces résultats nous permettent de conclure que nous avons développé une sonde probablement apte à détecter tout type de MMP, excepté la MMP-1 et la MMP-7. Sur la base d'expériences menées sur quelques protéases à zinc, notre sonde apparaît douée d'une meilleure spécificité que les sondes ayant été développées par d'autres groupes. Ce résultat valide l'intérêt de cette sonde pour détecter dans des mélanges complexes la présence de MMP sous forme active, sans être gêné par l'observation de nombreux signaux de radioactivité, masquant les signaux propres aux MMP. Ces conclusions sont renforcées par l'analyse des gels 2D correspondant au traitement de broyats tumoraux par notre sonde. En effet, ces gels montrent qu'un nombre discret de protéines sont modifiées par la sonde, conduisant à l'observation d'une dizaine de spots de radioactivité. Par ailleurs, les expériences de compétition avec un inhibiteur de MMP sont en accord avec le fait que parmi les protéines modifiées figure un certain nombre de MMP. Un seul spot de radioactivité semble provenir d'un radiomarquage non désiré, pouvant correspondre à la modification de la sérum albumine par la sonde. Il ne s'agit peut être pas d'un radiomarquage non-spécifique, dans la mesure où l'interaction de peptides phosphiniques, possédant notamment un résidu tryptophane, avec la sérum albumine semble être une propriété assez général à cette sous-famille de composés. Des constantes d'affinité de 1 à 0.5 μM pour la sérum albumine ont été déterminées pour certains composés phosphiniques. L'interaction de ces composés semble impliquer le site particulier de l'albumine, connu pour sa capacité à lier à haute affinité le tryptophane. L'ensemble de ces remarques convergent toutes donc pour attribuer à notre sonde une qualité de détection relativement spécifique des formes actives de MMP.

Vis-à-vis des questions de sélectivité évoquées ci-dessus, il convient de noter que la très bonne affinité de notre sonde (sub-nanomolaire et nanomolaire), nous a permis de baisser sa concentration dans les expériences de photoactivation de mélanges complexes. En effet, 50 nM de sonde dans ces expériences permet d'une part d'assurer une quasi-saturation des MMP présentes (80 à 98 %, suivant les valeurs de K_i), et d'autre part de minimiser les interactions non spécifiques. Cette remarque ne s'applique que pour les protéines étant en concentration largement inférieure à la sonde dans le mélange complexe. Dans cette perspective, le maximum d'efforts doit être consenti dans la conception de la sonde, afin de déboucher sur le développement de sonde de haute affinité. La disponibilité des structures tridimensionnelles de la plupart des MMP constituait un atout certain dans ce projet, que nous avons pu valoriser en prenant soin de développer un modèle d'interaction de composés d'intérêt pour guider la conception finale de notre sonde.

Les résultats reportés dans la figure 3.1 nous fournissent aussi une indication sur les rendements de modification covalente de la sonde vis-à-vis des différentes MMP. La normalisation de ces données sur une base molaire, nous a permis d'estimer les pourcentages de modification covalente reportés dans le tableau 3.1. Ces données indiquent que ces pourcentages varient d'un ordre de grandeur selon la MMP, les MMP-3 et -8 montrant les plus faibles rendements de modification (5 et 1 % respectivement), tandis que des pourcentages de 42 à 35 % sont observés respectivement pour les MMP-12 et -13. Il existe donc une variabilité d'un ordre de grandeur dans la sensibilité de notre sonde à détecter les MMP. Ce paramètre devra donc être pris en compte pour interpréter correctement les résultats issus des expériences de photoactivation des broyats tumoraux (voir ci-dessous). La variabilité des pourcentages de modification covalente observée pour les MMP peut être mise au compte de la présence de boucles S_1' de taille et de séquence variable dans ces protéases. En effet, comme

exposé dans l'introduction, cette boucle « hypervariable » borde la partie externe de la cavité S_1' , dans laquelle vient se loger le groupe azoture de notre sonde. Par ailleurs, cette même boucle S_1' possède probablement une forte mobilité en solution. L'ensemble de ces éléments suggèrent que si les résidus de la boucle sont ceux modifiés par le groupement nitrène (intermédiaire réactif formé après photoactivation de l'azoture), on pourrait concevoir alors que chaque MMP puisse être modifiée de manière différente par notre sonde et ce avec des rendements variables de modification chimique. Les résultats reportés entre MMP-12 humaine versus murine s'accordent avec cette proposition. Dans ce cas là, la taille de la boucle est conservée entre ces deux MMP d'espèce différentes, par contre 6 résidus de cette boucle diffèrent entre les séquences humaine et murine (figure 3.2). De plus, les MMP-12 se caractérisent par une boucle S_1' de grande taille, possédant 2 résidus supplémentaires par rapport à la MMP-2, par exemple. La hMMP-12 a fait l'objet d'une étude en RMN confirmant la présence d'une forte flexibilité au niveau des résidus présents dans cette boucle (Bertini *et al.*, 2005). Cette flexibilité, associée à une variabilité de séquence, pourrait expliquer les écarts de rendement de modification covalente déterminé pour ces deux MMP. Ces différences de séquence discrètes au niveau de la boucle S_1' entre formes murine et humaine peuvent-elles expliquer les différences de mobilité électrophorétique observées entre les formes modifiées de ces enzymes ? A ce propos, il est à noter que seule la hMMP-12 présente des différences de mobilité entre forme intacte et modifiée en électrophorèse. Cette observation reste difficile à expliquer, même si un tel résultat pourrait théoriquement être attendu. En effet, le différentiel de masse observé entre forme intacte et forme modifiée ($\Delta \sim 750$ Da) pourrait s'accorder avec l'attachement covalent de l'inhibiteur (MM = 776 Da) à la hMMP-12. Dans cette perspective, le résultat inattendu serait alors le manque de dédoublement des bandes des autres MMP traitées par la sonde. Ainsi, dans l'ensemble, nos

observations sur le comportement électrophorétique des formes modifiées restent difficiles à expliquer. Cependant, dans le cas de la hMMP-12, son comportement atypique offre une approche expérimentale simple, pour rechercher par exemple par mutagenèse dirigée le ou les résidus de la boucle S₁' pouvant être modifiés par la sonde et responsables de la mobilité électrophorétique particulière de cette MMP.

Nos premières expériences de principe réalisées en ajoutant de la MMP-12 humaine à un broyat tumoral ont montré que notre sonde trouvait parfaitement sa cible et la modifiait de façon covalente même dans un mélange complexe et ce en conservant les seuils de détection obtenus dans des tampons. En effet, des seuils de détection de 2.5 femtomoles ont été atteints pour la MMP-12 humaine seule dans un tampon (§ II.3.c), alors qu'un seuil de détection de 5 femtomoles est observé en milieu complexe pour cette même enzyme (§ III.2.c). Ces expériences ont en même temps établi, qu'en présence de broyat, la MMP-12 n'était pas dégradée, une propriété essentielle pour assurer l'intérêt de notre approche. Cette conclusion a pu être étendue à trois autres MMP étudiées par la suite en mélange (MMP-2, -9 & -13). On doit remarquer que cette stabilité des MMP est aussi observée lorsque celles-ci sont introduites en mélange complexe, confirmant que ces MMP ne sont pas dégradées, pendant les temps d'incubation appliqués, par des protéases présentes dans les échantillons biologiques manipulés. Pour les MMP-2, -9 et -13, nos expériences suggèrent que des seuils de détection pour ces enzymes sont les suivants : 0.6 ng (9.2 fmoles), 1.6 ng (26.4 fmoles) et 0.4 ng (8.8 fmoles) respectivement. Enfin, la possibilité de radiomarquer ces MMP exogènes démontre aussi qu'il n'existe pas dans les broyats tumoraux d'inhibiteurs endogènes venant bloquer le site actif des MMP exogènes. A cet égard, il est important de rappeler ici que nos expériences de radiomarquage « *in situ* » commencent par l'ajout des MMP au broyat suivi de la sonde.

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, les rapports d'intensité de radiomarquage observés entre MMP exogènes et protéines endogènes du broyat tumoral indiquent que les protéines endogènes ciblées par notre sonde sont présentes en très petites quantités. Cette proposition est confirmée par la coloration à l'argent de gels 2D correspondant aux mêmes échantillons qui montrent que les spots de radioactivité ne donnent pas de coloration à l'argent, à l'exception de la bande située vers 75 kDa, pouvant correspondre à la sérum albumine. Ces faibles quantités de MMP détectées par la sonde n'autorisent pas une identification par spectrométrie de masse des protéines radiomarquées. A cet égard, il faut mentionner que cet inconvénient ne peut être facilement contourné, car la quantité de protéines pouvant être chargée dans la première phase de migration de l'électrophorèse 2D est relativement limitée et n'a pas dépassé dans nos études plus de 10 µg de protéines. Une approche recourant à des anticorps pour identifier les protéines présentes sur les membranes n'a pas pu non plus être mise en œuvre à cause des faibles quantités de MMP présentes. Cette situation nous a obligé à utiliser une approche indirecte, la zymographie, pour parvenir à une proposition d'identification des bandes attribuables à des MMP, c'est-à-dire toutes les bandes ayant répondu de façon positive aux expériences de compétition avec un inhibiteur de MMP.

La confrontation des expériences de zymographie et de radiomarquage nous a permis de proposer sans ambiguïté que certains spots de radioactivité pouvaient être attribuables à la présence de MMP-2 et de MMP-9, seules enzymes présentant dans cette gamme de poids moléculaire une activité gélatinolytique. Une première observation d'importance obtenue grâce à la zymographie concerne le fait que ces expériences démontrent très clairement que les proformes de MMP-2 et -9 sont très majoritaires par rapport aux formes actives de ces protéases. Cette conclusion est déduite des rapports

d'intensité observés en zymographie entre proformes et formes actives (figure 3.11). Pour mémoire, la présence de proMMP-9 en gel 2D apparaît artificiellement faible à cause de la présence d'isoformes de cette enzyme possédant des points isoélectriques variés. Il suffit de se reporter aux gels 1D pour observer une bande intense correspondant à la proMMP-9. Ce résultat indique toute la difficulté à pouvoir détecter des formes actives de MMP, car celles-ci ne représentent qu'une partie infime de la protéine produite au total, la quasi-totalité étant présente sous la forme d'une proenzyme. La présence de ces proformes est confirmée par l'absence de spot radioactif correspondant aux zones de lyse observées en zymographie. A l'inverse, aux faibles zones de lyses signalant la présence de MMP-2 et -9 correspondent des signaux intenses de radioactivité, notamment dans le cas de la MMP-9. Cette dernière observation démontre tout l'intérêt de notre approche par rapport à la zymographie classique, qui ne conduit que dans la plupart des cas à mettre en évidence la présence de proformes de MMP-2 et -9. A un signal à la limite de la détection de la forme active de la MMP-9 en zymographie correspond un signal très intense en radioactivité.

Les différences entre les observations acquises en zymographie et celles obtenues avec notre sonde peuvent être expliquées par le traitement de l'échantillon qu'impliquent ces deux approches. En effet, en zymographie, les activités gélatinolytiques sont détectées après une phase de dénaturation, suivie d'une phase de renaturation. On peut concevoir que la phase de dénaturation, même si elle est extrêmement rapide, peut modifier l'état de nos protéases d'intérêt, surtout dans le cas de mélange complexe où les rapports de concentration entre les différentes protéines présentes varient de plusieurs ordres de grandeur. En revanche, la modification covalente de nos cibles s'effectue aux premières étapes de traitement de l'échantillon, l'analyse par électrophorèse succédant à ces étapes. Ces différences de traitements sont

donc susceptibles d'entraîner des observations différentes, l'approche ABPP apparaissant probablement la plus à même de refléter la situation physiologique.

Outre cet aspect de traitement de l'échantillon, l'approche ABPP ne se limite pas qu'aux seules MMP-2 et MMP-9 et permet en théorie de cibler avec une seule sonde la plus grande partie des formes actives de MMP, un avantage certain par rapport à la zymographie. La détection d'un spot de radioactivité à 45 kDa est un exemple de MMP potentielle pouvant être uniquement détectée par notre approche. Comme mentionné précédemment, notre sonde n'a pas la vocation d'interagir avec les MMP-1 et -7, dans la mesure où ces deux MMP possèdent des cavités S_1' de petite taille, ne pouvant accueillir le cycle isoxazoline substitué présent dans notre sonde. Des différences de pourcentage de modification covalente entre plusieurs MMP ont pu être mis en évidence avec notre sonde, pouvant engendrer des différences de seuils de détection d'environ un facteur 10. Ces deux inconvénients pourraient être contournés par l'utilisation de plusieurs sondes assurant une couverture optimale des différentes MMP. La mise au point de nouvelles sondes pourrait être alors réalisée de façon systématique, de façon à permettre une évaluation des différents résidus ou groupements chimiques de la sonde pouvant jouer un rôle dans le pourcentage de modification covalente :

- nature du groupement photoactivable ;
- nature de la séquence de la sonde.

L'identification précise dans les séquences de MMP de la modification covalente réalisée par notre sonde serait certainement une information précieuse, pouvant contribuer à mettre au point des sondes douées de meilleurs rendements de modification.

Le marquage de MMP-12 exogène dans des broyats tumoraux nous a permis d'évaluer que les formes actives de MMP dans nos échantillons étaient présentes en faibles quantités. Pour 10 μ g de broyat, notre estimation tend vers

des quantités de l'ordre de 50 femtomoles par MMP. Avec un seuil de détection variant de 5 à 50 femtomoles selon la nature de MMP concernées, notre sonde paraît adaptée pour « visualiser » sur une membrane les MMP susceptibles d'être exprimées dans une tumeur. Le faible niveau d'expression des MMP mesuré par notre approche indique que des méthodes extrêmement sensibles devront être mis en œuvre pour parvenir à définir l'identité des MMP présentes dans ce type d'échantillon. Bien entendu des méthodes d'enrichissement, à partir de plus grandes quantités d'échantillon, reste une option envisageable pour contourner cette difficulté. Cependant, on peut penser qu'il serait souhaitable de parvenir à ce résultat en limitant le plus possible la quantité d'échantillon requis pour ce type d'analyse. En effet, l'utilisation de ces approches pour des analyses cliniques impliquera certainement de travailler sur quelques coupes de tumeurs, comme celles qu'utilisent les anatomopathologistes pour définir le grade d'une tumeur. Dans cette perspective, des stratégies permettant une analyse des MMP par spectrométrie de masse sur la base de l'observation de signature de fragments peptidiques devront être mise en œuvre. Pour ce faire, il faudra recourir à de nouvelles sondes, possédant en plus du groupe photoactivable, un bras espaceur substitué avec une molécule de biotine. De telles sondes pourront être alors utilisées pour immobiliser sélectivement, à la surface de billes magnétiques recouvertes de streptavidine, des MMP modifiées de façon covalente par cette sonde. Dans une configuration idéale, cette approche devrait permettre l'identification de femtomoles de MMP présentes dans un milieu complexe.

Les faibles niveaux d'expression des formes actives de MMP dans des protéomes complexes, tel que du broyat tumoral, expliquent certainement pourquoi actuellement aucun groupe dans le monde n'est parvenu à identifier ces formes de MMP, autrement que par zymographie, avec les restrictions que ce type d'approche impliquent. Nos résultats peuvent certainement expliquer, pourquoi dans des cellules tumorales exprimant des MMP, la sonde ABPP

Chapitre III : Validation de la sonde pour la détection des MMP *in vitro* et *ex vivo*

développée par le groupe de B. Cravatt ne permet pas l'observation de MMP. En effet, la sonde choisie s'est révélée ultérieurement être capable de marquer plusieurs autres protéases à zinc. Par ailleurs, les protéases en question sont connues pour s'exprimer d'une part en grande quantité et d'autre part essentiellement sous forme active. Enfin, il n'existerait pas d'inhibiteurs endogènes de ces protéases à zinc. A l'inverse, dans le cas des MMP, on peut penser que les formes dominantes de ces protéases exprimées existent sous les formes suivantes : proforme ou bien en interaction avec les TIMP, la forme active n'étant présente qu'en très petite quantité, à un moment donné. Cette proposition semble en accord avec l'observation qu'une tumeur ne correspond pas à un tissu complètement désorganisé par excès de protéolyse, mais présente un remodelage tissulaire dans lequel est certainement requis une expression très contrôlée des MMP, à différentes étapes de la progression tumorale.

4. Conclusion

Cette étude a permis le développement d'une nouvelle sonde de photoaffinité dédiée à l'identification de MMP sous forme active. Une conception sur des bases structurales et un choix optimal sur le positionnement du groupement photoactivable nous ont permis de mettre au point une sonde capable de visualiser des formes actives de MMP avec de très bons seuils de détection surpassant ceux décrits dans la littérature. Si la sonde que nous avons conçue s'avère bien adaptée pour visualiser les MMP, en revanche l'identification des MMP visualisées s'est révélée impossible à cause des très faibles niveaux d'expression des MMP sous forme active dans les broyats tumoraux. Malgré cet échec, grâce à cette sonde les premières observations de formes actives de MMP dans un broyat tumoral en faible quantité (10 µg) ont pu être réalisées avec ce type d'approche.

Si nos conclusions s'avèrent exactes, cette approche nous aura permis d'observer de façon spécifique une forme de MMP-9 peu détectable en zymographie, technologie de référence dans ce domaine connue pour sa redoutable sensibilité. Ce résultat souligne l'intérêt de ce type d'approche et le très bon niveau de sensibilité atteint. Même si la sonde que nous avons développée ne nous permet pas d'accéder à l'identité des MMP visualisées, la simplicité de notre approche pourrait permettre d'évaluer au cours de la progression tumorale si et comment les profils de MMP varient. Cependant, avant de vouloir l'utiliser dans un tel contexte, il faudra certainement optimiser le traitement de l'échantillon afin de perturber le moins possible l'ensemble des protéases s'exprimant dans celui-ci. Dans le contexte de l'expérimentation animale, on pourrait imaginer injecter l'inhibiteur *in vivo* à des souris portant des tumeurs et de réaliser une photoactivation *in situ*, une fois l'inhibiteur en interaction avec ces cibles. Même si des données du laboratoire indiquent que ce type d'inhibiteur est capable d'atteindre la tumeur en engageant des interactions

spécifiques, cette proposition se heurte malheureusement à de nombreux obstacles difficiles à contourner. Par ailleurs, cette approche ne serait pas transposable à l'Homme. Ainsi, nos travaux s'orientent vers l'utilisation de ce type de sondes sur des coupes de tumeurs congelées, un matériel accessible en clinique. Ce type d'échantillon peut fournir une centaine de microgrammes de protéines et donc selon nos estimations 500 femtomoles de différentes formes actives de MMP. Là encore, de nombreux efforts seront à consentir pour optimiser la capture optimale des MMP susceptibles d'être contenues dans ces coupes de tissus. Nos expériences préliminaires laissent penser qu'après avoir mis en solution dans un tampon standard une coupe de tissu, certaines MMP se retrouvent rapidement en solution et donc accessibles pour une modification covalente par notre sonde. Leur visualisation devrait être possible par la sonde développée dans ce projet, cependant comme discuté ci-dessus d'autres sondes devront être développées pour réaliser l'identification de ces MMP. Ces sondes, sorte de fusée à trois étages, comporteront au premier étage une partie capable d'interagir et de modifier de façon covalente le site actif des MMP, au deuxième étage un linker de longueur variable et, au troisième étage, une biotine. Ce travail aura permis d'apporter un grand nombre d'informations précieuses quant aux efficacités de modification chimique pouvant être atteintes avec le premier étage de nos futures sondes.

Chapitre IV
Matériels et Méthodes

1. Matériels

a) Enzymes et composés

Tous les produits chimiques commerciaux utilisés dans cette étude sont fournis par les sociétés Biorad et Sigma-Aldrich.

Les enzymes hMMP-2, mMMP-3, hMMP-8, hMMP-9, hMMP-12 (domaine catalytique) et hMMP-13 sont commercialisées par la société R&D Systems ; la mMMP-12 (domaine catalytique) a été fournie par la société Novartis. Les domaines catalytiques de la hMMP-11 et de la hMMP-14 ont été fournis par l'IGBMC à Illkirch (Dr. Rio M.-C.).

Les composés phosphiniques (figure 4.1) ont été obtenus par synthèse peptidique en solution ; le composé **1** a été synthétisé par le groupe d'Athanasios Yiotakis au Laboratoire de Chimie Organique de l'Université d'Athènes. Le composé **2** a été synthétisé au laboratoire par David Steer et le composé LD-243 par Laurent Devel.

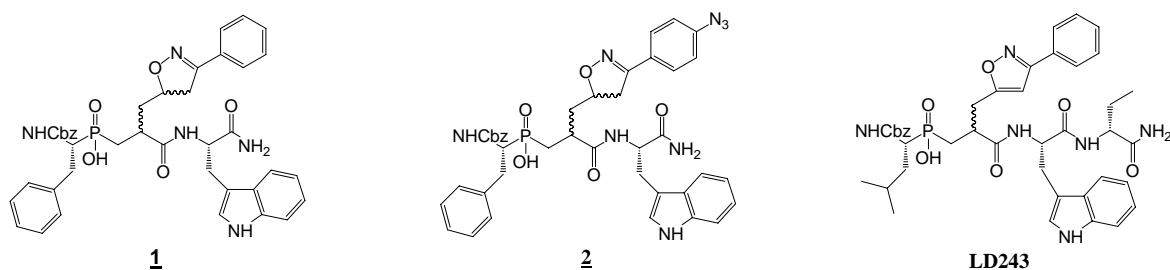


Figure 4.1 : Structure des composés **1**, **2** et LD-243

b) Préparation des composés et des échantillons

Les séparations en HPLC phase inverse analytiques et préparatives des diastéréoisomères des composés **1**, AM-381 et **2** ont été réalisées respectivement sur une chaîne Thermo/Gilson utilisant respectivement les colonnes AIT C18 Kromasil analytique (250x4.6 mm) à un débit de 1 ml/min et AIT C18 Kromasil semi-préparative (250x20 mm) à un débit de 3 ml/min. Les longueurs d'onde utilisées en détection UV des produits sont 214 et 280nm. Les

phases mobiles utilisées pour les séparations sont (A) 1 % TFA dans 90 % H₂O - 10 % acétonitrile et (B) 0.9 % TFA dans 90 % acétonitrile - 10 % H₂O.

L'analyse du composé **2** radioactif a été effectuée en chromatographie liquide en utilisant un system HPLC Perkin Elmer 200 (colonne C18 Kromasil (150x4.6 mm) à un débit de 1 ml/min) couplé à un détecteur de radioactivité Berthold (cellule Z 500-4).

Les broyats tumoraux ont été préparés à partir de tumeurs obtenues par injection sous-cutanée, à des souris BALB/c, de cellules cancéreuses de carcinome de colon murin C26. Cette lignée cellulaire est syngénique, issue de souris BALB/c traitées par du N-nitroso-N-méthyle-uréthane. Dans ce modèle de tumeurs, dix jours après l'injection, les tumeurs observées sur le dos des souris traitées mesurent environ 5 mm³ (figure 4.2).

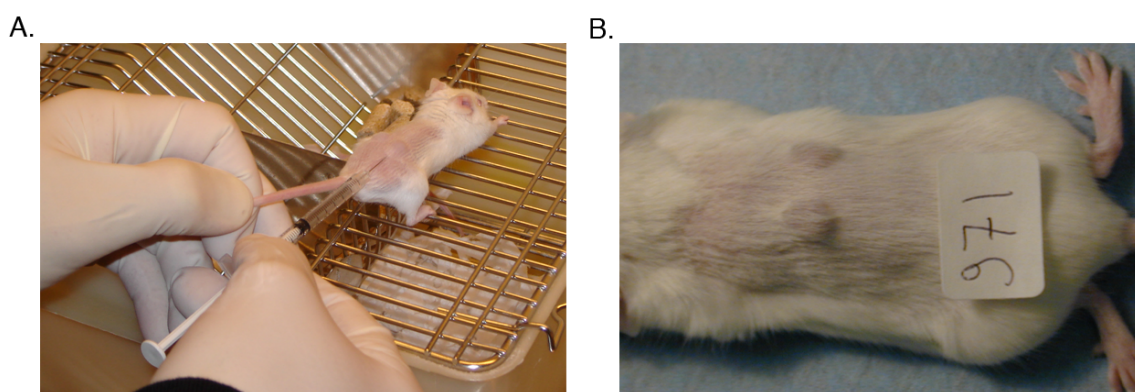


Figure 4.2 : Injection de cellules C26 en vue de récolter des tumeurs. A, injection de cellules C26 en sous-cutanée à une souris BALB/c ; B, tumeurs observées 10 jours après l'injection.

c) Tests enzymatiques

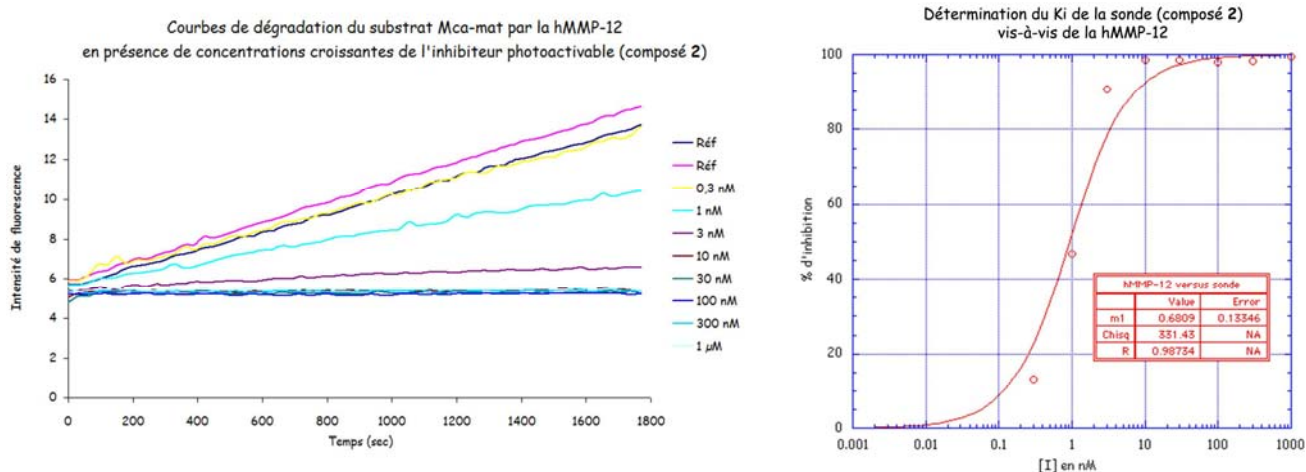
L'activité enzymatique des MMP a été mesurée ou contrôlée par suivi en fluorescence de la dégradation de substrats à fluorescence quenchée spécifiques des MMP. Les constantes d'inhibition des inhibiteurs phosphiniques vis-à-vis des MMP ont été déterminées selon le même procédé. Les mesures sont effectuées en plaque noire 96 puits (plaques NBS 3650, Corning Costar, France)

à température ambiante. Comme le montre la figure 4.4, l'activité protéolytique des MMP est suivie par l'augmentation de fluorescence à 400 nm ($\lambda_{ex} = 320$ nm), induite par la coupure du substrat fluorogénique des MMP Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ (Mca-mat ; produit Calbiochem réf. : 03-32-5032). Les signaux de fluorescence sont analysés par un fluorimètre (spectrophotomètre à compteur de photon - Fluoroskan Ascent ; Thermolab Systems) équipé d'un thermostat et d'un système d'agitation (figure 4.3).



Figure 4.3 : Photographie du fluorimètre (Fluoroskan Ascent ; Thermolab Systems)

Les constantes d'inhibition sont déterminées en utilisant la méthode proposée par Horovitz et Levitzki. Cette approche prend en compte l'effet du substrat, de l'enzyme, et des concentrations d'inhibiteur (Horovitz *et al.*, 1987). L'allure générale du graphe obtenu est une sigmoïde comme l'illustre la figure 4.4.



$$\text{Formule pour le calcul du } K_i : [EI] = \frac{1}{2} * \left\{ (I_t + E_t + K_i) - \left[(I_t + E_t + K_i)^2 - 4E_t I_t \right]^{\frac{1}{2}} \right\},$$

avec I_t la concentration de l'inhibiteur et E_t celle de l'enzyme.

Figure 4.4 : Représentation graphique de tests enzymatiques sur la figure de gauche et détermination de la valeur de K_i de la sonde vis-à-vis de la hMMP-12. Les valeurs de K_i ont été déterminées en utilisant la méthode proposée par Horovitz et Levitzki. Cette approche prend en compte l'effet du substrat, de l'enzyme, et des concentrations d'inhibiteur (Horovitz *et al.*, 1987).

Les conditions d'expérience sont les suivantes :

- 200 μ l de tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 6.8 ;
- 290 pM de hMMP-12 (réf. R&D Systems 919-MP) ;
- 4,5 μ M Mca-mat (substrat fluorogénique) ;
- 0,3 nM < [composé 2] < 1 μ M.

Après 10 min d'incubation de l'enzyme et de l'inhibiteur, la dégradation du substrat est suivie en fluorescence pendant 30 min à 400 nm pour une excitation à 320 nm.

d) Photoactivation

La photoactivation de la sonde complexée à ces cibles est réalisée sur un banc optique. Le banc d'irradiation est composé d'une lampe à mercure de 1000W (Osram), une ouverture et une série de lentilles pour focaliser la lumière polychromatique vers un monochromateur (Jobin-Yvon), derrière lequel une série de lentilles focalisent la lumière monochromatique vers un porte-échantillon (figure 4.5). La température du porte-échantillon est réglée par un courant d'eau thermostaté. L'intensité de la lumière du faisceau sortant est mesurée par un radiomètre IL1700 (International Light, Newburyport, MA). La dimension du faisceau sortant est approximativement de 24 mm² (2 mm de large et 12 mm de

haut). Toutes les expériences sont préparées et réalisées en chambre noire sous lumière inerte (lampe à sodium).

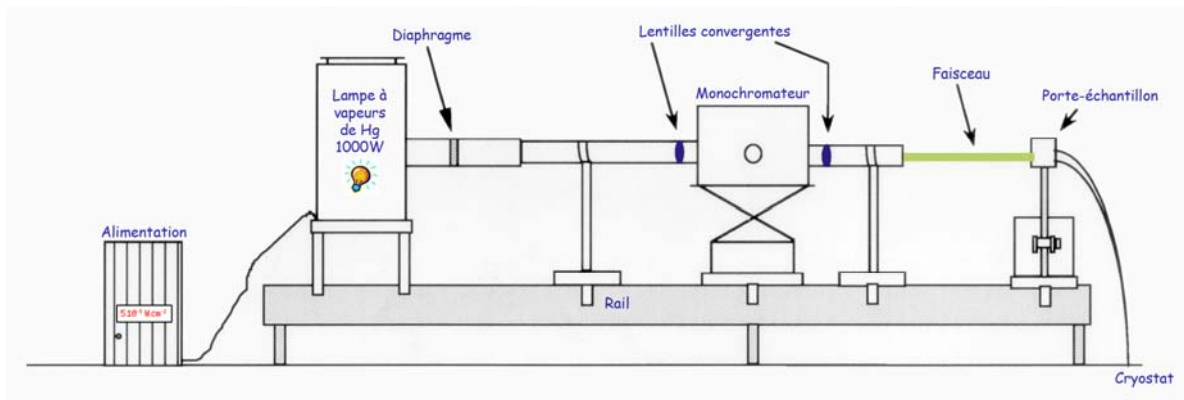


Figure 4.5 : Schéma du banc d'irradiation

e) Electrophorèses

Les gels d'électrophorèse monodimensionnelle ont été préparés au laboratoire avec le système Biorad Mini-Protean III. Ce système permet de couler des gels verticaux sur un support avant de les placer dans une cuve pour effectuer la séparation verticale selon le poids moléculaire des protéines présentes dans l'échantillon (figure 4.6.A).

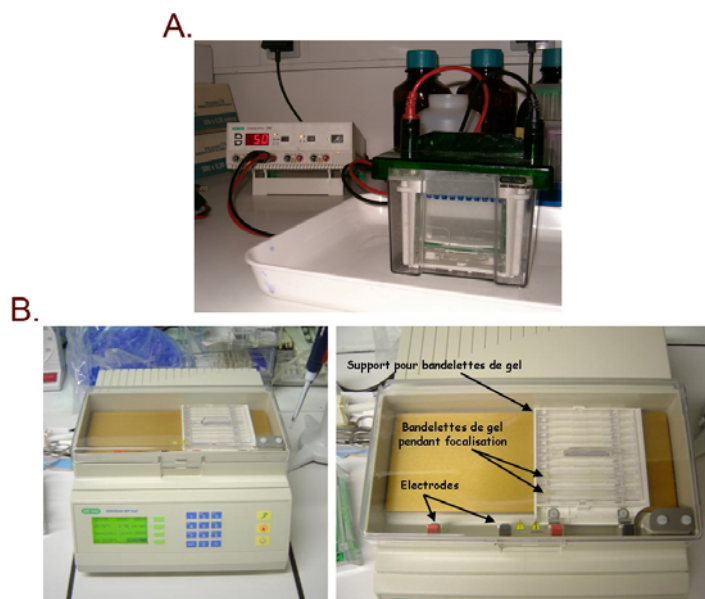


Figure 4.6 : Photographies des appareils d'électrophorèse.

A, système BIORAD mini-PROTEAN III : électrophorèse monodimensionnelle ;
B, BIORAD PROTEAN IEF Cell : électrophorèse bidimensionnelle.

Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle ont été préparés en deux temps : la première séparation, qui consiste à différencier les protéines selon leur point isolélectrique, a été réalisée sur des bandelettes de gels ReadyStrip IPG de Biorad ; cette séparation, appelée focalisation, est effectuée dans le système Biorad Protean IEF Cell (figure 4.6.B). La seconde séparation est réalisée avec le système Biorad Mini-Protean III, de la même manière que les gels monodimensionnels.

La zymographie est une technique de détection d'enzymes basée sur leur activité protéolytique pour un substrat donné. La technique repose sur la séparation des protéines par électrophorèse 1D ou 2D en conditions dénaturantes, mais sans affecter les ponts disulfures de ces protéines, suivie d'une renaturation, puis d'une incubation dans des conditions adéquates à l'activité enzymatique. Le substrat est copolymérisé dans le gel d'électrophorèse. Le matériel utilisé pour la zymographie 1D et 2D est le même que celui utilisé pour les électrophorèses 1D et 2D. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, cette technique est principalement utilisée pour la détection des MMP-2 & -9 (les gélatinases), cas où cette approche se révèle extrêmement sensible.

f) Transfert électrophorétique

Le transfert des protéines séparées sur gel d'électrophorèse 1D et 2D sur membrane Immobilon-P PVDF (Polyvinylidene difluoride) est réalisé dans le système Biorad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell. Ce système permet un passage par courant électrique des protéines vers la membrane en milieu humide.

g) Principe du radioimageur

Le radioimageur utilisé pour l'analyse de la radioactivité déposée sur membrane PVDF par transfert semi-sec est issu d'une technologie de détecteur

gazeux initialement développée pour la physique des particules et adaptée par la société Biospace avec l'aide de Georges Charpak aux applications de détection des émetteurs β en biologie. Le β -imager 2000 (figure 4.7) est principalement composé d'une chambre à avalanches d'électrons à faces parallèles (détecteur de



Figure 4.7 : Photographie du radio-imager : le β -imager 2000 de la société Biospace.

particule) et d'un dispositif de lecture constitué d'une caméra CCD intensifiée et d'une optique spéciale. La chambre est alimentée par un mélange gazeux d'argon et de triéthylamine.

Les échantillons sont placés sur une cassette porte-échantillon qui est introduite directement dans le volume de la chambre de détection. Chaque particule β qui entre dans le volume du détecteur ionise le gaz. Les électrons d'ionisation primaire ainsi libérés sont accélérés sous l'action d'un champ électrique créé par l'application de hautes tensions sur les grilles de la chambre. Les collisions successives des électrons dans le gaz créent une avalanche d'électrons et une lumière de scintillation ; chaque spot lumineux, ainsi créé dans la chambre par chaque particule qui émerge de l'échantillon, est ensuite enregistré par caméra CCD intensifiée.

Après numérisation du signal vidéo de la caméra, un algorithme de reconstitution permet de calculer la position du point émetteur. Les coordonnées

spatiales de chaque particule β sont ainsi stockées. Le comptage de toutes les particules détectées donne par accumulation l'image en temps réel de la répartition spatiale de l'activité radioactive sur l'échantillon.

Le β -imager permet à la fois la localisation spatiale précise des sites radiomarqués et la quantification directe de la radioactivité, ce qui donne accès à une quantification du produit radioactif, si on connaît sa radioactivité spécifique. A chaque acquisition, une lame de référence, dont la quantité en radioactivité est connue, est analysée en parallèle pour nous permettre de quantifier les dépôts d'échantillons. Le β -imager mesure la radioactivité des éléments qui émettent des électrons β avec une très grande sensibilité (de l'ordre du pCi) ; cependant, le rendement de comptage du β -imager est de 50 % car seules les particules β émises en direction de la caméra CCD sont comptées. De plus, il est important de noter que dans le cas d'échantillons épais (tranche de souris, membrane, etc.), la radioactivité observée par la caméra CCD ne correspond qu'à la radioactivité présente dans une première couche de l'échantillon de $0.54 \mu\text{m}$.

2. Méthodes

a) Activation des enzymes

Les enzymes fournies par Novartis et le groupe de M.-C. Rio ont été produites sous forme active. Les enzymes de R&D Systems sont dans la majorité des cas des enzymes sous forme inactive, des proformes. Seule la hMMP-12 a été fournie sous forme de domaine catalytique, donc sous forme active.

Les proformes de MMP commercialisées doivent être activées pour pouvoir les manipuler. Cette activation est réalisée dans 100 μ l tampon TCNB (Tris 50 mM, pH 7.5, CaCl_2 10 mM, NaCl 150 mM, Brij35 0.05 %) à une concentration d'enzyme de 100 μ g/ml, sauf dans le cas de la mMMP-3 dont la concentration pour l'activation est de 10 μ g/ml. L'activation se fait par voie chimique, en ajoutant 1 μ l d'une solution 100 mM d'APMA (acétate de 4-aminophényle mercure). Selon les indications de R&D Systems, le temps d'activation varie entre les différentes MMP de 1h à 30h, mais est toujours effectuée à 37 °C et à l'obscurité pour éviter de dégrader l'APMA.

L'activation de l'enzyme par l'APMA repose sur la modification chimique du résidu cystéine du prodomaine interagissant avec l'atome de zinc du site actif par le mercure de l'APMA. Cette modification entraîne un déplacement du prodomaine du site actif permettant une autolyse de l'enzyme aboutissant à l'élimination du prodomaine.

L'activation est suivie en fluorescence par des tests de dégradation de substrat.

Après activation, les MMP sont aliquotées et stockées à -80 °C pour éviter, voire limiter toute dégradation par autolyse. Les MMP sont dosées par un inhibiteur surpuissant de MMP (LD-243, figure 4.8) en suivant la dégradation de substrats fluorogéniques. Les MMP sont aussi analysées en SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent pour vérifier leur état avant et après activation.

b) Dosage des MMP

Les concentrations des MMP ont été déterminées par des expériences de titrage utilisant un inhibiteur puissant des MMP, le LD-243. On se place à des concentrations d'enzymes très élevées (de l'ordre de 20 nM) en utilisant un substrat faiblement dégradé par les MMP : Mca-MMP-3 (R&D Systems, MMP substrate II, réf. : ES002, figure 4.8). Le résultat obtenu en suivi de fluorescence est illustré par la figure 4.9.

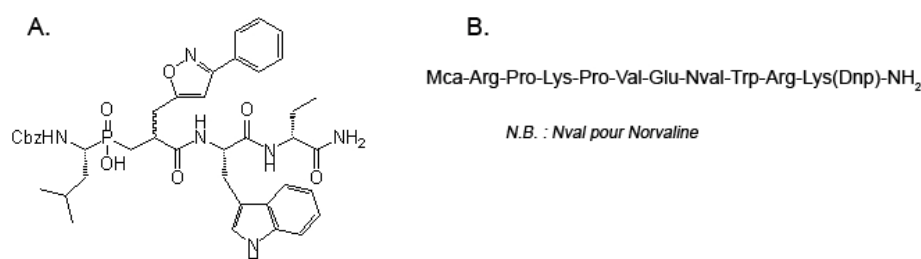


Figure 4.8 : A, Structure de l'inhibiteur sur-puissant LD-243 ; B, séquence du substrat Mca-MMP3 utilisé pour les titrations des MMP.

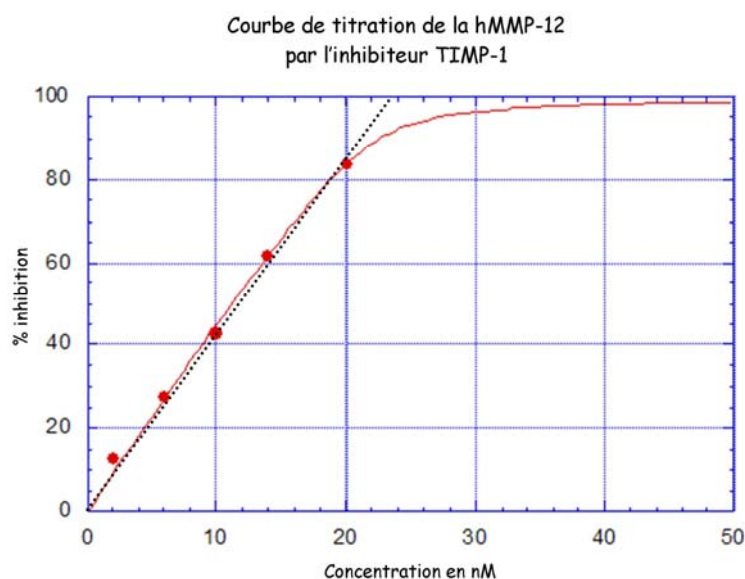


Figure 4.9 : Courbe de titration de la hMMP-12 par LD-243. Les conditions de suivi en fluorescence sont les mêmes que pour des déterminations de K_i (cf. figure 4.4).

Les conditions d'expérience sont les suivantes :

- 100 μ l de tampon Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 6.8 ;
- 20 nM de hMMP-12 (réf. R&D Systems 919-MP) ;
- 15 μ M Mca-MMP3 (substrat fluorogénique) ;
- 1 nM < [LD-243] < 50 nM.

Après 45 min d'incubation de l'enzyme et de l'inhibiteur, la dégradation du substrat est suivie en fluorescence pendant 30 min à 400 nm pour une excitation à 320 nm.

c) Purification du composé 2

Le composé 2 est obtenu par synthèse comme un mélange de 4 diastéréoisomères, qui sont purifiés par HPLC par élution isochratique (55% acétonitrile, 45% H₂O) sur une colonne semi-préparative AIT C18 Kromasil (250x20 mm). La détection UV est réalisée à 230nm. Les diastéréoisomères sont récoltés en 4 fractions distinctes (un diastéréoisomère par fraction) dont les temps de rétention sont les suivants :

$t_{R(F1)} = 17 \text{ mn}$, $t_{R(F2)} = 17.6 \text{ mn}$, $t_{R(F3)} = 19.3 \text{ mn}$, $t_{R(F4)} = 20.5 \text{ mn}$ (figure 4.10).

La fraction F1 du composé 2 montrant le meilleur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des MMP est alors radiomarké au 3H selon la méthode éprouvée au laboratoire : radiomarquage par échange isotopique.

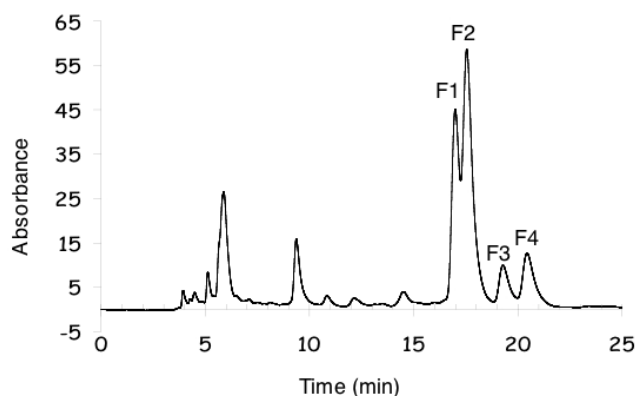


Figure 4.10 : Spectre HPLC à 230 nm du composé 2 non purifié.

d) Radiomarquage du composé 2

La méthode de radiomarquage utilisée pour le composé 2 est basée sur l'échange isotopique ; elle consiste en un échange hydrogène-tritium en milieu acide sur le composé à radiomarquer.

Dans un premier temps, on fait réagir dans un ballon du gaz tritium sur du PdO en présence de TFA, pour obtenir du TFA tritié via la formation d'eau tritiée (figure 4.11).

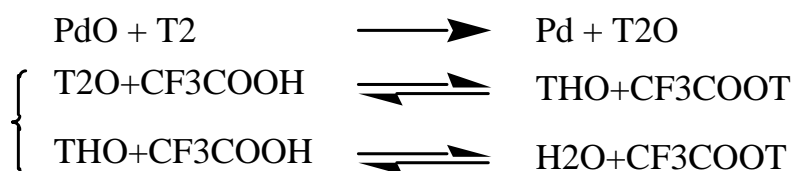


Figure 4.11 : Schéma réactionnel pour obtenir du TFA tritié

Une fois le TFA tritié obtenu, le mélange TFA/H₂O tritié est transféré par vide statique par congélation dans un nouveau ballon contenant le composé 2 solide et sec pour l'échange isotopique sur le tryptophane (figure 4.12).

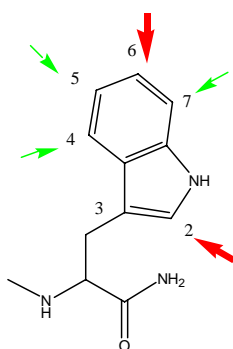


Figure 4.12 : Localisation de l'échange isotopique sur le tryptophane ; échange immédiat des protons labiles (lavage ensuite au MeOH) ; échange rapide de ¹H(2) et ¹H(6) (flèches rouges) ; échange lent de ¹H(4), ¹H(5), ¹H(7) (flèches vertes).

La réaction dure 2 h à température ambiante. Le solvant issu de la réaction est à nouveau transféré par vide statique par congélation et le résidu ainsi obtenu est repris 3 fois dans du méthanol et évaporé afin d'éliminer les tritium labiles. Enfin, le résidu est dissous dans 10 ml de méthanol afin d'être purifié par HPLC (figure 4.13). Un comptage de la radioactivité est effectué après radiomarquage pour s'assurer que l'échange isotopique s'est correctement déroulé et déterminer une concentration du produit tritié.

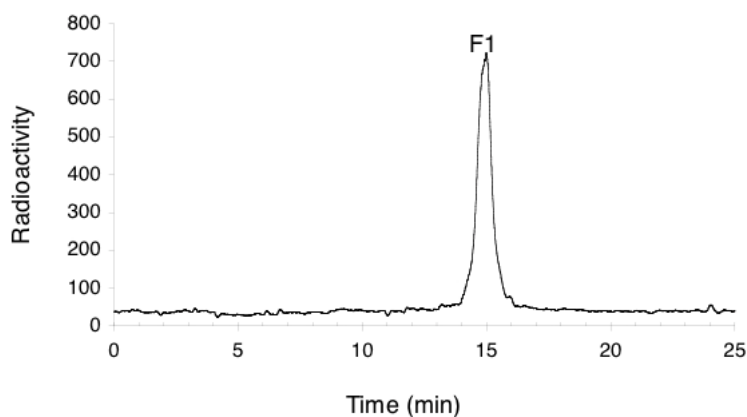


Figure 4.13 : Spectre HPLC en détection tritium du composé 2_{F1} tritié.

e) Tests enzymatiques in vitro

Les conditions d'une expérience standard sont : 200 μ l de tampon (Tris 50 mM, pH 6.8, CaCl₂ 10 mM), des MMP en concentration de l'ordre de 0.5 nM. Après agitation de la plaque pendant 10 minutes, le substrat Mca-mat (7.5 μ M) est ajouté. La cinétique de dégradation est suivie par mesure de fluorescence induite par le clivage du substrat.

Les constantes d'inhibition (K_i) des inhibiteurs phosphiniques vis-à-vis des MMP ont été déterminées par la même méthode en réalisant une gamme de concentration d'inhibiteur de 0.01 nM à 1000 nM, soit 1 μ M, finale.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 4.4.

f) Culture cellulaire

L'étude du taux d'expression des MMP dans du tissu tumoral nécessite le développement régulier de tumeurs pour travailler avec des broyats les plus frais possibles.

Les cellules cancéreuses C26 sont cultivées sur un milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine et 1 ‰ gentamycine. Les cellules sont mises en culture pour atteindre la confluence, puis diluées dans du milieu de culture selon leur développement,

pour reprendre une culture et à nouveau atteindre la confluence. Cette manipulation, appelée passage, est réalisée 2 à 3 fois avant de compter le nombre moyen de cellules dans le volume de culture à 80 % de confluence et préparer une solution à injecter à l'animal. L'injection de 50000 cellules dans 50 μ l de PBS 1x est réalisée en sous-cutanée. L'injection doit avoir lieu dans les 30 minutes qui suivent la préparation de la solution à injecter.

Les tumeurs apparaissent au bout du 4^{ème} jour après l'injection ; les animaux sont sacrifiés au 10^{ème} jour par décérébration et les tumeurs récoltées.

g) Préparation des échantillons

Les tumeurs sont séparées de la peau de l'animal avec un scalpel et immédiatement déposées dans une coupelle posée sur la glace. Le tampon TCNB (Tris 50 mM, pH 7.4, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, Brij35 0.05%) est utilisé pour le broyage des tumeurs ; afin d'éviter les possibilités de dégradation de l'extrait tumoral par les protéases autres que les MMP, 10 % d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (exceptées les MMP) de Sigma-Aldrich (P8340) est ajouté avant broyage. Ce cocktail est composé de AEBSF (4-(2-aminoéthyle)benzènesulfonyl fluoride), Aprotinine, Leupeptine, Bestatine, E-64 (N-(trans-époxy succinyle)-L-leucine 4-Guanidinobutylamide) et Pepstatine A. L'ensemble de ces inhibiteurs est capable d'inhiber conjointement les protéases à sérine, à cystéine, à acide aspartique et les aminopeptidases.

Les tumeurs récoltées sont alors pesées et broyées au potter à 4 °C dans un volume de tampon TCNB/cocktail d'inhibiteurs correspondant à la moitié du volume nécessaire pour avoir 800mg de tumeur/ml de broyat final. Le 1^{er} broyat est récupéré et le second volume ajouté pour effectuer la 2^{ème} phase du broyage (2^{ème} moitié du volume pour avoir 800 mg de tumeur/ml de broyat final). Le second broyat est récupéré et ajouté au 1^{er} broyat. L'extrait tumoral est alors centrifugé à 9600 rpm à 4 °C pendant 30 minutes. Le surnageant est récupéré et

isolé avant de centrifuger l'extrait restant à 9600 rpm à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant obtenu est récupéré et ajouté au 1^{er} isolé. Grâce aux centrifugations, l'extrait obtenu est débarrassé des lipides présents dans les tumeurs ; il est ensuite divisé en aliquotes et conservé à - 80 °C.

Un dosage de Bradford est effectué pour déterminer une concentration du broyat en protéines.

Un test d'activité est réalisé pour déterminer une activité au temps t_0 et garder cette valeur comme référence. Les conditions de ce test sont les suivantes : 30 minutes de lecture de fluorescence issue de la dégradation de 7.5 μM de Mca-mat par 1 μl de broyat tumoral (dilué 10 fois au préalable dans du tampon Tris 50 mM, pH 6.8, CaCl_2 10 mM) dans 200 μl de tampon Tris 50 mM, pH 6.8, CaCl_2 10 mM).

h) Photoactivation

Comme mentionné ci-dessus, la photoactivation se fait sur un banc optique muni de 2 séries de lentilles et d'un monochromateur afin de focaliser la lumière monochromatique désirée en un endroit donné.

Pour la photoactivation du composé **2**, la longueur d'onde choisie est 310 nm. Cette longueur d'onde permet de photoactiver en 2 minutes une protéine seule ou en mélange avec le composé **2**, sans affecter de manière drastique les protéines. Des tests d'activité ont été réalisés avant et après photoactivation dans le cas d'une MMP ; il a été démontré que son activité n'est pas affectée par la photoactivation.

La photoactivation est effectuée en tube « eppendorf » sur un portoir réfrigéré à 10 °C par cryostat, où la lumière monochromatique, dont la puissance a été réglée à 50 $\mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$, est focalisée.

a. Le radiomarquage des MMP recombinantes seules ou en mélange a été analysé en gel 1D et 2D. Dans le cas des gels 1D, les concentrations en MMP étaient en moyenne de 1 μM pour une concentration en composé 2 de l'ordre de 2 μM . Pour la gamme de sensibilité du composé 2 vis-à-vis de la hMMP-12 domaine catalytique, la sonde à 1 μM a été ajoutée à des solutions de hMMP-12 allant de 2 nM à 10 pM. Dans le cas des gels 2D, la concentration moyenne des MMP est de 15 nM pour une concentration en composé 2 de 50 nM. Pour certaines cartographies des MMP sur électrophorèse 2D, en particulier la hMMP-12, les conditions de gel 1D ont été utilisées pour le gel 2D (1 μM hMMP-12 vis-à-vis de 2 μM de composé 2).

b. Dans les cas des extraits tumoraux, la concentration en protéines issues de l'extrait était de l'ordre de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en présence de 50 nM de composé 2.

La validation du projet pour déterminer le seuil de détection de hMMP-12 en présence d'extrait tumoral a été réalisée en ajoutant à 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de protéines de broyat de 10 nM à 100 pM de hMMP-12 puis 1 μM de composé 2.

Pour les expériences de compétition, un inhibiteur surpuissant, large spectre des MMP (LD243) a été utilisé à 5 μM .

Le mélange à photoactiver est préparé sous lumière inerte en ajoutant dans du tampon Tris 50 mM, pH 6.8, CaCl_2 10 mM, Brij35 0.01 % les enzymes, dans le cas des compétitions l'inhibiteur LD243, puis le composé 2. Le mélange est incubé à 10°C pendant 10 minutes sous agitation. Le mélange est alors soumis au faisceau de lumière de 50 $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ pendant 2 minutes à 10°C.

La solution photoactivée est alors retirée du champ du faisceau lumineux et soit conservée à - 80°C, soit traitée pour une migration électrophorétique.

i) Electrophorèses

Toute séparation électrophorétique résulte de la possibilité de faire migrer des molécules à des vitesses différentes sous l'action d'un champ électrique dans un électrolyte.

i. L'électrophorèse monodimensionnelle - SDS-PAGE

L'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) est employée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le traitement au β -mercapto-éthanol à 95°C pendant 5 minutes permet de dissocier les protéines oligomériques et de réduire les ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Le traitement au SDS permet l'adsorption d'un grand nombre d'ions dodécylsulfates sur tous les monomères, les chargeant ainsi négativement de manière uniforme. La mobilité électrophorétique de ces complexes protéine/SDS dépend donc uniquement du poids moléculaire des protéines, déterminés par comparaison avec la mobilité de protéines « standard ».

Les échantillons analysés en électrophorèse 1D sont dénaturés au SDS et au β -mercapto-éthanol pendant 5 minutes à 95°C dans une solution de dépôt (Tris 50 mM, SDS 2 %, β -mercapto-éthanol 2 %, Glycérol 12 %, 0.5 % bleu de bromophénol, pH 6.8).

Les gels sont préparés au laboratoire ; ils sont composés de 2 types de gels : un gel de séparation composé de 12 % de polyacrylamide surmonté d'un gel de concentration composé de 4 % de polyacrylamide. Le gel de séparation est coulé en premier et, avant que celui-ci ne soit polymérisé, le gel de concentration est coulé par-dessus. Cette manipulation est rendue possible par la présence, dans le gel de séparation, de glycérol. Par un jeu de densité, les deux gels ne se

mélangent pas et un mini-gradient de polyacrylamide est formé sur 2-3 mm à l'interface, parfaitement linéaire, permettant aux protéines, en particulier les protéines de haut poids moléculaire, un passage plus facile et plus doux d'un gel à mailles peu serrées (gel de concentration) à un gel à mailles plus serrées (gel de séparation). Cet avantage technique a pour but de ralentir la vitesse de migration des protéines de manière progressive. Le gel de concentration doit avoir une hauteur d'environ 1 cm pour être efficace, c'est-à-dire pour permettre de concentrer les protéines en une bande unique avant d'être séparées assurant un départ groupé et donc une meilleure résolution lors de la séparation (figure 4.14).

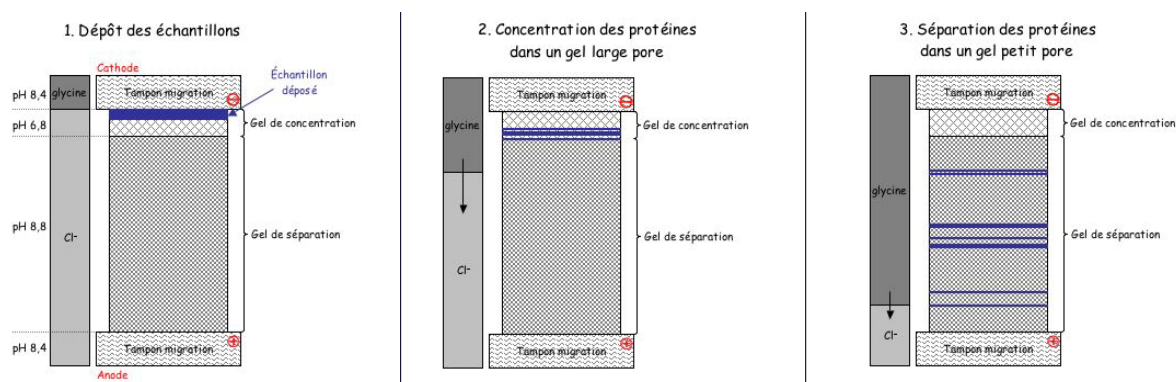


Figure 4.14 : Schéma du principe de l'électrophorèse monodimensionnelle.

Le gel à 12 % (gel de séparation) est composé de 1.5 ml acrylamide/bisacrylamide 40 %, 1.25 ml de tampon [Tris 1.5 M, pH 8.8], 520 μ l de glycérol, 1.68 ml d'eau milliQ, 50 μ l SDS 10 %, 20 μ l APS 10 % (persulfate d'ammonium) et 5 μ l Temed. Un gel à 4 % (gel de concentration) est composé de 120 μ l acrylamide/bisacrylamide 40 %, 603.4 μ l de tampon [Tris 1 M, pH 6.8], 758.4 μ l d'eau milliQ, 12 μ l SDS 10 %, 5 μ l APS 10 % (persulfate d'ammonium) et 2 μ l Temed. Après rinçage des puits avec du tampon de migration [Tris 25 mM, Glycine 200 mM, SDS 0.1 %, pH 8.3], de 10 à 25 μ l d'échantillons sont déposés.

Les gels sont placés dans une cuve du système Biorad Mini-Protean III et la cuve est remplie de tampon de migration jusqu'à immersion complète des gels.

L'électrophorèse, pour un gel, se déroule à ampérage constant : 10 mA, 300 V, pendant environ 12 minutes lors de la concentration, puis dès que les échantillons entrent dans le gel de séparation, l'ampérage est augmenté à 25 mA pendant environ 1h.

ii. L'électrophorèse bidimensionnelle - 2DE

L'électrophorèse bidimensionnelle est réalisée en 2 étapes : la 1^{ère} étape, illustrée par la figure 4.15, permet une séparation selon le point isoélectrique des protéines (pI), appelée isoélectrofocalisation (IEF); et la 2^{ème} étape constitue la séparation selon le poids moléculaire qui correspond à un gel SDS-PAGE, sans gel de concentration.

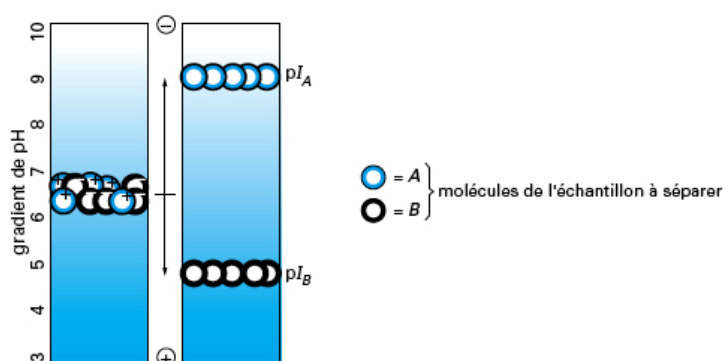


Figure 4.15 : Schéma du principe de la focalisation isoélectrique dans un gradient de pH.

L'isoélectrofocalisation est la méthode la plus résolutive pour séparer des échantillons selon leur point isoélectrique, séparation effectuée dans un gradient de pH. Mais sa principale limite réside dans la solubilisation des protéines en l'absence de sels et/ou de tampon. En outre, plus une molécule approche de son pI dans un gradient de pH, moins elle est chargée, plus sa vitesse de migration est faible ce qui peut être aisément détourné par l'application de fortes tensions. Ainsi, l'isoélectrofocalisation est réalisée dans des conditions de

voltage élevées pour assurer une expérience relativement rapide, sans pour autant risquer de détériorer les protéines par surtension.

Les gels utilisés dans le cas de la 1^{ère} dimension sont des gels en bandelettes de 7 x 0,3 cm ; ces gels sont des gels mous, dont la composition en polyacrylamide est de 4 %, dont 3% de bisacrylamide, permettant ainsi aux protéines un transport dans de larges pores donc sans être freinées.

Les bandelettes de gels ont été préparées en cumulant les deux méthodes permettant de réaliser les gradients de pH :

1) en copolymérisant dans le gel d'acrylamide des immobilines (figure 4.16), qui sont des dérivés d'acrylamide portant des groupements libres d'acide carboxylique et d'amines tertiaires ;

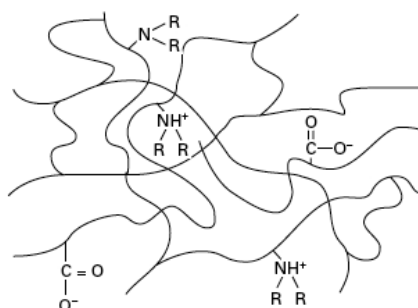


Figure 4.16 : Immobilines copolymérisées dans un gel d'acrylamide

2) en ajoutant à l'échantillon des ampholytes chargés ; ce sont des petites molécules chargées capables de s'ordonner dans un courant électrique selon leur pI et ainsi former un gradient de pH permettant de séparer les protéines de l'échantillon.

Le cumul des deux méthodes de préparation permet dans un premier temps de s'assurer un gradient de pH stable grâce aux immobilines et dans un deuxième temps une très bonne efficacité de séparation et une très bonne résolution grâce aux ampholytes porteurs.

Lorsque que le champ électrique est appliqué (tension élevée mais courant de l'ordre de 40 μ A/bandelette), le transport des protéines est facilité par les ampholytes qui s'ordonnent selon leurs pIs et s'immobilisent chacun dans leur zone étroite de gamme de pH. Les protéines de l'échantillon ainsi transportées se rangent selon leurs pIs et sont immobilisées par les immobilines copolymérisées dans le gel.

Pour éviter l'inconvénient d'une faible solubilité de certaines protéines près de leur pI et dégarnies par le passage du courant électrique des sels et ions les accompagnant, les échantillons sont préparés dans une solution qui permet la réhydratation des bandelettes avant l'électrofocalisation. Cet aspect technique permet d'une part la pénétration des protéines dans le gel par absorption et d'autre part une uniformisation des tampons et sels dans la gel. Cette solution de réhydratation est composée de :

1) 7M urée, 2M thiourée ; l'urée facilite la dénaturation et la solubilisation des protéines, et la thiourée a pour vertu d'augmenter le pouvoir de solubilisation des protéines (elle est très utilisée pour des échantillons de type membranaires) ; ces deux agents solubilisants agissent sur les liaisons hydrogènes ;

2) 4% CHAPS ; le CHAPS est un détergent non-ionique qui facilite la solubilisation des protéines et minimisent les précipités en agissant sur les effets hydrophobes entre les protéines ;

3) 1% v/v ampholytes porteurs pour faciliter le transport des protéines dans les bandelettes de gels ;

4) 70mM DTT ; le DTT est un agent réducteur qui facilite la migration des protéines au début de l'électrofocalisation ; au cours du temps, le DTT migre en effet dans le gradient de pH permettant ainsi la reformation des liaisons S-S, pouvant réduire la solubilité de certaines protéines.

5) 0.2% de Bleu de bromophénol pour un suivi visuel du bon déroulement de l'IEF.

Les ampholytes et le DTT doivent toujours être ajoutés au dernier moment pour éviter toute dégradation de ces composés.

Il est important de noter que chauffer l'échantillon jusqu'à 30°C permet d'assurer une meilleure solubilisation des protéines encore récalcitrantes aux traitements ci-dessus (chauffer au-delà de 30°C des solutions contenant de l'urée risque une modification du pI des protéines due à des carbamylations).

Les échantillons, après traitement éventuel par le composé 2, sont incubés sous agitation pendant 1h/1h30, permettant à l'urée et la thiourée d'agir, dans un volume final de tampon de réhydratation n'excédant pas 300 μ l, dont la part d'échantillon est inférieur à 20 %. Puis pour éviter le chargement d'agrégats ou/et de précipités sur les bandelettes de gels IEF, les échantillons sont centrifugés à 9600 rpm pendant 30 minutes à température ambiante. Les échantillons sont alors déposés dans les puits du portoir du Protean IEF Cell, dans lequel est réalisée la focalisation. Chaque échantillon est recouvert d'une bandelette de gel IEF et laisser ainsi 10 minutes pour permettre une bonne pénétration de l'échantillon dans le gel ; c'est la phase de réhydratation du gel IEF. Pour empêcher toute évaporation de l'échantillon pendant la focalisation, la bandelette de gel IEF est recouverte d'un volume d'huile minérale.

L'IEF est réalisée en diverses étapes allant d'une pénétration de l'échantillon de manière passive, à l'application de tensions de plus en plus élevées pour obtenir une isoélectrofocalisation très résolutive en évitant tout choc électrique ou thermique aux protéines. La première étape est la suite de la réhydratation passive ; cette phase de pénétration de l'échantillon dans la bandelette de gel se déroule sous huile minérale et dure 4h à une température régulée de 20°C ; elle est poursuivie par une réhydratation active (50V, tension

faible) pendant 11h. Les étapes suivantes concernent l'augmentation par paliers de la tension appliquée aux électrodes pour la focalisation. Elle se fait en 4 étapes : 1h à 250 V, 1h à 1000 V, 1h à 5000 V et plusieurs heures (une dizaine dans la plupart des cas) à 4000 V. cette dernière étape se termine lorsqu'un nombre de V.h est atteint à la fin de la focalisation : pour des bandelettes de gamme de pI 3-10, il faut atteindre 20000 V.h et dans le cas de bandelettes de gamme de pI 4-7 il faut atteindre 30000 V.h.

Lorsque la focalisation est terminée, les bandelettes sont immédiatement conservées à - 80 °C ou traitées avec une solution d'équilibration [Urée 6M, glycérol 20 %, SDS 2 %, pH 8.8] contenant 10 mg/ml de DTT pendant 15/20 minutes sous agitation forte.

Cette réduction des ponts disulfures des protéines contenues dans l'échantillon est suivie par une alkylation des cystéines libres au iodoacétamide ; ce traitement est réalisé dans une solution d'équilibration contenant 25 mg/ml d'iodoacétamide pendant 15/20 minutes sous agitation forte à l'obscurité pour éviter la dégradation du iodoacétamide, sensible à la lumière.

Les bandelettes ainsi traitées sont ensuite rincées dans du tampon de migration [Tris 25 mM, Glycine 200 mM, SDS 0.1 %, pH 8.3] avant d'être déposés à la surface d'un gel de séparation de 12 % ou 7.5 % de polyacrylamide.

A titre indicatif, un gel à 12 % est composé de 1.8 ml acrylamide/bisacrylamide 40 %, 1.5 ml de tampon [Tris 1.5 M, pH 8.8], 2.6 ml d'eau milliQ, 60 μ l SDS 10 %, 20 μ l APS 10 % (persulfate d'ammonium) et 6 μ l Temed. Un gel 7.5 % de polyacrylamide est préparé comme un gel 12 % mais les volumes d'acrylamide/bisacrylamide 40 % et d'eau milliQ sont respectivement 1.2 ml et 3.2 ml.

La migration se déroule comme pour un gel SDS-PAGE, verticalement dans une cuve du système Biorad Mini-Protean III ; les conditions de migration pour

un gel sont légèrement différentes : de 4 à 8 minutes à 10 mA/300 V pour laisser le front de migration pénétrer le gel de deuxième dimension, suivi d'une augmentation du courant électrique à 25 mA pendant 1h environ, la variable étant le voltage.

Après la migration électrophorétique, soit les protéines du gel sont transférées sur membrane PVDF pour une lecture radioactivité au radioimageur, soit le gel est coloré au nitrate d'argent.

Les étapes principales de l'électrophorèse bidimensionnelle sont récapitulées dans la figure 4.17.

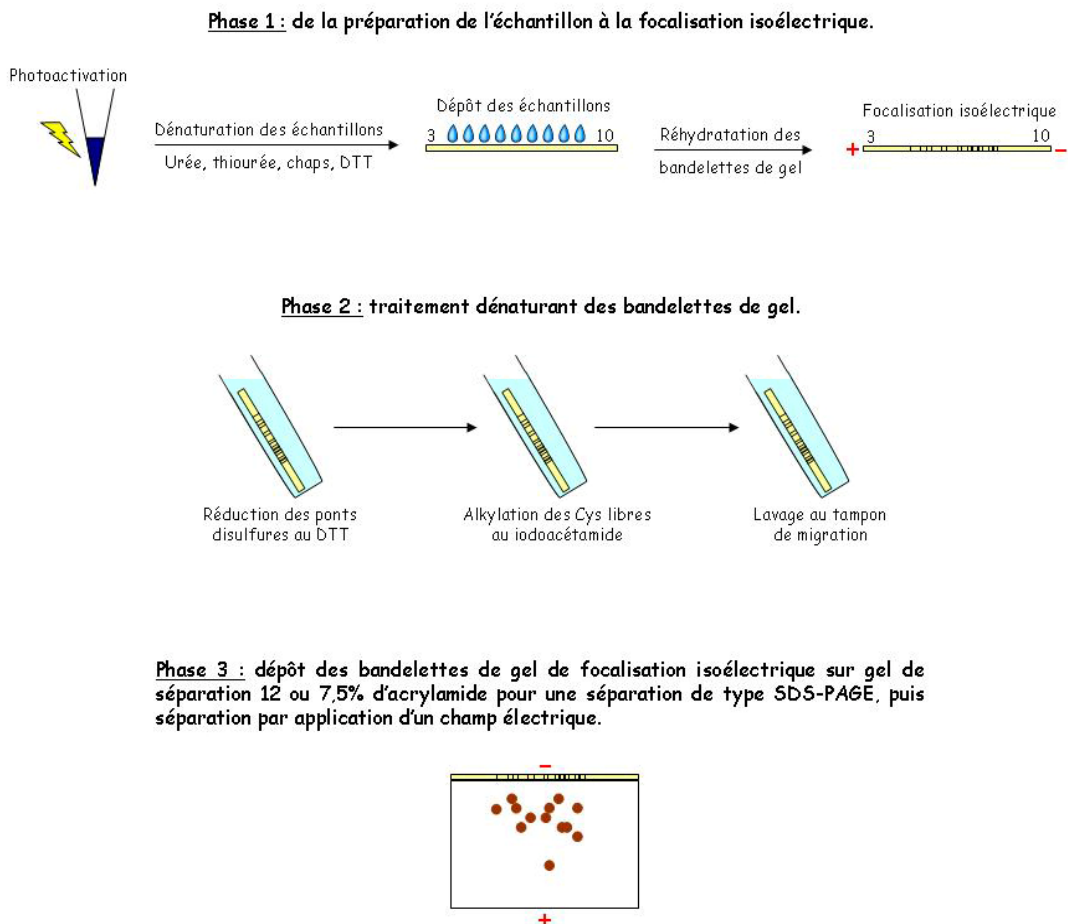


Figure 4.17 : Schéma général des étapes de l'électrophorèse bidimensionnelle.

j) Transfert électrophorétique

Après la séparation des protéines dans des gels de polyacrylamide 1D ou 2D, pour une lecture de la radioactivité au radioimageur (β -imager) ou encore pour des expériences de Western Blot, les protéines doivent être transférées sur des membranes Immobilon-P PVDF (Polyvinylidene Difluoride), 0.45 μ m (Millipore). Le transfert est effectué sur un appareil Biorad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell.

La membrane activée au MeOH est rincée avec du tampon de transfert (Tris 50 mM, Glycine 40 mM, SDS 0.375 %, MeOH 20 %, pH 8.3) puis déposée sur un papier buvard épais humidifié avec du tampon de transfert. Le gel rincé au tampon de transfert est ensuite déposé sur la membrane, puis recouvert par deux papiers buvards épais humidifiés avec du tampon de transfert. Le transfert est réalisé dans des conditions identiques (400 mA, 50 V, 2 h) quelque soit le type de gel (1D ou 2D) et le nombre de membranes. La surface de PVDF étant la variable « résistance », c'est elle qui gère le courant électrique et le voltage au cours du transfert.

k) Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est la plus performante des révélations par agent chimique colorant. Elle peut détecter jusqu'à 5 ng de protéines dans un gel de polyacrylamide. Il est cependant important de noter qu'elle ne colore pas de manière égale les différentes protéines car les principaux groupes réactifs sont les amines libres et les groupement sulfures. Cependant, dans notre cas, les MMP semblent être de bons candidats pour être colorées et détectées. Cette observation est entièrement fondée sur l'expérience mais peut-être expliquer par un nombre de cystéines et/ou résidus aminés quasi-équivalent dans les différentes MMP.

La coloration nécessite certaines précautions pour éviter, d'une part, un bruit de fond masquant les signaux correspondant à de faibles quantités de protéines et, d'autre part, des sels d'argent clairsemés sur le gel gênant l'analyse.

Dans un premier temps, les protéines séparées par électrophorèse 1D et 2D doivent être « fixées » dans le gel par une série de 2 bains de 30 minutes dans une solution éthanol 30 %, acide acétique 5 %. Ensuite pour éliminer l'excès d'éthanol et d'acide acétique, le gel est lavé à l'eau milliQ dans 4 bains de 10 minutes. Un bain d'1 minute dans du thiosulfate de sodium 0.02 % permet de sensibiliser les groupements réactifs pour favoriser la réaction avec le nitrate d'argent. L'excès de thiosulfate est lavé par 2 bains d'1 minute dans l'eau milliQ.

Ensuite, le gel est placé pendant 45 minutes sous agitation à l'abri de la lumière dans la solution d'argent [AgNO_3 2 g/l, Formaldéhyde 37 % 70 μl pour un volume final de 250 ml d'eau milliQ]. le gel sorti du bain d'argent est lavé sous un flux d'eau milliQ, avant d'être placé dans la solution de révélation [carbonate de sodium 24 g/l, formaldéhyde 37 % 70 μl , thiosulfate de sodium 10 % 32 μl pour un volume final de 250 ml d'eau milliQ]. La révélation peut durer entre 30 secondes et 10 minutes selon la quantité de protéines déposée. Une fois le niveau de coloration voulu atteint, le gel est placé dans une solution Tris 330 mM, acide acétique 2% dans l'eau milliQ.

Le gel peut être ensuite conservé dans une solution éthanol 20 % dans l'eau milliQ ou séché sur un appareil Biorad Gel Dryer.

1) Zymographie

La zymographie est une méthode qui utilise les mêmes manipulations que l'électrophorèse SDS-PAGE et que l'électrophorèse bidimensionnelle, mais sans

les étapes de réductions des ponts disulfures, afin de pouvoir récupérer l'activité des enzymes après la migration.

Dans notre étude, la zymographie gélatine nous a permis d'étudier l'activité gélatinolytiques des extraits tumoraux en comparaison des radiomarquages des protéines des extraits par photoactivation en présence du composé **2**. Le type de résultats observables pour une zymographie a été illustré dans l'introduction par la figure 1.16.

i. La zymographie 1D

Les extraits tumoraux (50 μg de protéines) sont dénaturés dans une solution Tris 50 mM, glycérol 10 %, SDS 2 %, bleu de bromophénol 1 ‰, pH 6.8 pendant 15 minutes à 37 °C.

A titre indicatif, un gel à 7.5 % (gel de séparation) est composé de 940 μl acrylamide/bisacrylamide 40 %, 1.25 ml de tampon [Tris 1.5 M, pH 8.8], 520 μl de glycérol, 750 μl gélatine 4.5 mg/ml, 1.46 ml d'eau milliQ, 50 μl SDS 10 %, 20 μl APS 10 % (persulfate d'ammonium) et 5 μl Temed. La concentration finale en gélatine est 675 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Un gel à 4 % (gel de concentration) est composé de 120 μl acrylamide/bisacrylamide 40 %, 603.4 μl de tampon [Tris 1 M, pH 6.8], 758.4 μl d'eau milliQ, 12 μl SDS 10 %, 5 μl APS 10 % (persulfate d'ammonium) et 2 μl Temed.

Une fois les échantillons déposés, le gel est mis à migrer selon le même protocole et dans les mêmes conditions qu'un gel classique. La migration terminée, le gel est incubé 2 fois 15 minutes dans une solution de Triton X100 2.5 % pour retirer le SDS ; le gel est alors rincé sous un flux d'eau milliQ et mis à incuber pendant 24h dans un tampon adéquate pour l'activité des MMP [Tris 100 mM, CaCl_2 15 mM, pH 7.4] à 37 °C sous agitation.

ii. La zymographie 2D

Les extraits tumoraux (500 μg de protéines) sont préparés pour la zymographie 2D comme pour l'électrophorèse 2D sans ajouter de DTT dans le tampon de réhydratation.

Les gels sont préparés comme décrit ci-dessus, mais en ajoutant avant de les couler une solution de gélatine pour une concentration finale de 675 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

La focalisation est effectuée dans les mêmes conditions que pour l'électrophorèse 2D ; immédiatement après la focalisation les échantillons sont placés du tampon d'équilibration sans DTT ni iodoacétamide pendant 15 minutes sous agitation forte et déposées sur les gels pour la deuxième dimension. Une fois la migration terminée, le gel est incubé 2 fois 15 minutes dans une solution de Triton X100 2.5 % pour retirer le SDS ; le gel est alors rincé sous un flux d'eau milliQ et mis à incuber pendant 24h dans un tampon adéquate pour l'activité des MMP [Tris 100 mM, CaCl_2 15 mM, pH 7.4] à 37 °C sous agitation.

iii. Révélation de l'activité gélatinolytique

La révélation du zymogramme se fait par coloration au bleu de coomassie R250 du gel après incubation dans le tampon Tris 100 mM, CaCl_2 15 mM, pH 7.4. Après les 24h d'incubation, le gel est placé dans une solution de méthanol 40 %, acide acétique 10 %, bleu de coomassie 0.275 % pendant 30 minutes, puis directement pendant 5 minutes dans un bain de méthanol 30 %, acide acétique 10 % pour décolorer les bandes issues de gélatinolyse. Il est ensuite immergé dans une solution d'acide acétique 10 % pour affiner la lisibilité du zymogramme. Le séchage est effectué avec l'appareil Biorad Gel Dryer.

Bibliographie

- Adams, J. C. (2001). "Cell-matrix contact structures." *Cell Mol Life Sci* **58**(3): 371-92.
- Andarawewa, K. L., Boulay, A., Masson, R., Mathelin, C., Stoll, I., Tomasetto, C., Chenard, M. P., Gintz, M., Bellocq, J. P. and Rio, M. C. (2003). "Dual stromelysin-3 function during natural mouse mammary tumor virus-ras tumor progression." *Cancer Res* **63**(18): 5844-9.
- Balbin, M., Fueyo, A., Tester, A. M., Pendas, A. M., Pitiot, A. S., Astudillo, A., Overall, C. M., Shapiro, S. D. and Lopez-Otin, C. (2003). "Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice." *Nat Genet* **35**(3): 252-7.
- Basset, P., Bellocq, J. P., Wolf, C., Stoll, I., Hutin, P., Limacher, J. M., Podhajcer, O. L., Chenard, M. P., Rio, M. C. and Chambon, P. (1990). "A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas." *Nature* **348**(6303): 699-704.
- Bauer, E. A., Eisen, A. Z. and Jeffrey, J. J. (1970). "Immunologic relationship of a purified human skin collagenase to other human and animal collagenases." *Biochim Biophys Acta* **206**(1): 152-60.
- Belotti, D., Paganoni, P., Manenti, L., Garofalo, A., Marchini, S., Taraboletti, G. and Giavazzi, R. (2003). "Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation." *Cancer Res* **63**(17): 5224-9.
- Bernal, F., Hartung, H. P. and Kieseier, B. C. (2005). "Tissue mRNA expression in rat of newly described matrix metalloproteinases." *Biol Res* **38**(2-3): 267-71.
- Bertini, I., Calderone, V., Cosenza, M., Fragai, M., Lee, Y. M., Luchinat, C., Mangani, S., Terni, B. and Turano, P. (2005). "Conformational variability of matrix metalloproteinases: beyond a single 3D structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(15): 5334-9.
- Bode, W. (1995). "A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain." *Structure* **3**(6): 527-30.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X., Huber, R., Zwilling, R. and Stocker, W. (1992). "Structure of astacin and implications for activation of astacins and zinc-ligation of collagenases." *Nature* **358**(6382): 164-7.
- Bode, W., Gomis-Ruth, F. X. and Stockler, W. (1993). "Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'." *FEBS Lett* **331**(1-2): 134-40.
- Bode, W., Reinemer, P., Huber, R., Kleine, T., Schnierer, S. and Tschesche, H. (1994). "The X-ray crystal structure of the catalytic domain of

- human neutrophil collagenase inhibited by a substrate analogue reveals the essentials for catalysis and specificity." Embo J **13**(6): 1263-9.
- Boulay, A., Masson, R., Chenard, M. P., El Fahime, M., Cassard, L., Bellocq, J. P., Sautes-Fridman, C., Basset, P. and Rio, M. C.** (2001). "High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase." Cancer Res **61**(5): 2189-93.
- Bourd-Boittin, K., Fanchon, S., Septier, D., Menashi, S. and Goldberg, M.** (2004). "Métalloprotéases et inhibiteurs de métalloprotéases au cours de l'odontogenèse. Rôle biologique des sous-produits de dégradation matricielle." Les Cahiers de l'ADF **16-17**: 46-55.
- Brinckerhoff, C. E. and Matrisian, L. M.** (2002). "Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(3): 207-14.
- Chan, E. W., Chattopadhyaya, S., Panicker, R. C., Huang, X. and Yao, S. Q.** (2004). "Developing photoactive affinity probes for proteomic profiling: hydroxamate-based probes for metalloproteases." J Am Chem Soc **126**(44): 14435-46.
- Chantrain, C. and DeClerck, Y. A.** (2002). "Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale." MÉDECINE/SCIENCES **5**(18): 565-575.
- Chaussain-Miller, C., Fioretti, F., Goldberg, M. and Menashi, S.** (2006). "The role of matrix metalloproteinases (MMP) in human caries." J Dent Res **85**(1): 22-32.
- Clement, M. and Escher, E.** (2006). "[The methionine proximity assay: an approach to glean receptor structures]." Med Sci (Paris) **22**(12): 1017-8.
- Clement, M., Martin, S. S., Beaulieu, M. E., Chamberland, C., Lavigne, P., Leduc, R., Guillemette, G. and Escher, E.** (2005). "Determining the environment of the ligand binding pocket of the human angiotensin II type I (hAT1) receptor using the methionine proximity assay." J Biol Chem **280**(29): 27121-9.
- Colman, P. M., Jansonius, J. N. and Matthews, B. W.** (1972). "The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution." J Mol Biol **70**(3): 701-24.
- Cornelius, L. A., Nehring, L. C., Harding, E., Bolanowski, M., Welgus, H. G., Kobayashi, D. K., Pierce, R. A. and Shapiro, S. D.** (1998). "Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization." J Immunol **161**(12): 6845-52.
- Cuniasse, P., Devel, L., Makaritis, A., Beau, F., Georgiadis, D., Matziari, M., Yiotakis, A. and Dive, V.** (2005). "Future challenges facing the development of specific active-site-directed synthetic inhibitors of MMP." Biochimie **87**(3-4): 393-402.

- Curci, J. A., Liao, S., Huffman, M. D., Shapiro, S. D. and Thompson, R. W. (1998). "Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms." J Clin Invest **102**(11): 1900-10.
- David, A., Steer, D., Bregant, S., Devel, L., Makaritis, A., Beau, F., Yiotakis, A. and Dive, V. (2007). "Cross-Linking Yield Variation of a Potent Matrix Metalloproteinase Photoaffinity Probe and Consequences for Functional Proteomics." Angew Chem Int Ed Engl **46**(18): 3275-3277.
- Dennis, M., Giraudat, J., Kotzyba-Hibert, F., Goeldner, M., Hirth, C., Chang, J. Y., Lazure, C., Chretien, M. and Changeux, J. P. (1988). "Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site." Biochemistry **27**(7): 2346-57.
- Devel, L., Rogakos, V., David, A., Makaritis, A., Beau, F., Cuniasse, P., Yiotakis, A. and Dive, V. (2006). "Development of selective inhibitors and substrate of matrix metalloproteinase-12." J Biol Chem **281**(16): 11152-60.
- Dive, V., Cotton, J., Yiotakis, A., Michaud, A., Vassiliou, S., Jiracek, J., Vazeux, G., Chauvet, M. T., Cuniasse, P. and Corvol, P. (1999). "RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4330-5.
- Egeblad, M. and Werb, Z. (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-74.
- Engel, C. K., Pirard, B., Schimanski, S., Kirsch, R., Habermann, J., Klingler, O., Schlotte, V., Weithmann, K. U. and Wendt, K. U. (2005). "Structural basis for the highly selective inhibition of MMP-13." Chem Biol **12**(2): 181-9.
- Evans, M. J. and Cravatt, B. F. (2006). "Mechanism-based profiling of enzyme families." Chem Rev **106**(8): 3279-301.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B. R. and Delaisse, J. (2000). "Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases." FEBS Lett **486**(3): 247-51.
- Fingleton, B. (2007). "Matrix metalloproteinases as valid clinical targets." Curr Pharm Des **13**(3): 333-46.
- Fleming, S. (1995). "Chemical Reagents in photoaffinity labeling." tetrahedron **51**(46): 12479-12520.
- Folgueras, A. R., Pendas, A. M., Sanchez, L. M. and Lopez-Otin, C. (2004). "Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies." Int J Dev Biol **48**(5-6): 411-24.
- Freije, J. M., Diez-Itza, I., Balbin, M., Sanchez, L. M., Blasco, R., Tolivia, J. and Lopez-Otin, C. (1994). "Molecular cloning and expression of

- collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas." *J Biol Chem* **269**(24): 16766-73.
- Galloway, W. A., Murphy, G., Sandy, J. D., Gavrilovic, J., Cawston, T. E. and Reynolds, J. J.** (1983). "Purification and characterization of a rabbit bone metalloproteinase that degrades proteoglycan and other connective-tissue components." *Biochem J* **209**(3): 741-52.
- Gomis-Ruth, F. X., Gohlke, U., Betz, M., Knauper, V., Murphy, G., Lopez-Otin, C. and Bode, W.** (1996). "The helping hand of collagenase-3 (MMP-13): 2.7 A crystal structure of its C-terminal haemopexin-like domain." *J Mol Biol* **264**(3): 556-66.
- Gomis-Ruth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. and Bode, W.** (1997). "Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1." *Nature* **389**(6646): 77-81.
- Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallourous, I., Vassiliou, S., Zwilling, R., Bode, W. and Stocker, W.** (1996). "Structure of astacin with a transition-state analogue inhibitor." *Nat Struct Biol* **3**(8): 671-5.
- Greenbaum, D. C., Arnold, W. D., Lu, F., Hayrapetian, L., Baruch, A., Krumrine, J., Toba, S., Chehade, K., Bromme, D., Kuntz, I. D. and Bogoy, M.** (2002). "Small molecule affinity fingerprinting. A tool for enzyme family subclassification, target identification, and inhibitor design." *Chem Biol* **9**(10): 1085-94.
- Gross, J. and Lapiere, C. M.** (1962). "Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay." *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**: 1014-22.
- Gross, J. and Nagai, Y.** (1965). "Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme." *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**(4): 1197-204.
- Gururajan, R., Grenet, J., Lahti, J. M. and Kidd, V. J.** (1998). "Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3." *Genomics* **52**(1): 101-6.
- Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A. and Kalluri, R.** (2003). "Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin." *Cancer Cell* **3**(6): 589-601.
- Hatanaka, Y. and Sadakane, Y.** (2002). "Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier." *Curr Top Med Chem* **2**(3): 271-88.
- Hautamaki, R. D., Kobayashi, D. K., Senior, R. M. and Shapiro, S. D.** (1997). "Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice." *Science* **277**(5334): 2002-4.

- Hayakawa, T., Yamashita, K., Tanzawa, K., Uchijima, E. and Iwata, K. (1992). "Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum." FEBS Lett **298**(1): 29-32.
- Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J. M., Senior, R. M. and Shibuya, M. (2002). "MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis." Cancer Cell **2**(4): 289-300.
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., Mankani, M., Robey, P. G., Poole, A. R., Pidoux, I., Ward, J. M. and Birkedal-Hansen, H. (1999). "MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover." Cell **99**(1): 81-92.
- Horovitz, A. and Levitzki, A. (1987). "An accurate method for determination of receptor-ligand and enzyme-inhibitor dissociation constants from displacement curves." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(19): 6654-8.
- Houghton, A. M., Grisolano, J. L., Baumann, M. L., Kobayashi, D. K., Hautamaki, R. D., Nehring, L. C., Cornelius, L. A. and Shapiro, S. D. (2006). "Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases." Cancer Res **66**(12): 6149-55.
- Huang, S., Van Arsdall, M., Tedjarati, S., McCarty, M., Wu, W., Langley, R. and Fidler, I. J. (2002). "Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice." J Natl Cancer Inst **94**(15): 1134-42.
- Ito, A. and Nagase, H. (1988). "Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase." Arch Biochem Biophys **267**(1): 211-6.
- Jeffrey, J. J. and Gross, J. (1970). "Collagenase from rat uterus. Isolation and partial characterization." Biochemistry **9**(2): 268-73.
- Jiracek, J., Yiotakis, A., Vincent, B., Checler, F. and Dive, V. (1996). "Development of the first potent and selective inhibitor of the zinc endopeptidase neurolysin using a systematic approach based on combinatorial chemistry of phosphinic peptides." J Biol Chem **271**(32): 19606-11.
- Jiracek, J., Yiotakis, A., Vincent, B., Lecoq, A., Nicolaou, A., Checler, F. and Dive, V. (1995). "Development of highly potent and selective phosphinic peptide inhibitors of zinc endopeptidase 24-15 using combinatorial chemistry." J Biol Chem **270**(37): 21701-6.
- Johnson, J. L., George, S. J., Newby, A. C. and Jackson, C. L. (2005). "Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(43): 15575-80.

- Jost, M., Folgueras, A. R., Frerart, F., Pendas, A. M., Blacher, S., Houard, X., Berndt, S., Munaut, C., Cataldo, D., Alvarez, J., Melen-Lamalle, L., Foidart, J. M., Lopez-Otin, C. and Noel, A. (2006). "Earlier onset of tumoral angiogenesis in matrix metalloproteinase-9-deficient mice." Cancer Res 66(10): 5234-41.
- Karney, W. L. and Brorden, W. T. (1997). "Why Does o-Fluorine Substitution Raise the Barrier to Ring Expansion of Phenylnitrene?" J Am Chem Soc 119(14): 3347-3350.
- Kessler, P., Thai, R., Beau, F., Tarride, J. L. and Menez, A. (2006). "Photocrosslinking/label transfer: A key step in mapping short alpha-neurotoxin binding site on nicotinic acetylcholine receptor." Bioconjug Chem 17(6): 1482-91.
- Kevorkian, L., Young, D. A., Darrah, C., Donell, S. T., Shepstone, L., Porter, S., Brockbank, S. M., Edwards, D. R., Parker, A. E. and Clark, I. M. (2004). "Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage." Arthritis Rheum 50(1): 131-41.
- Kleiner, D. E. and Stetler-Stevenson, W. G. (1994). "Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases." Anal Biochem 218(2): 325-9.
- Kotzyba-Hibert, F., Kapfer, I. and Goeldner, M. (1995). "Recent Trends in Photoaffinity Labeling." Angew Chem Int Ed Engl 34: 1296-1312.
- Lacks, S. A. and Springhorn, S. S. (1980). "Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate." J Biol Chem 255(15): 7467-73.
- Liotta, L. A., Tryggvason, K., Garbisa, S., Hart, I., Foltz, C. M. and Shafie, S. (1980). "Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen." Nature 284(5751): 67-8.
- Liu, Y., Patricelli, M. P. and Cravatt, B. F. (1999). "Activity-based protein profiling: the serine hydrolases." Proc Natl Acad Sci U S A 96(26): 14694-9.
- Longo, G. M., Buda, S. J., Fiotta, N., Xiong, W., Griener, T., Shapiro, S. and Baxter, B. T. (2005). "MMP-12 has a role in abdominal aortic aneurysms in mice." Surgery 137(4): 457-62.
- Lopez-Otin, C. and Overall, C. M. (2002). "Protease degradomics: a new challenge for proteomics." Nat Rev Mol Cell Biol 3(7): 509-19.
- Lukashev, M. E. and Werb, Z. (1998). "ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour." Trends Cell Biol 8(11): 437-41.
- Luttun, A., Lutgens, E., Manderveld, A., Maris, K., Collen, D., Carmeliet, P. and Moons, L. (2004). "Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth." Circulation 109(11): 1408-14.

- Manes, S., Mira, E., Barbacid, M. M., Cipres, A., Fernandez-Resa, P., Buesa, J. M., Merida, I., Aracil, M., Marquez, G. and Martinez, A. C.** (1997). "Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3." J Biol Chem **272**(41): 25706-12.
- Marchenko, G. N., Marchenko, N. D. and Strongin, A. Y.** (2003). "The structure and regulation of the human and mouse metalloproteinase-21 gene and protein." Biochem J **372**(Pt 2): 503-15.
- Mohan, R., Sivak, J., Ashton, P., Russo, L. A., Pham, B. Q., Kasahara, N., Raizman, M. B. and Fini, M. E.** (2000). "Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B." J Biol Chem **275**(14): 10405-12.
- Morgan, A. R., Rerkasem, K., Gallagher, P. J., Zhang, B., Morris, G. E., Calder, P. C., Grimble, R. F., Eriksson, P., McPheat, W. L., Shearman, C. P. and Ye, S.** (2004). "Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics." Stroke **35**(6): 1310-5.
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U. and Tryggvason, K.** (2002). "Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7414-9.
- Morris, D. G., Huang, X., Kaminski, N., Wang, Y., Shapiro, S. D., Dolganov, G., Glick, A. and Sheppard, D.** (2003). "Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema." Nature **422**(6928): 169-73.
- Mott, J. D. and Werb, Z.** (2004). "Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases." Curr Opin Cell Biol **16**(5): 558-64.
- Mourot, A., Rodrigo, J., Kotzyba-Hibert, F., Bertrand, S., Bertrand, D. and Goeldner, M.** (2006). "Probing the reorganization of the nicotinic acetylcholine receptor during desensitization by time-resolved covalent labeling using [3H]AC5, a photoactivatable agonist." Mol Pharmacol **69**(2): 452-61.
- Mudgett, J. S., Hutchinson, N. I., Chartrain, N. A., Forsyth, A. J., McDonnell, J., Singer, II, Bayne, E. K., Flanagan, J., Kawka, D., Shen, C. F., Stevens, K., Chen, H., Trumbauer, M. and Visco, D. M.** (1998). "Susceptibility of stromelysin 1-deficient mice to collagen-induced arthritis and cartilage destruction." Arthritis Rheum **41**(1): 110-21.
- Murphy, G. and Crabbe, T.** (1995). "Gelatinases A and B." Methods Enzymol **248**: 470-84.
- Murphy, G. and Knauper, V.** (1997). "Relating matrix metalloproteinase structure to function: why the "hemopexin" domain?" Matrix Biol **15**(8-9): 511-8.

- Nachon, F., Ehret-Sabatier, L., Loew, D., Colas, C., van Dorsselaer, A. and Goeldner, M. (1998). "Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF." *Biochemistry* **37**(29): 10507-13.
- Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." *J Biol Chem* **274**(31): 21491-4.
- Nuttall, R. K., Sampieri, C. L., Pennington, C. J., Gill, S. E., Schultz, G. A. and Edwards, D. R. (2004). "Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development." *FEBS Lett* **563**(1-3): 129-34.
- Pei, D. (1999). "CA-MMP: a matrix metalloproteinase with a novel cysteine array, but without the classic cysteine switch." *FEBS Lett* **457**(2): 262-70.
- Pei, D. and Weiss, S. J. (1995). "Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen." *Nature* **375**(6528): 244-7.
- Pendas, A. M., Folgueras, A. R., Llano, E., Caterina, J., Frerard, F., Rodriguez, F., Astudillo, A., Noel, A., Birkedal-Hansen, H. and Lopez-Otin, C. (2004). "Diet-induced obesity and reduced skin cancer susceptibility in matrix metalloproteinase 19-deficient mice." *Mol Cell Biol* **24**(12): 5304-13.
- Pendas, A. M., Knauper, V., Puente, X. S., Llano, E., Mattei, M. G., Apte, S., Murphy, G. and Lopez-Otin, C. (1997). "Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution." *J Biol Chem* **272**(7): 4281-6.
- Powell, W. C., Fingleton, B., Wilson, C. L., Boothby, M. and Matrisian, L. M. (1999). "The metalloproteinase matrilysin proteolytically generates active soluble Fas ligand and potentiates epithelial cell apoptosis." *Curr Biol* **9**(24): 1441-7.
- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Overall, C. M. and Lopez-Otin, C. (2003). "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach." *Nat Rev Genet* **4**(7): 544-58.
- Rio, M. C. (2005). "From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation." *Biochimie* **87**(3-4): 299-306.
- Rosenthal, A. L. and Lacks, S. A. (1977). "Nuclease detection in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis." *Anal Biochem* **80**(1): 76-90.
- Saghatelian, A., Jessani, N., Joseph, A., Humphrey, M. and Cravatt, B. F. (2004). "Activity-based probes for the proteomic profiling of metalloproteases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10000-5.
- Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E. and Seiki, M. (1994). "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells." *Nature* **370**(6484): 61-5.

- Shapiro, S. D.** (1998). "Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences." *Curr Opin Cell Biol* **10**(5): 602-8.
- Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C. and Lin, R. H.** (2001). "A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression." *Cancer Res* **61**(1): 237-42.
- Shipley, J. M., Wesselschmidt, R. L., Kobayashi, D. K., Ley, T. J. and Shapiro, S. D.** (1996). "Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(9): 3942-6.
- Stocker, W., Grams, F., Baumann, U., Reinemer, P., Gomis-Ruth, F. X., McKay, D. B. and Bode, W.** (1995). The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**: 823-40.
- Tomizawa, M., Talley, T. T., Maltby, D., Durkin, K. A., Medzihradzsky, K. F., Burlingame, A. L., Taylor, P. and Casida, J. E.** (2007). "Mapping the elusive neonicotinoid binding site." *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Van Wart, H. E. and Birkedal-Hansen, H.** (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(14): 5578-82.
- Velasco, G., Pendas, A. M., Fueyo, A., Knauper, V., Murphy, G. and Lopez-Otin, C.** (1999). "Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members." *J Biol Chem* **274**(8): 4570-6.
- Visse, R. and Nagase, H.** (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res* **92**(8): 827-39.
- Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Miyoshi, E., Noda, K., Li, W., Mizuno-Horikawa, Y., Nakano, M., Asahi, M., Takahashi, M., Uozumi, N., Ihara, S., Lee, S. H., Ikeda, Y., Yamaguchi, Y., Aze, Y., Tomiyama, Y., Fujii, J., Suzuki, K., Kondo, A., Shapiro, S. D., Lopez-Otin, C., Kuwaki, T., Okabe, M., Honke, K. and Taniguchi, N.** (2005). "Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 15791-6.
- Welgus, H. G., Stricklin, G. P., Eisen, A. Z., Bauer, E. A., Cooney, R. V. and Jeffrey, J. J.** (1979). "A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts." *J Biol Chem* **254**(6): 1938-43.

- Whittaker, M., Floyd, C. D., Brown, P. and Gearing, A. J. (1999). "Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors." Chem Rev **99**(9): 2735-76.
- Wilson, C. L., Ouellette, A. J., Satchell, D. P., Ayabe, T., Lopez-Boado, Y. S., Stratman, J. L., Hultgren, S. J., Matrisian, L. M. and Parks, W. C. (1999). "Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense." Science **286**(5437): 113-7.
- Yiallourous, I., Grosse Berkhoff, E. and Stocker, W. (2000). "The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases." FEBS Lett **484**(3): 224-8.
- Yiotakis, A., Vassiliou, S., Jiracek, J. and Dive, V. (1996). "Protection of the Hydroxyphosphinyl Function of Phosphinic Dipeptides by Adamantyl. Application to the Solid-Phase Synthesis of Phosphinic Peptides." J Org Chem **61**(19): 6601-6605.
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. (2000). "Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis." Genes Dev **14**(2): 163-76.
- Zaman, M. A., Oparil, S. and Calhoun, D. A. (2002). "Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system." Nat Rev Drug Discov **1**(8): 621-36.
- Zhou, Z., Apte, S. S., Soininen, R., Cao, R., Baaklini, G. Y., Rauser, R. W., Wang, J., Cao, Y. and Tryggvason, K. (2000). "Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4052-7.

Publication

A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker

Angewandte Chemie

International Edition

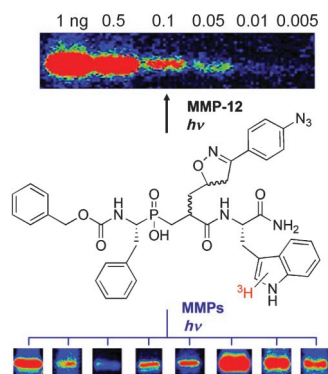


 WILEY-VCH

REPRINT

Functional Proteomics

Cross-Linking Yield Variation of a Potent Matrix Metalloproteinase Photoaffinity Probe and Consequences for Functional Proteomics



Probing proteinases: A radioactive photoaffinity probe exhibiting subnanomolar potency towards matrix metalloproteinases (MMPs) has been developed (see structure). High sensitivity in the detection of particular MMPs has been obtained; however, high variation in the cross-linking yield of MMPs with this probe may limit its ability to detect all MMP active forms in biological samples. This result suggests that a cocktail of optimized probes should be developed.

A. David, D. Steer, S. Bregant, L. Devel, A. Makaritis, F. Beau, A. Yiotakis, V. Dive* _____ 3275–3277

Keywords: inhibitors · metalloproteinases · photoaffinity probes · protein profiling · proteomics

2007 – 46/18

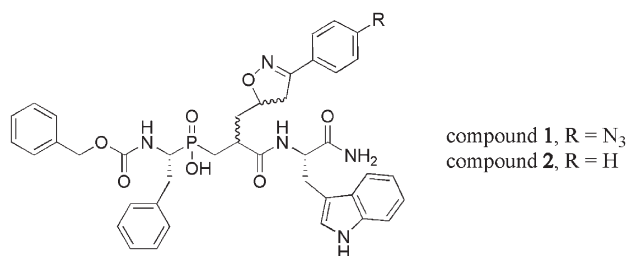
Cross-Linking Yield Variation of a Potent Matrix Metalloproteinase Photoaffinity Probe and Consequences for Functional Proteomics**

Arnaud David, David Steer, Sarah Bregant, Laurent Devel, Anastasios Makaritis, Fabrice Beau, Athanasios Yiotakis, and Vincent Dive*

Recent developments in proteomic technology offer tremendous potential to provide novel biomarkers for diagnosis of early-stage diseases or identification of patients at higher risk of dying.^[1] Among the new proteomic approaches recently developed, activity-based protein profiling (ABPP) technologies use active-site-directed probes to profile the active forms of enzymes in complex proteomes.^[2,3] ABPP probes have been shown to selectively label active enzymes but not their zymogen or inhibitor-bound forms. Thus changes in enzyme activity can be detected by these probes, independently from posttranslational controls.^[2,3] The ABPP approach has been successfully applied to profile serine proteinases with fluorophosphonates^[4] and cysteine proteinases with epoxides^[5] as the irreversible inhibitors. To profile zinc proteinases, the largest family of proteases in humans (159 members),^[6] photolabile groups have been incorporated into the ABPP probes for covalent modification of these enzymes, due to a lack of conserved nucleophiles in their active sites; this has led to the discovery of some elevated zinc proteinase activities in disease states.^[7–9] However, in the specific case of matrix metalloproteinases (MMPs, a group of 23 closely related members in humans^[10]), this approach failed to detect active forms of MMPs produced by cancer cells or in tumors,^[8,9] despite the over-expression of MMPs that has been reported in these contexts.^[11] It has been argued that MMPs are mostly present in inactive forms (zymogen and inhibitor-bound forms). Thus the active forms of MMPs may exist in complex proteomes at levels below the current detection limits of ABPP technologies.^[9] Therefore, ABPP probes able to detect low levels of the MMP active forms (in the femtomolar range) are still required and the factors controlling probe sensitivity should be further investigated.

The present study was designed first to address the sensitivity issue and also to determine how the yields of MMP covalent modification by a specific ABPP probe affect the detection threshold for these enzymes.

Prior studies have shown that phosphinic peptides containing isoxazole or isoxazoline side chains in their P₁' position behaved as potent MMP inhibitors.^[12–14] This led us to design and synthesize the photolabile compound **1** for the present project.



As shown in Table 1, compound **1** displayed high potency toward several MMPs. The isoxazoline side chain in compound **1** is expected to fill the S₁' subsite of the MMPs, thereby

Table 1: Potencies of compounds **1** and **2** toward human MMPs.

	MMP							
	2	3	8	9	11	12	13	14
K _i with 1 _{F1} [nM] ^[a]	0.7	13	0.8	0.75	0.2	0.65	0.4	3.5
K _i with 2 _{F1} [nM] ^[a]	1.1	215	1.2	0.9	1	0.4	0.45	5

[a] The diastereomers of compounds **1** and **2** were resolved by HPLC. The reported inhibition constant (K_i) values are those of the most potent isomers (F₁).

placing the azido group inside a very deep cavity conserved in most MMPs. Compound **2**, which lacks the azido group, exhibited similar potency toward the MMPs, a result showing that the azido group in **1** is well tolerated by the MMP S₁' cavities.

Compound **1** was radiolabeled with tritium. This radioactive tag was preferred to a fluorescent one, as the latter involves chemical modification of the probe with bulky and hydrophobic groups. Moreover, the radioactive specificity of probe **1** (8 Ci mmol⁻¹) allows covalent MMP–probe complexes to be detected with high sensitivity and the radioactive signal provides a means to quantify the cross-linking efficiencies of the probe with different MMPs.

[*] A. David,^[a] Dr. D. Steer,^[a] Dr. S. Bregant, Dr. L. Devel, F. Beau, Dr. V. Dive
CEA, Institut de Biologie et des Technologies de Saclay (iBiTecS)
Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO)
91191 Gif/Yvette Cedex (France)
Fax: (+33) 1-6908-9071
E-mail: vincent.dive@cea.fr

Dr. A. Makaritis, Prof. Dr. A. Yiotakis
Laboratory of Organic Chemistry
University of Athens
Panepistimiopolis, Zografou
15771 Athens (Greece)

[†] These authors contributed equally to this work.

[**] This work was supported by funds from FP6RDT (LSHC-CT-2003-503297).

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

As shown in Figure 1 A, incubation of compound **1** with MMP-12, followed by UV irradiation, led to radioactive labeling of MMP-12. By contrast, no labeling was observed without the UV irradiation. These results indicate that the

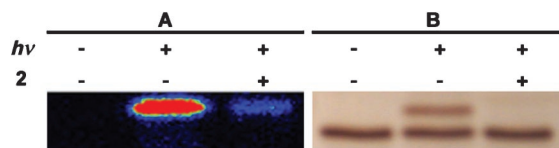


Figure 1. Covalent labeling of MMP-12 by compound **1**. A) MMP-12 (50 ng) was incubated with compound **1** (2 μM) for 10 min, either with or without compound **2** (11 μM), before UV irradiation (*hν*, 2 min). The MMP-12 complex was resolved by 1D sodium dodecylsulfate PAGE electrophoresis, then proteins were transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane that was analyzed with a radioimager. B) Results of the same experiments but with the protein visualized on the gel by silver staining (MMP-12, 100 ng).

observed radioactive signal reflects only the presence of a covalent enzyme–inhibitor complex on the PVDF membrane, after electrophoresis separation. To demonstrate that this covalent modification only concerns the active site, MMP-12 was first preincubated with compound **2**, and this was followed by addition of compound **1** and UV irradiation. Under these conditions, no radioactive signal can be detected, a result indicating that compound **1** only labels the active site of MMP-12 when it is free of inhibitor. Interestingly, silver staining of a gel loaded with UV-irradiated MMP-12 in complex with compound **1** revealed two bands (Figure 1 B), whereas a single band was observed in the absence of irradiation. Comparison of these results with those obtained by the radioimagery analysis of the same samples indicates that the upper band visualized with the silver staining corresponds to the MMP-12 form covalently modified by compound **1**, while the lower band is the unmodified form of MMP-12. This interpretation is also supported by competition experiments. Indeed, when MMP-12 was preincubated with compound **2** before compound **1** was added and the photoirradiation took place, a single band was observed by silver staining (Figure 1 B). As a consequence, the ratio of the band intensities visualized by silver staining reflects the yield of MMP-12 cross-linking by compound **1**. This approach provides a cross-linking yield of (42 \pm 5) % for compound **1** with MMP-12 (average of three replicates).

The sensitivity of compound **1** for the detection of MMP-12 was determined by incubation of this compound with serial dilutions of MMP-12. As shown in Figure 2, as few as 50 pg of MMP-12 can be detected with compound **1** (2.5 fmol of MMP-12 at 100 pM concentration).

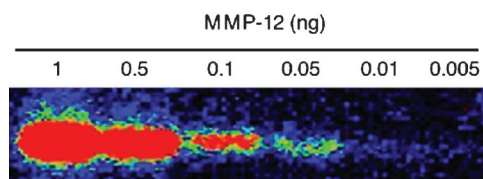


Figure 2. Sensitivity of compound **1** (2 μM) for the detection of MMP-12.

Finally, the yields of covalent modification of eight MMPs also possessing a deep S_1' cavity were determined with compound **1**. Experiments were performed by using the same number of active MMP catalytic units, as determined for each MMP by careful titration experiments with a highly potent MMP inhibitor. The results (Figure 3) demonstrate that compound **1** cross-links with all of the examined MMPs, as reflected by the radioactivity incorporation, but with a 40-fold difference in efficacy.

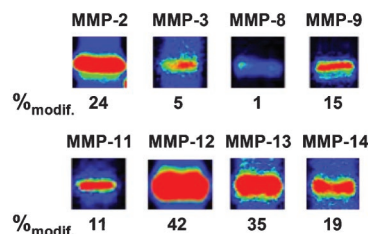


Figure 3. Covalent modification of various MMPs (1 pmol of active MMP) by compound **1** (2 μM). The percentage of modification was calculated by counting the radioactivity incorporated in each MMP, with the 42% yield determined for MMP-12 as a reference value.

From the above results, comparable sensitivity in detection can be expected for MMP-12, -13, -2, and -14 with compound **1**, but depending on their expression levels in complex proteomes, MMP-3 and MMP-8 might be hardly detected with the present probe. It is worth mentioning that cross-linking yields were not determined in previous reports on the development of ABPP probes to profile MMPs.^[7–9] From the structure of these probes, it can be anticipated that the MMP residues possibly modified by these probes belong to surface solvent-exposed subsactive sites,^[7–9] a situation that should result in higher variability of the probe cross-linking yield with different MMPs. To avoid huge variation in cross-linking yields and possible failure to detect some MMPs, it seems mandatory to more systematically evaluate the influence of the photolabile-group type^[15,16] and its position within the probe structure, in order to deliver a single probe able to modify each MMP with high yield. Whether such an ideal probe exists remains uncertain; however, an alternative possibility to resolve this hurdle would be to use a cocktail of MMP-optimized probes, instead a single one. Given the size of the MMP S_1' cavity, the development of compound **1** analogues containing benzophenone or diazirine photolabile groups may lead to a set of ABPP probes that will allow the sensitive detection of all MMP members.

In conclusion, we have developed a new MMP photoaffinity probe, which displays high potency towards MMPs and is able to covalently modify several members of this family. With a detection limit of 2.5 fmol for MMP-12, compound **1** is one of the most sensitive probes reported to date for MMPs. (A 60-fmol detection limit has been reported for MMP-2.^[8]) MMP-12 has been implicated in several human diseases.^[17–19] Thus the ABPP probe reported in this paper offers a simple and efficient strategy to detect the expression of MMP-12 active forms in biopsies or fluids relevant for these pathologies. Other MMPs may also be detected with

this probe, but with the limitations mentioned above. Preparation of a probe cocktail is underway to address this challenging issue.

Received: October 27, 2006

Revised: December 20, 2006

Published online: March 23, 2007

Keywords: inhibitors · metalloproteinases · photoaffinity probes · protein profiling · proteomics

-
- [1] S. Hanash, *Nature* **2003**, *422*, 226–232.
- [2] D. Kato, K. M. Boatright, A. B. Berger, T. Nazif, G. Blum, C. Ryan, K. A. Chehade, G. S. Salvesen, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 33–38.
- [3] N. Jessani, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 54–59.
- [4] Y. Lui, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [5] D. Greenbaum, K. M. Medzihradzky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 568–581.
- [6] C. Lopez-Otin, C. M. Overall, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 509–519.
- [7] E. W. Chan, S. Chattopadhyaya, R. C. Panicker, X. Huang, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14435–14446.
- [8] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10000–10005.
- [9] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 274–281.
- [10] H. Nagase, J. F. Woessner Jr., *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21491–21494.
- [11] C. M. Overall, O. Kleifeld, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 227–239.
- [12] A. Makaritis, D. Georgiadis, V. Dive, A. Yiotakis, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2079–2094.
- [13] V. Dive, D. Georgiadis, M. Matziari, A. Makaritis, F. Beau, P. Cuniasse, A. Yiotakis, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2010–2019.
- [14] L. Devel, V. Rogakos, A. David, A. Makaritis, F. Beau, P. Cuniasse, A. Yiotakis, V. Dive, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11152–11160.
- [15] S. A. Fleming, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12479–12520.
- [16] G. Dormán, G. N. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.
- [17] R. D. Hautamaki, D. K. Kobayashi, R. M. Senior, S. D. Shapiro, *Science* **1997**, *277*, 2002–2004.
- [18] I. K. Demedts, A. Morel-Montero, S. Lebecque, Y. Pacheco, D. Cataldo, G. F. Joos, R. A. Pauwels, G. G. Brusselle, *Thorax* **2006**, *61*, 196–201.
- [19] J. L. Johnson, S. J. George, A. C. Newby, C. L. Jackson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15575–15580.
-



Supporting Information

© Wiley-VCH 2007

69451 Weinheim, Germany

Cross-linking yield variation of a potent MMP photoaffinity probe and consequences for functional proteomics

Arnaud David[§], David Steer[§], Sarah Bregant, Laurent Devel, Anastasios Makaritis, Fabrice Beau, Athanasios Yiotakis and Vincent Dive*

[*] A. David, Dr. D. Steer, Dr. S. Bregant, Dr. L. Devel, F. Beau, Dr. V. Dive
CEA, Commissariat à l'Energie Atomique
DIEP, Bat 152, CE-Saclay
91191 Gif/Yvette Cedex (France)
Fax: (+33) 1-69-08-XX-XX
E-mail: vincent.dive@cea.fr

Dr. A. Makaritis, Prof. Dr. A. Yiotakis
Laboratory of Organic Chemistry
University of Athens
Panepistimiopolis, Zografou
15771 Athens (Greece)

[§] These authors have contributed equally

Table of contents

I - Materials	S2
II - Experimental synthetic procedures and characterizations	S2
<i>synthetic route scheme to azido derivative 1</i>	<i>S3</i>
<i>compounds 3 to 6</i>	<i>S4-S5</i>
<i>compounds 7 to 10</i>	<i>S5-S7</i>
<i>azido derivative 1 and radiolabelling</i>	<i>S8-S9</i>
III - Methods	S10
<i>Inhibition studies</i>	
<i>Enzyme Titration</i>	
<i>Photolabeling Experiments</i>	
<i>Electrophoresis:</i>	
<i>Blotting</i>	
<i>Silver staining</i>	
IV - Supporting information references	S11

I - Materials

Commercial reagents were used as received without additional purification. Solvents were of the reagent grade available. DCM (methylene chloride) and chloroform were dried over calcium hydride and distilled. Unless otherwise mentioned, all NMR experiments were performed on a NMR spectrometer operating at 250 MHz and 62.9 MHz respectively for ^1H and ^{13}C observations. Data acquisition and processing were realized using X-win NMR software. NMR Data are reported as follows : chemical shift, multiplicity (s= singlet, d= doublet, t= triplet, q= quadruplet, br= broad, m= multiplet), integration and coupling constants (Hz). Chemical shifts are reported in ppm with the solvent as internal standard (CDCl_3 : ^1H 7,28 ppm and ^{13}C 77,0 ppm).

High-resolution mass spectrometry experiments were performed on a hybrid instrument LTQ-ORBITRAPTM - ThermoElectron Corporation .

Analytical and preparative RP-HPLC separations were respectively performed on a Thermo separation product and Gilson apparatus using analytical AIT C18 Kromasil (250x4,6 mm) or C18 Kromasil (250x4,6 mm) and semi-preparative AIT C18 Kromasil (250x20 mm) columns, with a flow rate of 1 and 3 ml.min⁻¹ respectively. Detection was performed at 230 nm. Solvent systems consisting of (A) 0,1% TFA in 90% water-10% acetonitrile and (B) 0,09% TFA in 90% acetonitrile-10% water were used. Analysis of radioactive compound **2** was performed by liquid chromatography using a Perkin Elmer 200 HPLC system (C18 Kromasil (150x4,6 mm) column, flow rate : 1 mL.min⁻¹) linked to a radioflow detector (Z 500-4 cell, Berthold).

Human MMPs were from R&D systems. Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ was from Novabiochem.

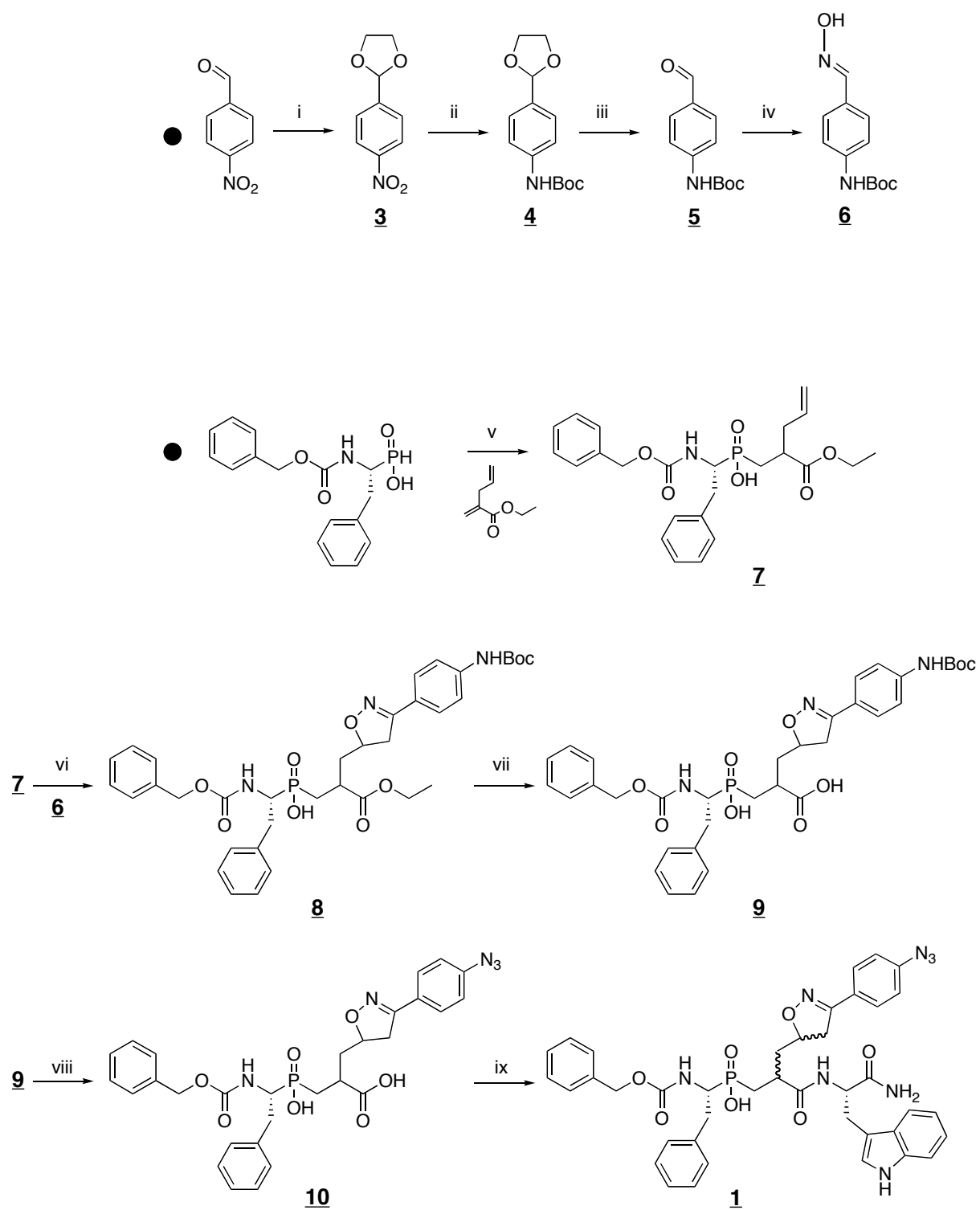
The irradiating apparatus was composed of a 1000W mercury lamp (Osram), an aperture and a series of lenses focusing the polychromatic light to a monochromator (Jobin-Yvon); a series of lenses to focus the monochromatic light to a thermostat support, in which eppendorf tube containing the mixture to irradiate is inserted. Light intensity was measured with a radiometer IL1700 (International Light, Newburyport, MA).

Radioactivity analysis of proteins present on the PVDF membranes was achieved using the beta ImagerTM 2000 from Biospace (Paris, France). This apparatus allows an absolute counting of the tritium beta particles, with a detection threshold of 0.007 cpm/mm² for tritium, making possible to perform quantitative analysis of the radioactivity labelling of different samples.

II - Experimental synthetic procedures and characterizations

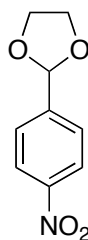
The synthetic route to obtain compound **1** is outlined below. Compound **2** was synthesized following the same synthetic route, full characterization of this compound will be reported elsewhere, as well as a full set of related isoxazoline containing phosphinic peptides.

Synthetic route to azido derivative 1



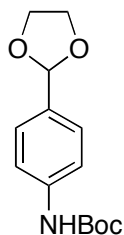
i - PTSA, ethylene glycol, toluene **ii** - H_2/PtO_2 , THF/ H_2O then Boc_2O , NaOH 1M, dioxan/ H_2O **iii** - PTSA, acetone **iv** - NH_2OH , NaOH 1M, $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ **v** - HMDS, Δ **vi** - NCS, CHCl_3 , Et_3N **vii** - LiOH, Et_3N , THF **viii** - NaNO_2 , TFA then NaN_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ **ix** - $\text{HCl}\cdot\text{TrpNH}_2$, EDC, HOBT, DIEA, CH_2Cl_2

2-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxolane **3**.²



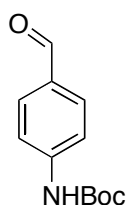
4-nitrobenzaldehyde (250mg, 1,66mmol) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (16mg, 0,08mmol) were dissolved in toluene (5mL). Ethylene glycol (1,8mL) was added and the solution was refluxed with a Dean-Stark trap to remove water. After 3 hours, the solution was allowed to cool at room temperature and was washed with saturated NaHCO₃ solution and a brine solution. The solution was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under high vacuum to yield an off white solid of crystalline needles (276mg, 85%). Compound **3** can be recrystallised from cyclohexane/EtOAc to yield white needles (253mg, 78%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 4.11 (m, 4H), 5.89 (s, 1H), 7.64 and 8.21 (2d, 4H) ; ¹³C NMR (CDCl₃) δ 65.47 (CH₂), 102.22 (CH), 123.60 (CH), 127.42 (CH).

2-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-1,3-dioxolane **4**.



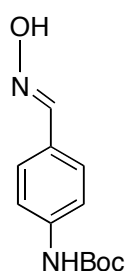
PtO₂ (20mg) was added to a solution of 2-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxolane **3** (300mg, 1,54mmol) in THF/Ethanol mixture (1/1, 5mL). The resulting suspension was stirred under 4 bar pressure of hydrogen for 5 hours. The suspension was then dried over Na₂SO₄ and solids were removed by filtration through Celite. The filtrate was concentrated to afford a yellow oil (48mg) directly used in next step. Crude 4-(1,3)-dioxolan-2-yl aniline was dissolved in dioxan/water mixture (1/1, 6mL) and aqueous NaOH (1M, 2,4mL) was added. Boc₂O (430mg, 2,31mmol) was then added to the mixture and reaction was stirred at room temperature for 48 hours. Dioxan was removed under vacuum, water (5mL) was added and the aqueous layer was extracted with chloroform (3x5mL). Organic layer was then washed with 1M aqueous solution of HCl (3x5mL). The solution was dried (Na₂SO₄) and evaporated under high vacuum to yield compound **4**, as a yellow oil (293mg, 72%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.53 (s, 9H), 4.02 (m, 2H), 4.12 (m, 2H), 5.78 (s, 1H), 6.60 (br, 1H), 7.41 (d, 4H); ¹³C NMR (DEPT, CDCl₃) δ 28.75 (CH₃), 65.62 (CH₂), 103.97 (CH), 118.56 (CH), 127.70 (CH).

4-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-benzaldehyde **5**.³



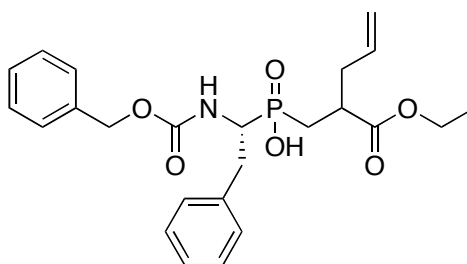
To a solution of 2-(4-(*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-1,3-dioxolane **4** (1,84g, 6,95mmol) in acetone (20mL) was slowly added *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (0,659g, 3,5mmol). The solution was stirred for 1 hour at room temperature. Acetone was removed and the resulting residue was dissolved in ethyl acetate (20mL). The organic layer was washed with water (10mL), saturated NaHCO₃ solution (2x5mL) and a brine solution (20mL). The organic layer was then dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum to yield compound **5**, as a yellow oil (1,45g, 94%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.53 (s, 9H), 6.77 (br, 1H), 7.55 (d, 2H, 5Hz), 7.84 (d, 2H, 5Hz), 9.91 (s, 1H); ¹³C NMR (DEPT, CDCl₃) δ 28.66 (CH₃), 118.99 (CH), 131.70 (CH), 191.42 (CH).

4-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-benzyloxime **6**³



To a solution of 4-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-benzaldehyde **5** (1,45g, 6,6mmol) in H₂O/Ethanol mixture (1/1, 10mL) was slowly added hydroxylamine hydrochloride (544mg, 7,88mmol), dissolved previously with aqueous sodium hydroxide (1M, 2mL). The solution was stirred overnight at 90°C. Ethanol was removed and water was added. The resulting suspension was filtered and washed twice with water. Filtrate was extracted with chloroform (2x10mL). Collected organic layers were dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated to yield compound **6**, as a off white solid (1,38g, 90%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.54 (s, 9H), 6.60 (br, 1H), 7.39 (d, 2H, 5Hz), 7.53 (d, 2H, 5Hz), 8.09 (s, 1H); ¹³C NMR (DEPT, CDCl₃) δ 28.24 (CH₃), 118.23 (CH), 127.82 (CH), 149.89 (CH).

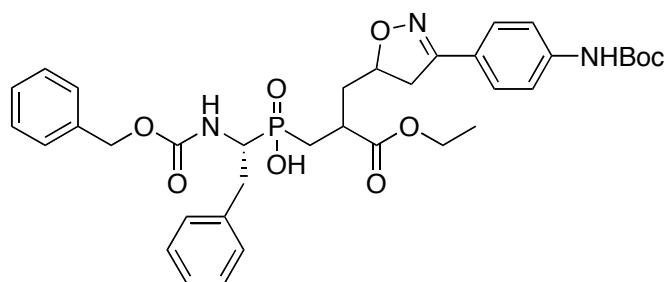
(1*R*)-1-[[**(Benzyloxy)carbonyl**]amino]-2-phenylethyl[2-(ethoxycarbonyl)-pent-4-enyl]phosphinic acid **7**



In a well-dried round-bottomed flask, Cbz-_(R)PhePO₂H₂⁴ (3.2g, 10mmol) and hexamethyldisilazane (10.3mL, 50mmol) were mixed. The suspension was heated at 110°C for 1h under constant argon flow. Then, the temperature was set to 100°C, ethyl 2-methylenepent-4-enoate (2.1g, 15mmol) was added dropwise. The reaction mixture was then heated at 100°C for 3h. After reaction completion, the temperature was lowered to 70°C and abs. EtOH (10mL) was slowly added under argon flow. The mixture was stirred at 70°C for 20min and then the volatiles were evaporated under vacuum. The residue was dissolved in aqueous NaHCO₃ 5% (50mL) and the resulting layer was washed with Et₂O (2 x 15mL). The aqueous layer was acidified with HCl 2M (pH = 1) and the white precipitate obtained was

isolated by filtration. The crude product was further purified by flash chromatography on silica gel (eluent: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$: 7/0.3/0.3) to afford **7**, as a white powder (3.8g, 84%). mp: 120 – 122°C; TLC $R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$: 7/2/1) = 0.91, $R_f(\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$: 7/0.5/0.5) = 0.65; ^1H NMR (200MHz, CD_3OD) δ 1.22 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 3H CH_2CH_3), 1.63-1.89 (m, 1H, PCHH), 1.96-2.20 (m, 1H, PCHH), 2.22-2.44 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), 2.58-3.02 (m, 2H, PCH₂CH, CHHPh), 3.18-3.34 (m, 1H, CHHPh), 3.94-4.19 (m, 3H, CH_2CH_3 , PCH), 4.93-5.16 (m, 4H, $\text{CH}=\text{CH}_2$, OCH_2Ph), 5.48-5.51 (m, 1H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 7.12-7.29 (m, 10H, Ar); ^{13}C NMR (50MHz, CD_3OD) δ 14.4, 28.8 (d, $^1J_{\text{PC}} = 91.4$ Hz, PCH₂), 34.6, 38.7, 39.0, 40.1, 53.2 (d, $^1J_{\text{PC}} = 106.8$ Hz, PCH), 61.9, 66.4, 119.1, 127.2, 127.8, 128.4, 128.7, 129.5, 129.7, 130.2, 130.5, 135.8, 139.3, 139.5, 157.5 (d, $^3J_{\text{PC}} = 5.1$ Hz, OCONH), 175.9 (d, $^3J_{\text{PC}} = 7.8$ Hz, COOEt); ^{31}P NMR (81MHz, CD_3OD) δ 49.2, 49.7; ESMS m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{NO}_6\text{P}$ (M-H)⁻ 458.2, found 458.1; Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}$: C, 62.74; H, 6.58; N, 3.05. Found: C, 62.67; H, 6.42; N, 2.93. HRMS (ES-) m/z calculated for [M-H]⁻ $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NO}_6\text{P}$ **7**: 458.1733, found 458.1737

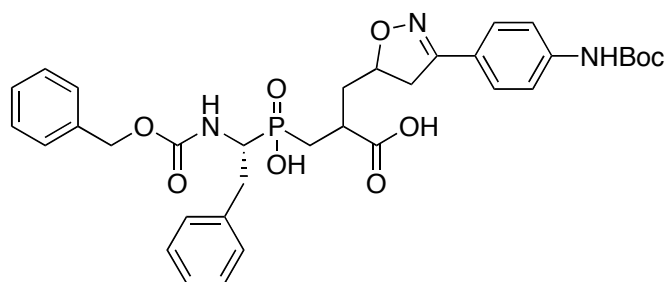
(1R)-1-[(benzyloxy)carbonylamino]-2-phenylethyl{2-[(3-{4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]phenyl}-4,5-dihydro-5-isoxazolyl)methyl]-3-ethoxy-3-oxopropyl}phosphinic acid **8**



4-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)-benzyloxime **6** (283mg, 1.2mmol) was dissolved in chloroform (10mL) followed by addition of NCS (160mg, 1.2mmol). To initiate the reaction, 3 drops of pyridine were added to the solution which was then stirred for 3 hours at 45°C. To this solution, **7** (110mg, 0.24mmol) was added followed by addition of triethylamine (200 μL , 1.44mmol). The solution was then stirred for 2 days at room temperature. After removal of chloroform, crude product was dissolved in ethyl acetate (5mL) and the resulting organic layer was washed with 1M aqueous solution of HCl (2x5mL). Organic layer was concentrated to yield compound **8** as an orange oil, that was purified by HPLC (isocratic at 60% B, $\lambda=220\text{nm}$, $t_R = 33$ min) (overall yield 80%).

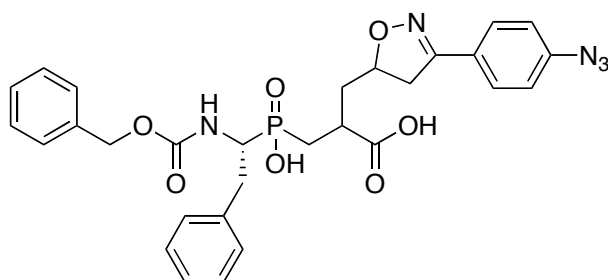
HRMS (ES-) m/z calculated for [M-H]⁻ $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_9\text{P}$ **8**: 692.2737, found 693.2735

3-[(1R)-1-[(benzyloxy)carbonylamino]-2-phenylethyl(hydroxy)phosphoryl]-2-[(3-{4-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]phenyl}-4,5-dihydro-5-isoxazolyl)methyl]propanoic acid **9**



To a solution of dipeptide **8** (108mg, 0,156mmol) dissolved in THF (4mL), LiOH (48mg, 2mmol) and triethylamine (40 μ L, 0.29mmol) were added. Mixture was stirred for 2 days at room temperature. THF was evaporated and crude compound was dissolved in water/ethyl acetate (1/1, 10mL). Organic layer was washed with 1M aqueous solution of HCl (3x5mL) and extracted with saturated NaHCO₃ aqueous solution (3x3mL). Aqueous layer was then acidified with 10% aqueous HCl and a precipitated product was collected by centrifugation and washed with water (3x5mL). Crude residue was then dissolved in water/acetonitrile (60/40) and lyophilised to yield compound **9**, as an off white powder (49mg, 47%) engaged in the next step without further purification. (isocratic at 60% B, λ =220nm, t_r = 17.1 min.) HRMS (ES-) m/z calculated for [M-H]⁻ C₃₄H₃₉N₃O₉P **9**: 664.2424, found 664.2422.

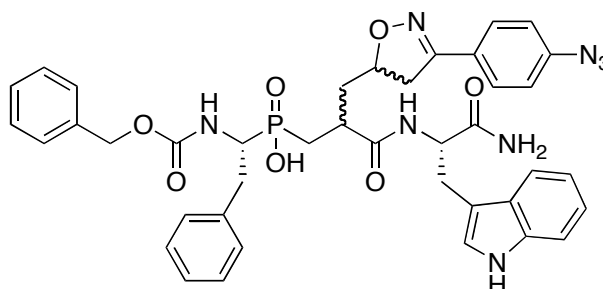
3-[3-(4-azidophenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl]-2-(((1R)-1-((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-phenylethyl)(hydroxy)phosphoryl)methyl}propanoic acid **10**



Dipeptide **9** (29mg, 0,043mmol) was dissolved in TFA (1mL) and this solution was stirred for 30 minutes at room temperature. After cooling the mixture at -10°C, NaNO₂ (4,3mg, 0,043mmol) dissolved in water (400 μ L) was added in 4 aliquots (4x100 μ L) over 5 minutes. Suspension was stirred for 30 minutes at -10°C. Progress of diazotation reaction was followed by UV spectrometry (From maxima at λ =264 nm for starting amine to maxima at λ =341 nm for diazonium intermediate). TFA was then removed, crude compound was dissolved in water/acetonitrile (50/50, 1mL) and NaN₃ (3,4mg, 0,052mmol) was added. Solution was stirred for 1 hour at room temperature. Progress of azidation reaction was followed by UV spectroscopy (from maxima at λ =341 nm for starting diazonium intermediate to maxima at λ =286 nm for azido derivative). After removal of acetonitrile, water was added to precipitate a product that was collected by centrifugation and washed with 1M aqueous solution of HCl (3x5mL). The crude product was then dissolved in DCM, the organic layer washed with water (2x5mL) to yield compound **10** after DCM evaporation, as a yellow solid (19mg, 76%). (10 to 90 % B in 40 min., λ =220nm, t_r = 32.8 min.)

HRMS (ES-) m/z calculated for [M-H]⁻ C₂₉H₂₉N₅O₇P **10**: 590,1805 found 590,1803

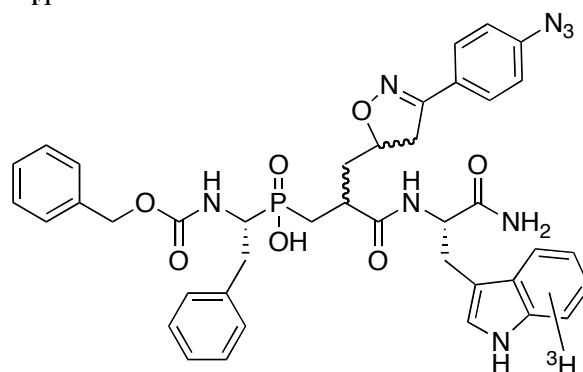
3-[[*(1S)*-2-Amino-1-(*1H*-indol-3-ylmethyl)-2-oxoethyl]amino]-2-[[3-(4-azidophenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazolyl]methyl]-3-oxopropyl((*1R*)-1-[[*(benzyloxy)*carbonyl]amino]-2-phenylethyl)phosphinic acid **1**



To a solution of dipeptide **10** (19mg, 0,033mmol) in DCM (1mL) were successively added HCl.TrpNH₂ (8mg, 0,033mmol), HOBt.H₂O (4,4mg, 0,033mmol) EDC (38mg, 0,198mmol) and DIPEA (17μL, 0,099mmol). This solution was stirred at room temperature and progress of amino acid incorporation was followed by HPLC. After reaction completion, the suspension was diluted with DCM (5mL) and washed with 1M aqueous solution of HCl (4x5mL). DCM was then cooled to 0°C and a precipitate was filtered to yield compound **1**, as a yellow solid (17,5mg, 68%). Compound **1** was obtained as a mixture of 4 diastereoisomers, which were separated by HPLC (figure 1) : Isocratic elution 55% B, λ=220 nm , t_R (F1) : 17 min., t_R (F2) : 17.6 min., t_R (F3) : 19.3 min., t_R (F4) : 20.5 min.). The first fraction (F1), (t_R = 17 min.), was shown to exhibit the best inhibitory potency toward several MMPs. This latter diastereoisomer (Compound **1**_{F1}) was selected for radiolabelling.

HRMS (ES⁻) m/z calculated for [M-H] C₄₀H₄₀N₈O₇P **1** : 775.2758, found 775.2751

Radiolabelling of compound **1_{F1}:**



Compound **1**_{F1} was tritiated as described before.⁵ Radioactivity purity of this compound is displayed in figure 2. The radioactive specificity of this compound was determined as 8 Ci/mmole, using the UV absorption signal of the tryptophane ($\epsilon_{290\text{ nm}} = 5690 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) to determine concentration of compound **1**.

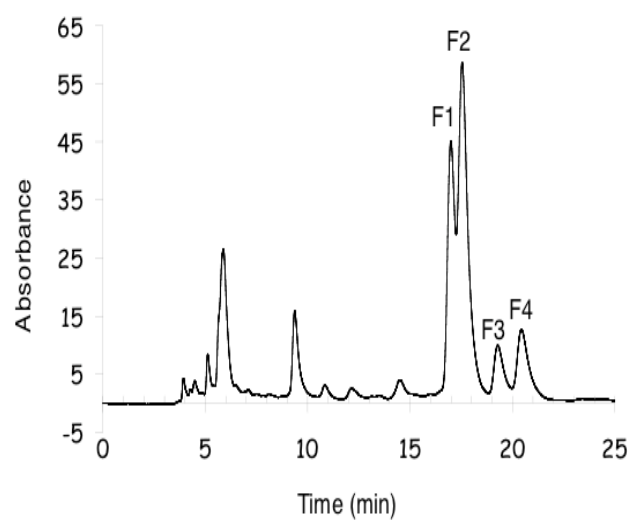


Figure 1: Resolution of the four diastereoisomers of compound **1** by HPLC.

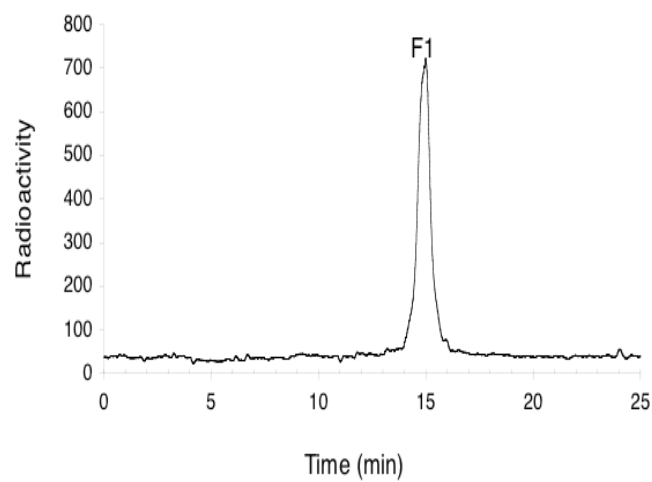


Figure 2: HPLC radioactivity profile compound **1_{F1}**.

III - Methods

Inhibition studies

Enzyme inhibition assays were carried out, as described before² in 50 mM Tris/HCl buffer, pH 6.8, 10 mM CaCl₂, at 25 °C, using the Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ peptide as substrate.

Enzyme Tritration

In order to use in the comparative photolabelling experiments the same number of active MMP catalytic units, titration experiments were performed using the high potent TIMP-1 inhibitor (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases). These experiments were performed using the Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂ peptide as substrate.

Photolabelling Experiments

Protein samples, 50 µL in eppendorf tube, were incubated with compound **1** in 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM CaCl₂, 0.01% Brij35, for 10 min (10°C). After equilibrium, the eppendorf tube was irradiated for 2 min (10°C). Following irradiation, the reaction was quenched by the addition of 12 µL of 5 x SDS loading buffer, followed by boiling (5min, 95°C). All the irradiations experiments (λ , 310 nm; 50 µW.cm⁻²) were performed under inactinic light (Na light), keeping the samples at 10°C.

Electrophoresis

Sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to Laemmli using a mini-protean III apparatus (Biorad). Protein samples were loaded on a 12% SDS gel of 1mm thickness.

Blotting

After electrophoresis, the proteins were transferred on a PVDF membrane using a semi-dry transfer blot apparatus (Biorad). Gels were rinsed in a 50mM Tris-HCl, pH 8.5, 20% methanol, 40 mM glycine, 0.0375% SDS in distilled water (Transfer Buffer). The PVDF membrane was activated in a bath of methanol and then equilibrated in the transfer buffer. The transfer was realised as a sandwich between the cathode and anode. On the anode was first deposited a sheet of extra-thick-blot-paper (Biorad), wetted with transfer buffer, then the activated PVDF membrane. Gels were laid on membranes, recovered by 2 sheets of extra-thick-blot-paper wetted with transfer buffer and finally by the cathode. After transfer, membranes were dried before radioactivity analysis with the β-imager.

Silver staining

Gels were fixed in 30% ethanol, 5% acetic acid in distilled water for 2 x 30 min and then washed for 4 x 10 min in distilled water. Gels were sensitized by a 1 min incubation in 0,02% sodium thiosulfate and then rinsed two times with distilled water for 1 min. After rinsing, gels were submerged for 45 mn in a 0,01% formaldehyde, 0.2% silver nitrate solution. After incubation in silver nitrate solution, the 2 faces of the gel slab were rinsed under a flow of distilled water and then developed in a 0,01% formaldehyde, 0.001% sodium carbonate solution under shaking. When the desired intensity of staining is achieved, gels were submerged in a 330 mM Tris, 2% acetic acid in distilled water to stop the development and then stored at room temperature in 20% ethanol in distilled water.

IV – Supporting information references

- (1) Devel, L. ; Rogakos, V. ; David, A. ; Makaritis, A. ; Beau, F. ; Cuniasse, P.; Yiotakis, A. ; Dive, V. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11152-60.
- (2) Briggs J. R.; Klosin J.; Whiteker G. T. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4795-98.
- (3) Xue, C.-B.; Wityak, J.; Sielecki, T. M.; Pinto, D. J.; Batt, D. G.; Cain, G. A.; Sworin, M.; Rockwell, A. L.; Roderick, J. J.; Wang, S.; Orwat, M. J.; Frieze, W. E.; Bostrom, L. L.; Liu, J.; Higley, C. A.; Rankin, F. W.; Tobin, A. E.; Emmett, G.; Lalka, G. K.; Sze, J. Y.; Di Meo, S. V.; Mousa, S. A.; Thoolen, M. J.; Racanelli, A. L.; Hausner, E. A.; Reilly, T. M.; DeGrado, W. F.; Wexler, R. R.; Olson, R. E. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2064-84.
- (4) Makaritis, A. ; Georgiadis, D. ; Dive, V. ; Yiotakis, A. *Chemistry* **2003**, *9*, 2079-94.
- (5) Dive, V. ; Andarawewa, K. L. ; Boulay, A. ; Matziari, M. ; Beau, F. ; Guerin, E. Rousseau, B. ; Yiotakis, A. ; and Rio, M. C. *Int. J. Cancer* **2005**, *113*, 775-81.

Functional proteomic of Matrix Metalloproteinases (MMP) dedicated to the detection of active forms of MMP in complex proteome.

The Matrix Metalloproteinases (MMP) represent a family of Zinc dependent extracellular proteinases able to cleave collectively all the proteins constituting the extracellular matrix. Currently, 23 human MMP have been identified and are characterized by their sequence in aminoacids and their highly conserved 3D structure. These enzymes are expressed constitutively during the tissue remodelling process. Their over-expression in various diseases tightly related to inflammatory processes (arthritis, emphysema, cancer) described MMP as choice therapeutic targets. However, as the tissue remodelling implicates modification of cellular contacts, MMP appear currently as proteins involved in signalling pathways. Recent works demonstrating that MMP are able to cleave substrates, which are different than proteins constituting the extracellular matrix, reinforce this vision.

In order to identify the individual role and the protein expression level of MMP in pathological context, we developed a new technique of functional proteomics dedicated to the detection of active forms of MMP in tumour samples. This technique relied on the development of a new photoaffinity probe, based on the structure of a potent phosphinic inhibitor of MMP, allowing targeting and isolating active forms of MMP by photoaffinity labelling. Furthermore, as the new developed probe incorporated a radioactive element, photoaffinity labelling permitted to radiolabel the targeted proteins.

This probe demonstrated *in vitro* its remarkable ability to covalently modify the hMMP-12, with a singular cross-linking yield, determined at 42 %, displaying an extremely sensitive detection (2.5 fmoles of hMMP-12). When added to complex proteome, the photoaffinity probe presents the same sensibility of detection for the hMMP-12 (5 fmoles); importantly, in this case, hMMP-12 represents only 0.001 % of the totality of the proteins present in the sample. Moreover, this technique allows us to identify active forms of gelatinases (MMP-2 & -9) in an indirect manner by comparing the results of tumour samples treated with the photoaffinity probe and the results of tumour samples analysed in zymography.

These studies indicate that the protein expression levels of active forms of MMP are extremely low (fmoles) and do not permit any characterisation of those forms of MMP by mass spectrometry, constituting a genuine challenge which can be approached by the development of new photoaffinity probes incorporating a biotin-group. The example of this class of proteins expressed in very low abundance under active form implicates to grant efforts to develop new strategies allowing the capture of the targeted proteins.

Key-words: matrix metalloproteinases; functional proteomics; photoaffinity probe; zymography.

Protéomique fonctionnelle des Métalloprotéases Matricielles (MMPs) dédiée à la détection des formes actives de MMPs dans des protéomes complexes.

Les Métalloprotéases matricielles (MMPs) constituent une famille des métalloprotéases à zinc capables conjointement de dégrader l'ensemble des protéines de la matrice extracellulaire. Aujourd'hui, vingt-trois MMPs humaines ont été identifiées et sont caractérisées par leur séquence en acides aminés et leur structure 3D fortement conservées. Ces enzymes sont exprimées de manière constitutive au cours des processus de remodelage tissulaire. Leur surexpression dans un certain nombre de pathologies étroitement liée au phénomène d'inflammation (arthrite, emphysème, cancer) fait des MMPs des cibles thérapeutiques de choix. Cependant, le remodelage entraînant des modifications des contacts cellulaires, les MMPs apparaissent aujourd'hui comme des protéines des voies de signalisation à part entière. Les récentes découvertes de substrats des MMPs ne faisant pas partie des constituants de la matrice extracellulaire renforcent cette vision.

Dans le but d'identifier le rôle particulier et le taux d'expression protéique des MMPs dans un contexte pathologique, nous avons développé une technique de protéomique fonctionnelle dédiée à la détection des formes actives des MMPs dans des échantillons tumoraux. Cette technique repose sur le développement d'une nouvelle sonde de photoaffinité, basée sur la structure d'un puissant inhibiteur des MMPs de type phosphinique, permettant de cibler les MMPs sous forme active et de les isoler par marquage par photoaffinité. Le marquage par photoaffinité nous permet ainsi grâce à un élément radioactif incorporé à la sonde de radiomarquer les protéines ciblées.

Cette sonde a montré *in vitro* sa capacité remarquable à modifier de manière covalente la hMMP-12 avec un rendement de 42 %, affichant une sensibilité extrême de détection (2.5 fmoles de hMMP-12). En présence de protéome complexe, la sensibilité de détection de la sonde pour la hMMP-12 est tout à fait comparable (5 fmoles) ; la hMMP-12 représente une fraction de 0.001 % de la quantité totale des protéines. Cette méthode nous a permis également d'identifier de manière indirecte les formes actives des gélatinases en comparant les extraits tumoraux traités par la sonde et les extraits tumoraux analysés en zymographie.

Ces études indiquent que les niveaux d'expression des formes actives de MMPs sont très faibles (fmoles) ne permettant pas une caractérisation de celles-ci par spectrométrie de masse, ce qui constitue un véritable défi pouvant être abordé avec de nouvelles sondes incorporant une biotine. Cet exemple de protéines exprimées sous forme active en très faible abondance, implique une orientation des efforts à consentir vers le développement de nouvelles stratégies de capture.

Mots-clés : métalloprotéases matricielles ; protéomique fonctionnelle ; sonde de photoaffinité.
