

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

TAAAYAT Souhila Rayene

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces du gène *MMP-9* exprimé par les cellules endothéliales au cours du cancer

Soutenu le 07 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie W04144100

MEMOIRE

Présenté par

TAAAYAT Souhila Rayene

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Immunologie

Thème

Conception des amorces du gène *MMP-9* exprimé par les cellules endothéliales au cours du cancer

Soutenu le 07 Septembre 2020, devant le jury composé de :

Président	ARIBI Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	NOUARI Wafa	MCB	Université de Tlemcen
Examineur	MILIANI Marwa	MAB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2019/2020

Résumé

Introduction : Les cellules endothéliales (CE) forment la paroi interne d'un vaisseau sanguin et fournissent une barrière sélective anticoagulante entre la paroi vasculaire et le sang. Elles participent dans plusieurs processus physiologiques, la réponse immunitaire, la coagulation, et la production de composants de la matrice extracellulaire (ECM). Les métalloprotéinases (MMPs) sont une famille d'enzymes protéolytiques qui jouent un rôle dans la dégradation et le remodelage de l'ECM. Parmi ces enzymes, le membre MMP-9, qui appartient de la sous famille des Gélatinases, est impliqué dans la progression tumorale et facilite la métastase et l'invasion. La conception de bonnes amorces pour le gène *MMP-9* servira à amplifier ce gène en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), et ceci afin de développer une thérapie anti-cancéreuse.

Objectif: l'objectif de ce travail est de concevoir des amorces du gène *MMP-9* exprimé par les CE au cours du cancer.

Matériel et méthodes : la séquence du gène humain *MMP-9* a été prise à partir de la plateforme Ensembl. Ensuite, l'outil Primer-Blast de la base de données NCBI a été utilisé pour la conception des amorces pour ce gène. Enfin, la paire des amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifiée par le site *in silico*-PCR.

Résultats : l'outil Primer-Blast nous a permis de donner une dizaine de paires d'amorces et seulement la première paire d'amorces qui répond aux critères d'une meilleure amorce utilisée pour réaliser une PCR. La confirmation de ce résultat par une *in-silico* PCR nous a montré que cette paire se localise au niveau de chromosome 20, ce qui a confirmé la spécificité des amorces du gène *MMP-9* choisies.

Conclusion : La conception de bonnes amorces du gène *MMP-9* exprimé par les CE au cours du cancer permettra de réaliser une PCR. Cela a plusieurs avantages dans les domaines médicaux et biologiques et permet le diagnostic et l'identification de la tumeur et la production de traitements anti-cancéreux.

Mots clés : cancer, cellule endothéliale, amorces, MMP-9, PCR.

Abstract

Introduction: Endothelial cells (EC) form the inner wall of a blood vessel and provide a selective anticoagulant barrier between the vascular wall and blood. They participate in several physiological processes, such as, the immune response, coagulation, and the production of components of the extracellular matrix (ECM). Metalloproteinases (MMPs) are a family of proteolytic enzymes that play a role in the degradation and remodeling of ECM. Among these enzymes, MMP-9 member, which belongs to the subfamily of gelatinase is involved in tumor progression and facilitates metastasis and invasion. The design of good primers for *MMP-9* gene will serve to amplify this gene using polymerase chain reaction (PCR), and in order to develop a cancer therapy.

Objective: The objective of this work is to design primers for *MMP-9* genes expressed by ECs during cancer.

Materials and methods: the sequence of the human *MMP-9* gene was taken from the Ensembl platform. Next, the Primer-Blast tool from the NCBI database was used to design the primers for this gene. Finally, the pair of primers chosen and which meets the criteria for choosing good primers was verified by the *in silico*-PCR site.

Results: the Primer-Blast tool allowed us to yield about ten pairs of primers and only the first pair of primers that meets the criteria for a best primer used to perform PCR. Confirmation of this result by *in-silico* PCR showed us that this pair is localized at chromosome 20, which confirmed the specificity of the *MMP-9* gene primers chosen.

Conclusion: The design of good primers for the *MMP-9* gene expressed by ECs in cancer will allow PCR to be carried out. This has several advantages in the medical and biological fields and allows the diagnosis and identification of the tumor and the production of anti-cancer treatments.

Keywords: cancer, endothelial cell, primers, MMP-9, PCR.

ملخص

مقدمة: تشكل الخلايا البطانية (EC) الجدار الداخلي للأوعية الدموية وتوفر حاجزًا انتقائيًا مضادًا للتخثر بين جدار الوعاء والدم. كما انها تساهم في العديد من العمليات الفسيولوجية، مثل الاستجابة المناعية، التخثر، وإنتاج مكونات المصفوفة خارج الخلية (ECM). إن البروتينات المعدنية (MMPs) هي مجموعة من الإنزيمات المحللة للبروتين التي تلعب دورًا في تدهور وإعادة تشكيل ECM، من بين هذه الإنزيمات، يشارك العضو MMP-9، الذي ينتمي إلى فصيلة الجيلاتيناز الفرعية، في تطور الورم ويسهل الانبثاث والغزو. يعمل تصميم البرايمر لجين MMP-9 على تضخيم هذا الجين باستخدام تفاعل سلسلة البوليميراز (PCR)، من أجل تطوير علاج مضاد للسرطان.

الهدف: الهدف من هذا العمل هو تصميم برايمر لجينات MMP-9 التي عبرت عنها EC في السرطان.

المواد والأساليب: تم أخذ تسلسل جين MMP-9 البشري من منصة Ensembl. بعد ذلك، تم استخدام أداة Primer-Blast من قاعدة بيانات NCBI لتصميم البادئات لهذا الجين. أخيرًا، تم التحقق من زوج البادئات التي تم اختيارها والتي تلي معايير اختيار البادئات الجيدة من خلال موقع in silico-PCR.

النتائج: سمحت لنا أداة Primer-Blast بإنتاج حوالي عشرة أزواج من البادئات فقط أول زوج من البادئات التي استوفت معايير أفضل برايمر يستخدم لأداء PCR. أظهر لنا تأكيد هذه النتيجة من خلال in silico-PCR أن هذا الزوج موضعي في الكروموزوم 20، والذي أكد على خصوصية الجينات MMP-9 المختارة.

الخاتمة: إن تصميم البرايمر لجين MMP-9 الذي عبرت عنه ECs في السرطان سيسمح بإجراء PCR. هذا له مزايا عديدة في المجالات الطبية والبيولوجية ويسمح بتشخيص الورم والتعرف عليه وإنتاج العلاجات المضادة للسرطان.

الكلمات المفتاحية: سرطان، خلية بطانية، برايمر، ميتالوبروتيناز-9، PCR.

Avant-propos

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener ce mémoire à son terme.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie (Biomolim). Je tiens à remercier son Directeur Professeur Mourad ARIBI pour son aide inestimable. Il m'a fourni les outils nécessaires à la réussite de mon parcours universitaire.

Je voudrais également remercier, ma directrice de mémoire NOUARI Wafa, Maitre de conférence classe B, à l'Université de Tlemcen, pour ses judicieux conseils, ses encouragements permanents qui ont contribué à alimenter ma réflexion lors de la rédaction de mon mémoire.

Je remercie les membres de jury Pr. ARIBI Mourad et Dr. MILIANI Marwa d'avoir acceptés d'examiner mon travail.

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire Biomolim et les intervenants professionnels responsables de ma formation.

Je désire aussi remercier mes enseignants au niveau de l'université de BATNA-2 ainsi tous les médecins de centre hospitalier universitaire de BATNA qui m'ont accompagné tout au long de mon cursus universitaire.

J'exprime ma reconnaissance à ma famille qui a la créditée de ce que j'ai atteint. Maman et papa, mes tantes, mes sœurs et mes frères, ma voisine et sa fille Ritel, je n'oublierai jamais ces jours où je devais m'éloigner de vous, je n'oublierai jamais votre soutien inestimable pour moi.

A la fin, tout ce que je suis aujourd'hui, c'est grâce à une mère qui ne savait ni lire ni écrire, mais elle savait certainement les conséquences de la fatigue au nom de la science. YEMMA, je souhaitais que vous veniez à mes côtés et me regardiez pendant que j'entrais pas à pas dans le monde de la science et des savants, mais la sagesse de Dieu était de vous prendre. Je n'oublierai jamais vos sacrifices pour moi. Dieu te bénisse, YEMMA.

Table de matières

Résumé	III
Abstract	IV
ملخص	V
Avant-propos	VI
Table de matières	VII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	X
Liste des abréviations	XI
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de la littérature	2
1.1. Les cellules endothéliales	2
1.1.1. Origine	2
1.1.2. Caractéristiques	3
1.1.3. Phénotypes	3
1.1.4. Molécules exprimées et secrétées par les cellules endothéliales	3
1.1.4.1. Récepteurs immunitaires	4
1.1.4.2. Endogline	5
1.1.4.3. Molécules d'adhésion	5
1.1.4.4. Facteur de von Willebrand	5
1.1.4.5. Angioprotéine-1 et -2	6
1.1.4.6. VEGF	6
1.1.5. Rôles	7
1.1.5.1. Rôle dans l'inflammation	7
1.1.5.2. Rôle dans la barrière hémato-encéphalique	8
1.1.5.3. Transition endothéliale à mésenchymateuse	8
1.1.6. Dysfonction endothéliale	9
1.1.7. Progression tumorale et CE	9
1.1.7.1. Types des cellules CET	10
1.1.7.2. Rôle de CET dans la progression tumorale	11
1.2. Métalloprotéinases (MMPs)	11
1.2.1. Définition	11
1.2.2. Structure	11
1.2.3. Classification	12
1.2.4. Expression génique de MMPs	14

1.2.5. Métalloprotéinase-9	15
1.2.6. Polymorphisme et mutations des MMPs dans les troubles héréditaires humaines	16
1.2.7. Rôles des MMPs	16
1.3. Implication des Métalloprotéinases dans le cancer	17
1.3.1.1. MMPs et perte d'adhérence	17
1.3.1.2. MMPs et invasion	17
1.3.1.3. MMPs et prolifération	18
1.3.1.4. MMPs et angiogenèse	18
1.3.1.5. MMPs et métastase	18
1.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	19
1.4.1. Définition	19
1.4.2. Principe	19
1.4.3. Etapes et outils de la PCR	20
1.5. Problématique	20
Chapitre2. Matériel et méthodes	22
2.1. Choix des amorces	22
2.2. Conception d'amorces pour le gène <i>MMP-9</i>	22
2.2.1. Recherche de la séquence de référence du gène <i>MMP-9</i>	22
2.2.2. Outil Primer-Blast	25
2.2.3. Confirmation des résultats : <i>in-silico</i> PCR	26
Chapitre3. Résultats	28
3.1. Analyse de résultats de Primer-Blast	28
3.2. Résultats de confirmation par <i>in-silico</i> PCR	29
Chapitre 4. Conclusions et perspectives	30
Chapitre 5. Bibliographie	31

Liste des figures

Figure 1.1. Origine des cellules endothéliales	2
Figure 1.2. Différents types des cellules endothéliales	3
Figure 1.3. Voie de signalisation de TLR dans les cellules endothéliales	4
Figure 1.4. Sécrétion des molécules d'adhésion au cours de processus de la diapédèse	5
Figure 1.5. Voies de signalisation VEGF impliquées dans l'angiogenèse	6
Figure 1.6. Fonctions des cellules endothéliales	7
Figure 1.7. Transition endothéliale à mésenchymateuse	8
Figure 1.8. Anomalies des CET	10
Figure 1.9. Types des CET	10
Figure 1.10. Structure des MMPs	11
Figure 1.11. Classification structurelle des MMPs	14
Figure 1.12. Rôle des Métalloprotéinases dans la progression tumorale	19
Figure 1.13. Processus de fonctionnement de la PCR	20
Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.	23
Figure 2.2. Le gène humain <i>MMP-9</i> à partir d'Ensembl	23
Figure 2.3. La séquence du gène ciblé et d'autres caractéristiques de ce gène.	24
Figure 2.4. La partie encadrée de la séquence du <i>MMP-9</i> dans un document Word.	24
Figure 2.5. La base de données NCBI.	25
Figure 2.6. L'outil Primer-Blast.	25
Figure 2.7. L'étape pour récupérer l'amorce ciblée dans Primer-Blast.	26
Figure 2.8. Site web <i>in-silico</i> PCR.	27
Figure 3.1. Vue graphique des paires d'amorces prise par Primer-Blast	28
Figure 3.2. Caractéristiques de la première paire d'amorces.	28
Figure 3.3. Résultats d' <i>In-Silico</i> PCR.	29

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Classification des MMPs selon leurs substrats spécifiques	12
---	----

Liste des abréviations

A**AA** : Acide aminé**ADN** : Acide désoxyribonucléique**Ag** : Antigène**AKT** : Protéine kinase B (PKB)**Ang1** : Angiopoïétine 1**AP1** : Protéine activatrice 1**ARAI** : Amélogénèse imparfaite autosomique récessive**ARN** : Acide ribonucléique**B****BHE** : Barrière hémato-encéphalique**BMEC** : CE microvasculaires cérébrales**BMP4** : Protéine morphogénétique osseuse 4**bFGF** : Basic fibroblast growth factor**C****CD** : Cluster de différenciation**CE** : Cellules endothéliales**CET** : Cellule endothéliale tumorale**D****dNTP** : Désoxyribonucléotides**E****ECM** : Matrice extracellulaire**EndMT** : Transition endothéliale à mésenchymateuse**eNOS** : Isoforme endothélial de l'oxyde nitrique synthase**ERK1/2** : Protéine kinase extracellulaire à régulation de signal**ESC** : Cellules souches embryonnaires**F****FAC** : Fibroblastes associées au cancer**FAC** : Focal adhesion kinase**FGF2** : Facteur de croissance de fibroblastes 2**FSP-1** : Protéine 1 spécifique aux fibroblastes**G****G-CSF** : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes**GM-CSF** : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages**GPI** : glycoposphatidylinositol ancré**I****ICAM-1** : Molécule d'adhérence intercellulaire1**IGF-II**: Insulin-like growth factor**IGFBP-3**: Insulin-like growth factor binding protein 3**Ig-like** : Domaine immunoglobuline like**IKK α / β** : Inhibiteur de la sous unité bêta/alpha de la kinase du facteur nucléaire kappa B**IL** : Interleukines**IRAK** : La kinase 1 associée au récepteur d'interleukine 1**IRF3** : Facteur de régulation des interférons 3**K****KDa** : Kilo Dalton**L****LT** : Lymphocytes T**M****MEK** : Sérine/tyrosine/thréonine

MIF : Facteur inhibiteur de la migration de macrophages

MKK : Protéine kinase kinase activées par les mitogènes

MMPs : Métalloprotéinases Matricielles

Myd88 : La réponse primaire de différenciation myéloïde 88

mTORC2 : Cible mammifère la rapamycine complexe 2

N

NAO : Syndrome de nodulose-arthropathie ostéolyse

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NEC : cellule endothéliale normale

NFκB : Facteur nucléaire kappa B

NO : Monoxyde d'azote

NOX : Famille NADPH oxydase

P

PAMPs : Modèles moléculaires associés aux agents pathogènes

Pb : paire de base

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PI3K: Phosphatidylinositol 3- kinase

R

RAF: Rapidly accelerated fibrosacoma

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RTK: Endothéliaux tyrosine kinase

S

Scr : Tyrosine kinase non réceptrice

SEMD : Type Missouri de dysplasie spondyloépimétaphysaire

T

TAM : Macrophage associés au cancer

Taq poly : Thermus aquaticus polymérase

TGF-β : Facteur de croissance transformant beta

TIMPs : Inhibiteurs tissulaires de MMPs

TNF-α: Tumor-necrosis factor alpha

TLR: Toll-like receptors

Tm: melting temperature (température de fusion)

TRAF6 : Facteur associé au récepteur de TNF6

TRAM : Molécule adaptatrice liée au TRIF

TRAP : Phosphatase acide résistante au tartrate

TRIF : Interféron B induisant un adaptateur TIR

V

VCAM-1 : Molécule d'adhérence de cellules vasculaires 1

VEGF : Facteur de croissance endothélial de vascularisation

vWF : vonWillebrand factor

Z

Zn : Zinc

α-SMA : α-actine musculaire lisse

Introduction

Introduction

Les cellules souches embryonnaires (ESC) peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires et peuvent être utiles comme source de cellule pour la transplantation ou l'ingénierie tissulaire (Levenberg et *al.*, 2002). Parmi ces cellules, on note les CE qui ont un très grand intérêt dans le système immunitaire. Les CE forment la paroi interne d'un vaisseau sanguin et fournissent une barrière sélective anticoagulante entre la paroi vasculaire et le sang, qui s'appelle « endothélium » (Sumpio et *al.*, 2002). Ces cellules expriment de nombreux biomarqueurs spécifiques tels que : le facteur de croissance endothélial de vascularisation (VEGF), l'endogline, les molécules d'adhésion (E-selectine, VCAM-1,...) et d'autres médiateurs inflammatoires. Les CE sont un organe paracrinien et endocrinien multifonctionnel, participent dans plusieurs processus physiologiques, notamment, la réponse immunitaire, la coagulation, la modulation de flux sanguin et la production des composants de l'ECM. En revanche, elles peuvent subir un dérèglement qui déstabilise l'homéostasie et facilite l'apparition de troubles vasculaires et des cancers.

Les MMPs sont une famille d'enzymes protéolytiques qui jouent un rôle dans la dégradation et le remodelage de l'ECM (Park et *al.*, 2019). Cette famille est classée selon leur structure en domaines et leurs substrats spécifiques en six groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines et les MMPs de types membranaires et les non classées (King, 2016; Masciantonio et *al.*, 2017). Trois étapes essentielles permettent l'activation des MMPs et leur transition de la forme latente à une forme active. Ces étapes sont la régulation transcriptionnelle, l'activation de proenzymes et enfin l'inhibition de l'activité enzymatique par les inhibiteurs tissulaires (TIMPs)(Yadav et *al.*, 2014). De plus, les MMPs peuvent contribuer dans la prolifération, la migration, l'adhésion, la mort cellulaire et l'angiogenèse (Isaacson et *al.*, 2017). Une expression anormale des MMPs et/ou la présence d'une mutation peuvent être associées à divers troubles, y compris, les pathologies cardiovasculaires, les maladies de système nerveux central et les maladies de système reproducteur (Park et *al.*, 2019). Enfin, l'implication des MMPs dans la progression tumorale par la création d'un environnement favorable qui facilite la métastase et l'invasion de la tumeur a été précédemment étudiée (King, 2016).

Parmi les MMPs, la protéase MMP-9 qui connue sous le nom de Gélatinase B, exerce un rôle dans la dégradation de composants de l'ECM, l'altération des interactions cellule-cellule et cellule-ECM. Une dérégulation lors de son expression permet le développement de multiples tumeurs malignes(Huang, 2018; Mondal et *al.*, 2020).

Dans cette d'ordre d'idée, ce travail a pour objectif de concevoir des amorces encadrant le gène *MMP-9* afin d'étudier l'importance de son expression par les CE au cours du cancer.

1.1. Les cellules endothéliales

L'endothélium est un organe qui se compose d'une seule couche de CE. Il tapisse l'ensemble du système cardio-vasculaire, régule l'échange de sang-tissu, permet le recrutement de cellules sanguines, contrôle la coagulation du sang et aussi détermine la formation des nouveaux vaisseaux sanguins (McCarron *et al.*, 2017). Les CE occupent la paroi interne du vaisseau sanguin et de la vascularisation lymphatique dans les tissus malins et normaux. Elles sont dotées des caractéristiques structurelles, phénotypiques et fonctionnelles uniques (Gomez-Salinerio and Rafii, 2018).

1.1.1. Origine

Au cours de l'embryogénèse, les systèmes hématopoïétiques et vasculaires se développent en parallèle d'une manière interdépendante (Fig 1.1) (Chao and Hirschi, 2010). Les ESC se génèrent du mésoderme en donnant de multiples lignées liées au système vasculaire (les cellules hématopoïétiques primitives et les CE vasculaires). Les CE proviennent des cellules mésodermiques « Angioblastes » sous l'influence du facteur de croissance de fibroblastes 2 (FGF2) et la protéine morphogénétique osseuse 4 (BMP4). Cette dernière permet la différenciation vers un profil endothélial et la génération du système vasculaire intra-embryonnaire, notamment l'aorte dorsale, vaisseau vitellin et le plexus (Naito *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

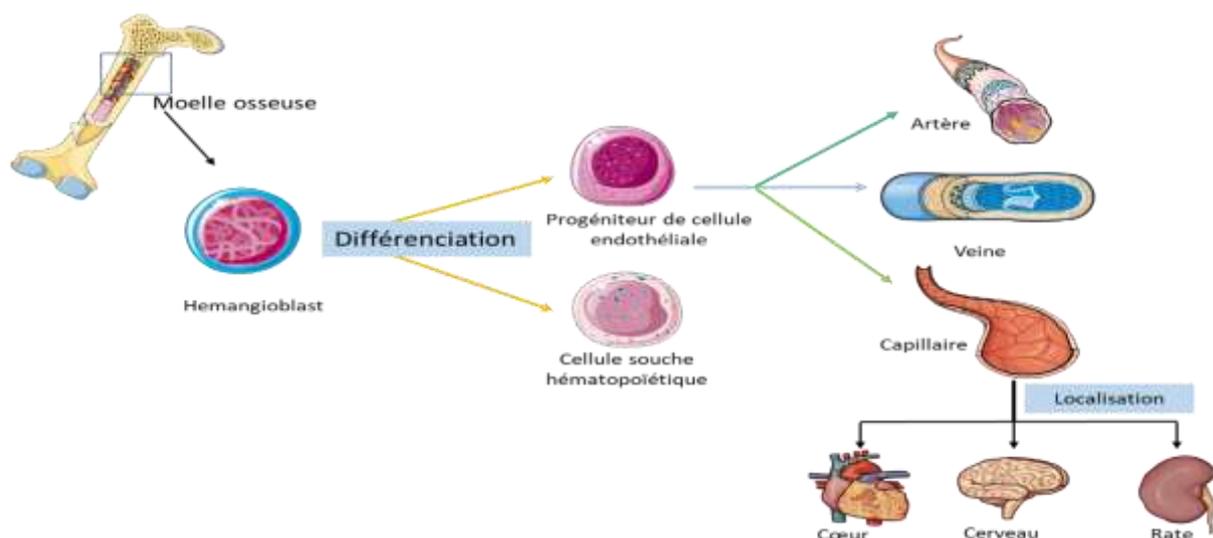


Figure 1.1. Origine des cellules endothéliales (Aird, 2012). Les hémangioblastes dérivent de la moelle osseuse et en présence des facteurs de croissance se différencient en deux progéniteurs; progéniteur de cellules souches hématopoïétiques et progéniteur CE qui a leur tour se différencie en CE d'artère, CE de veine et CE de capillaire. Cette dernière qui se localise au niveau plusieurs organes vitaux tels que le cerveau, le cœur et la rate.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.2. Caractéristiques

Les CE sont des cellules aplaties d'environ 0,5 µm d'épaisseur, 10 µm de longueur et 10 µm de largeur. Elles ont une forme losangique et se localisent sur une membrane basale riche en collagène (Aitoufella et *al.*, 2008). Le nombre total de CE chez l'homme est de 10^{13} , avec un poids de 1,5 Kg et une surface de 400 à 700 m² (Aitoufella et *al.*, 2008). Les CE se situent au niveau de la surface interne des vaisseaux sanguins, formant une barrière sélective entre la circulation sanguine et les tissus (Uldry et *al.*, 2017). Selon leur localisation, les CE partagent des caractéristiques morphologiques distinctes et des signatures de gènes spécifiques (Boström et *al.*, 2018).

1.1.3. Phénotypes

Les CE se différencient selon leurs jonctions intercellulaires et peuvent être classées en trois types : « continu », « discontinu » et « fenêtré » (Fig 1.2). En outre, les CE peuvent différer soit morphologiquement, soit phénotypiquement entre les espèces, les organes ainsi entre les sections vasculaires consécutives (Pries and Kuebler, 2006).

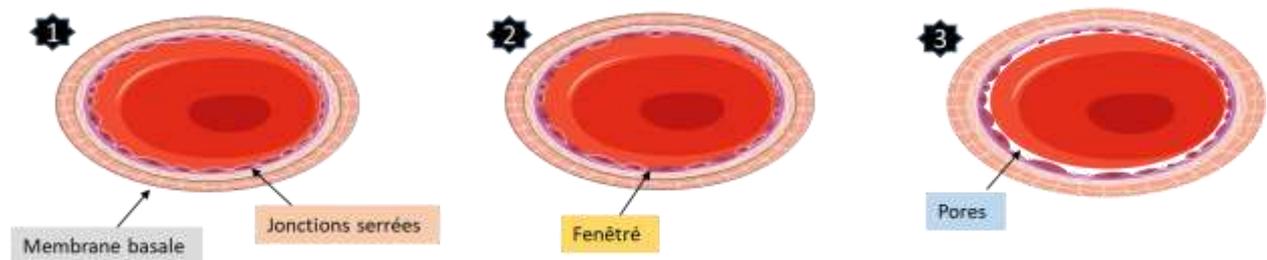


Figure 1.2. Différents types des cellules endothéliales (Pries and Kuebler, 2006). (1) continu : les membranes plasmiques fusionnent seulement qu'aux jonctions serrées, par conséquent la structure des jonctions est le principal déterminant de la perméabilité vasculaire. Ce type se situe au niveau du système nerveux central et est impliqué dans les échanges métaboliques de la barrière hémato-encéphalique. (2) fenêtré : caractérisé par des pores de 50 à 60 nm de diamètre, perméable aux molécules hydrophiles de faible poids moléculaire et à l'eau, et se localise au niveau des glandes endocrines et tractus gastro-intestinal pour la sécrétion, absorption et la filtration. (3) discontinu : présente de grandes lacunes inter et intracellulaires de 0,1 à 1µm de diamètre, se caractérise par l'absence de la membrane basale, se situe dans la moelle osseuse, le foie et la rate. Ce type est impliqué dans l'échange des particules et la filtration des cellules sanguines.

1.1.4. Molécules exprimées et sécrétées par les cellules endothéliales

Les CE présentent sur leurs surfaces des marqueurs cellulaires tels que CD133, récepteur de VEGF, l'endogline récepteur de facteur de croissance transformant beta (TGF-β) et CD34 comme un cluster de différenciation (CD) pour les cellules primitives. Les cellules circulantes expriment le CD146, le CD141 et le CD31, tandis que les cellules matures expriment E-selectine, VE-cadherin, la molécule d'adhérence de cellules vasculaires 1 (VCAM-1), la molécule d'adhérence intercellulaire1 (ICAM-1) et vonWillebrand factor (vWF)

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.4.2. Endogline

La glycoprotéine transmembranaire l'endogline (CD105) est un corécepteur du facteur de croissance TGF- β exprimé sur les CE activées. L'endogline joue un rôle dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (Kasprzak and Adamek, 2018). En outre, son expression augmente au cours d'une inflammation et est associée à l'infiltration des cellules inflammatoires (Bus et *al.*, 2018). Ce récepteur interagit avec les cytokines TGF- β 1, TGF- β 3 et est capable de réguler la vasodilatation dépendante du monoxyde d'azote (NO) et l'expression de NO endothélial (Rathouska et *al.*, 2015).

1.1.4.3. Molécules d'adhésion

Lors d'une réaction inflammatoire ou bien une dysfonction endothéliale, les CE permettent d'organiser et de coordonner la transition leucocytaire à travers la paroi des vaisseaux sanguins pour assurer le passage dans les tissus endommagés par l'expression de P-selectine, VCAM1 et ICAM1 (Fig 1.4) (Rathouska et *al.*, 2015; Sturtzel, 2017).

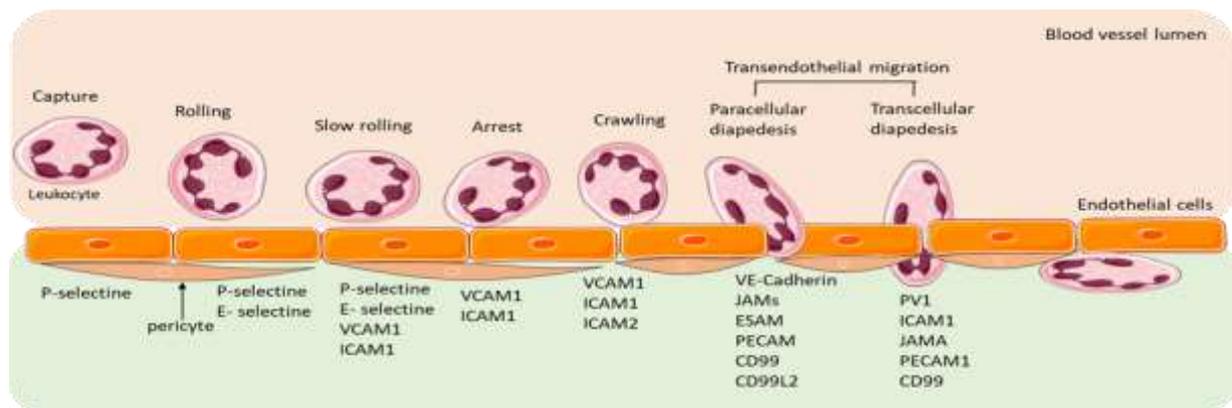


Figure 1.4. Sécrétion des molécules d'adhésion au cours de processus de la diapédèse (Sturtzel, 2017). Une gamme de récepteurs d'adhésion exprimés sur les CE assure la continuité des étapes de la capture, le roulement, l'arrêt et l'exploration leucocytaire sur la surface endothéliale luminale. Ceci est la préface à la transmigration à travers la barrière endothéliale « Diapédèse ».

1.1.4.4. Facteur de von Willebrand

La glycoprotéine de phase aiguë du vWf est un cofacteur homéostatique produit par les CE, les mégacaryocytes et le tissu conjonctif sous endothélial. Le vWf peut détecter l'activation endothéliale lors d'une inflammation systémique. En outre, l'expression élevée de ce facteur reflète des dommages endothéliaux qui conduisent à une insuffisance organique (Paulus et *al.*, 2011).

1.1.4.5. Angioprotéine-1 et -2

Les angioprotéines (Ang) -1 et -2 sont des facteurs de croissance antagonistes qui déclenchent l'activation de CE, en impliquant les cascades de signalisation intracellulaires NFκB pour l'inflammation, Rho kinase pour les contacts inter-endothéliaux et PI3K/AKT pour la continuité cellulaire. Le complexe Ang et son récepteur Tie2 permettent l'intégrité des vaisseaux sanguins, la perméabilité vasculaire et la régulation de l'inflammation (Paulus et *al.*, 2011).

1.1.4.6. VEGF

La famille de VEGF est composée de cinq membres : facteur de croissance du placenta, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-A. Le rôle de VEGF est la stimulation de la migration cellulaire et la perméabilité vasculaire (Fig 1.5). Les VEGF se lient avec leurs récepteurs qui sont exprimés à la surface de CE : endothéliaux tyrosine kinases (RTK), tels que VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3, ainsi qu'aux corécepteurs, y compris les neuropilines et les protéoglycane sulfate d'héparane (Paulus et *al.*, 2011; Yang et *al.*, 2018).

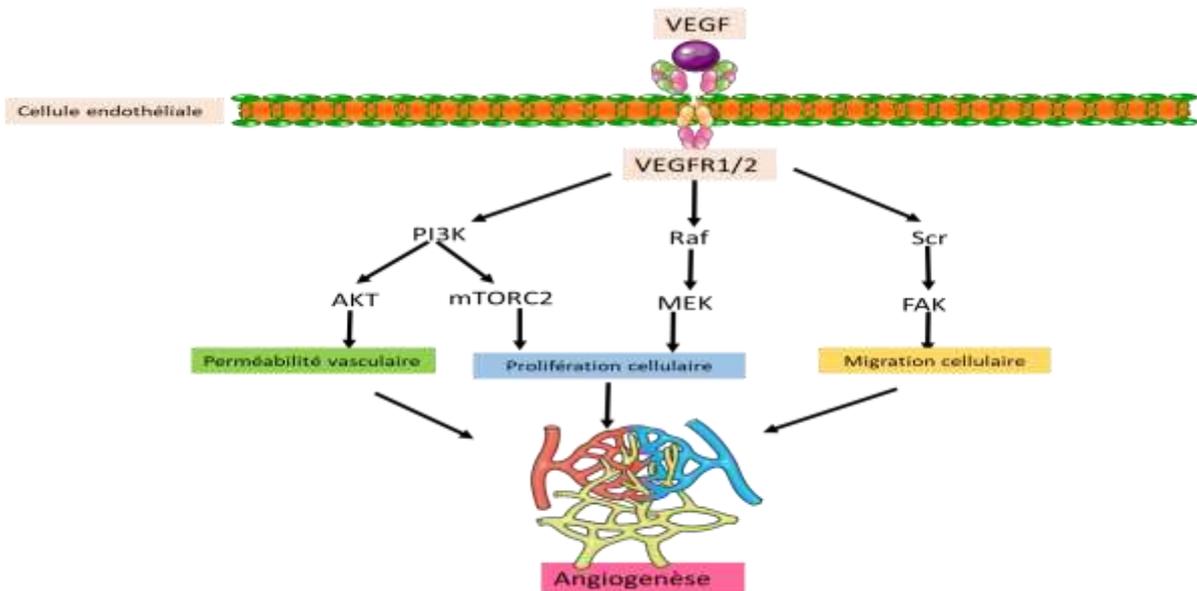


Figure 1.5. Voies de signalisation VEGF impliquées dans l'angiogenèse (Guo et *al.*, 2018). La fixation de VEGF sur son récepteur exprimé à la surface endothéliale permet l'activation de plusieurs voies cellulaires impliquées dans l'angiogenèse. La voie AKT est impliquée dans la perméabilité vasculaire, la voie mTORC2/MEK dans la prolifération cellulaire et FAK dans la migration cellulaire. RAF : rapidly accelerated fibrosarcoma, Scr : tyrosine kinase non réceptrice, FAK : la focal adhesion kinase, MEK : sérine/tyrosine/thréonine, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, AKT : protéine kinase B, mTORC2 : cible mammifère la rapamycine complexe 2.

1.1.5. Rôles

Les CE jouent un rôle crucial dans différents processus immunitaires. (i) Elles ont une fonction paracrine en sécrétant des interleukines, chimiokines, et des interférons. (ii) Elles permettent le maintien de l'infiltration des cellules immunitaires et régulent l'extravasation des leucocytes aux endroits inflammés grâce à l'expression inductible des molécules d'adhésion. (iii) Elles conduisent à une homéostasie ou une coagulation (Fig 1.6) (Sturtzel, 2017).

Selon la localisation de CE, le rôle se diffère. Dans les poumons, les CE se différencient en parallèle avec les cellules épithéliales pour former des unités d'échange de gaz. De plus, les CE du cerveau s'associent aux neurones pour développer la barrière hémato-encéphalique. Et enfin, au niveau du foie, la relation entre les CE est discontinuée pour assurer la liaison entre les hépatocytes et la circulation sanguine afin de nettoyer les intrus (Boström et al., 2018).

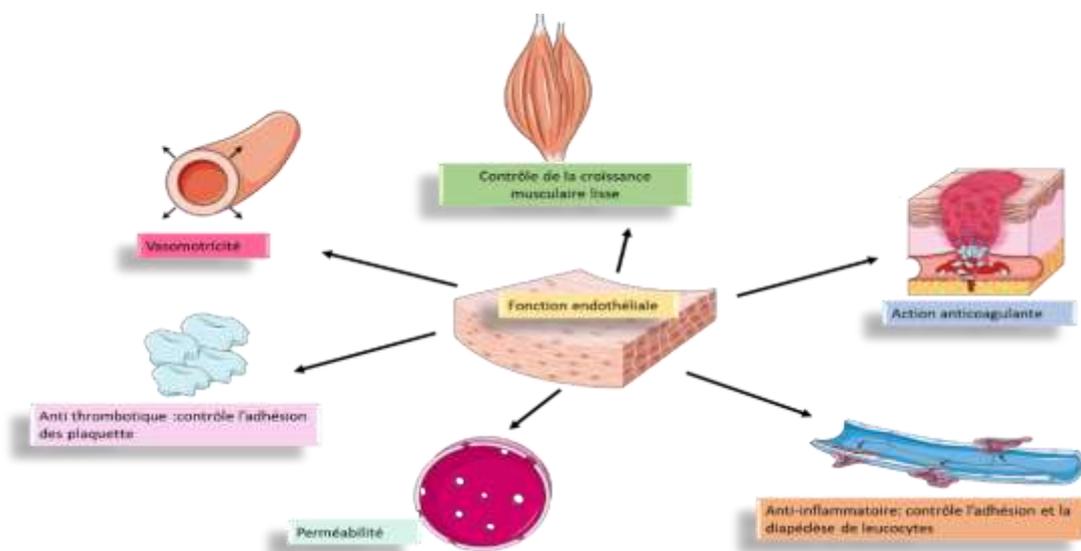


Figure 1.6. Fonctions des cellules endothéliales (Mahe, 2011). La fonction principale de CE est l'homéostasie. Ces cellules sont impliquées dans plusieurs mécanismes biologiques comme la perméabilité vasculaire et le processus de vasomotricité de vaisseaux sanguins. Elles sont aussi impliquées dans l'inflammation et contrôlent l'adhésion leucocytaire (diapédèse). Elles ont une action anti-thrombotique, anticoagulante (adhésion plaquettaire) et enfin assurent la croissance musculaire.

1.1.5.1. Rôle dans l'inflammation

Au cours de l'inflammation, les CE sont caractérisées par la libération de multiples cytokines et chimiokines qui peuvent améliorer le processus de l'angiogenèse. Il s'agit de TNF, l'IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), Le facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), les chimiokines CCL2, CXCL6, CXCL12 et le facteur inhibiteur de la migration de macrophages (MIF) qui sont tous capables de favoriser la néovascularisation (Al-Soudi et al., 2017).

1.1.5.2. Rôle dans la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est composée de CE spécialisées appelées CE microvasculaires cérébrales (BMEC) qui régulent étroitement le transport des molécules entre le cerveau et la circulation sanguine, ainsi que le fonctionnement avec les cellules de soutien telles que les astrocytes, les péricytes et les neurones pour assurer le bon fonctionnement des circuits neuronaux et pour installer l'unité « vasculaire neuro ». Les BMEC sont reliées par des jonctions serrées qui limitent le flux paracellulaire des produits biologiques. Elles expriment des transporteurs d'influx et d'efflux moléculaire GLUT-1, les transporteurs de la famille de la glycoprotéine pour l'importation et l'exportation des nutriments du sang au cerveau. De plus, la dysfonction de BHE est une initiation de développement du troubles de système nerveux central notamment l'AVC, maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaque (Hollmann et *al.*, 2017; Qian et *al.*, 2017).

1.1.5.3. Transition endothéliale à mésenchymateuse

La transition endothéliale à mésenchymateuse (EndMT) est un processus par lequel les CE gâtent lentement des propriétés endothéliales et acquièrent des propriétés mésenchymateuse de fibroblastes, y compris la perte de jonctions serrées, motilité et sécrétion accrue de protéines de la matrice extracellulaires, ainsi que des changements aux niveaux d'expression de marqueurs génétiques; l'absence de VE-cadhérine et CD31 par contre aux α -actine musculaire lisse (α -SMA), protéine 1 spécifique aux fibroblastes (FSP-1), fibronectine et vimentine qui sont exprimés dans les cellules mésenchymateuses (Fig 1.7) (Al-Soudi et *al.*, 2017; Hong et *al.*, 2018; Song et *al.*, 2019).

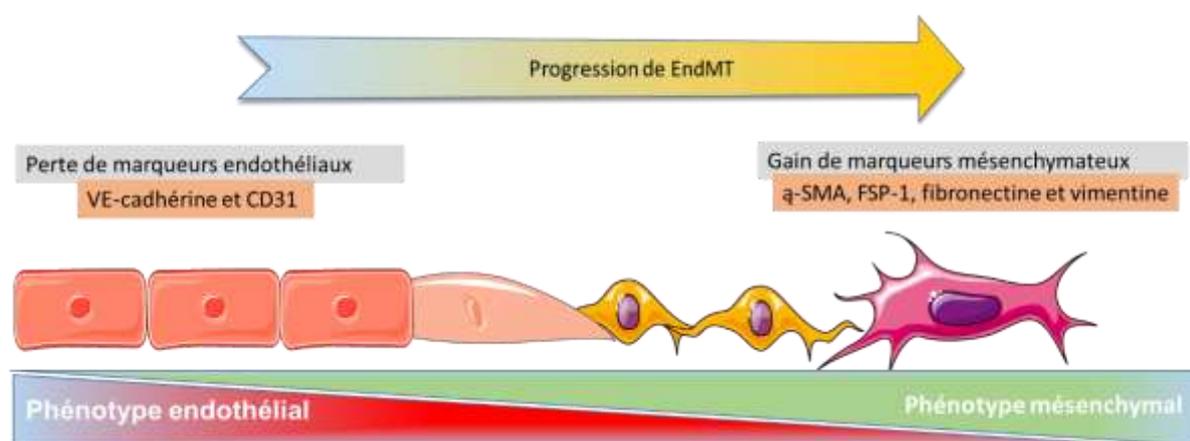


Figure 1.7. Transition endothéliale à mésenchymateuse (Pérez et *al.*, 2017). Au cours d'EndMT, les CE perdent l'expression de marqueurs endothéliaux tels que VE-cadhérine, CD31 et vWF, tout en commençant à exprimer les marqueurs spécifiques pour le phénotype mésenchymal fibrotique tels que α -SMA, FSP et les métalloprotéinases ainsi une altération morphologique de CE grâce à des changements dans l'expression protéique.

1.1.6. Dysfonction endothéliale

Le concept de la dysfonction endothéliale correspond à un rétrécissement de la biodisponibilité du NO (Puissant et *al.*, 2014). Les CE métabolisent la L-arginine à travers l'isoforme endothélial de l'oxyde nitrique synthase (eNOS) pour former du NO (Gimbrone and García-Cardena, 2016). La réduction de la synthèse du NO peut être due soit par captation du NO par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors du processus de stress oxydatif, soit par une augmentation de la libération de médiateurs inflammatoires, vasoconstricteurs en inhibant l'expression de eNOS (Liao, 2013; Puissant et *al.*, 2014). La dysfonction endothéliale déstabilise le mécanisme de l'homéostasie vasculaire à la vasoconstriction, à l'adhésion de leucocytes, à l'activation plaquettaire, au stress oxydatif, à la coagulation ainsi à l'inflammation et conduit à l'apparition de nombreux risques cardiovasculaires tels que le vieillissement, le diabète et l'hypertension artérielle (Favero et *al.*, 2014; Schini-Kerth, 2012).

1.1.7. Progression tumorale et CE

La croissance et les métastases tumorales dépendent de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse). Les vaisseaux sanguins tumoraux à proximité de la tumeur fournissent les nutriments et l'oxygène à la tumeur ce qui favorise sa croissance et sa progression (Hida and Maishi, 2018). Ces vaisseaux tumoraux sont composés de CE tumorales (CET) qui occupent la surface interne des vaisseaux et présentent des anomalies cytogénétiques, morphologiques et fonctionnelles. Ces anomalies comprennent la vitesse de roulement et la fréquence d'arrêt de leucocytes aux jonctions, une résistance aux médicaments anti-cancéreux, prolifération et migration activées et expression géniques très spécifiques (Fig 1.8) (Hida and Maishi, 2018; Maishi et *al.*, 2019).

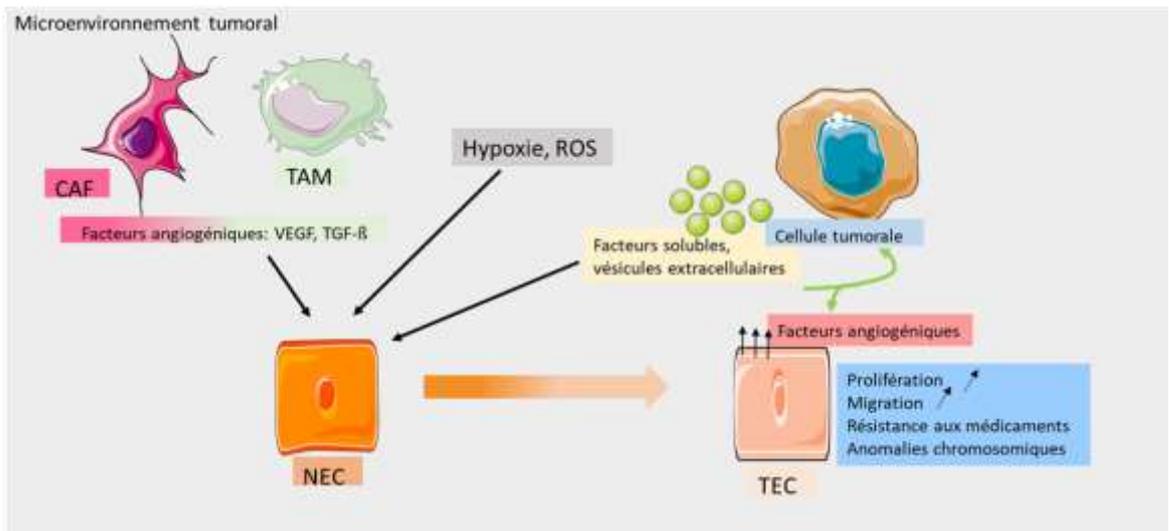


Figure 1.8. Anomalies des CET (Maishi et *al.*, 2019). Les facteurs solubles et les vésicules extracellulaires libérés à partir de cellules tumorales, FAC et TAM induisent des CE dans les vaisseaux préexistants pour initier l'angiogenèse pour la formation de vaisseaux sanguins tumoraux. De plus, l'hypoxie et ROS ont un effet sur la transformation du NEC en TEC. Les TEC ont une forte capacité de prolifération et migration ainsi des changements chromosomiques et développement d'un phénotype résistants aux médicaments. FAC : fibroblastes associées au cancer, TAM : macrophage associés au cancer, NEC : cellule endothéliale normale, TEC : cellule endothéliale tumorale.

1.1.7.1. Types des CET

Plusieurs types de CE sont impliqués dans le processus d'angiogenèse. Les CE de pointe qui guident la direction de germination vasculaire, les CE de tige qui sont fortement prolifératives et qui suivent les CE de pointe et les CE de phalange qui améliorent la perfusion et l'oxygénation vasculaire (Fig1.9). De plus, les péricytes ou les cellules musculaires lisses assurent la stabilisation vasculaire et finalisent l'angiogenèse (Hida et *al.*, 2018).

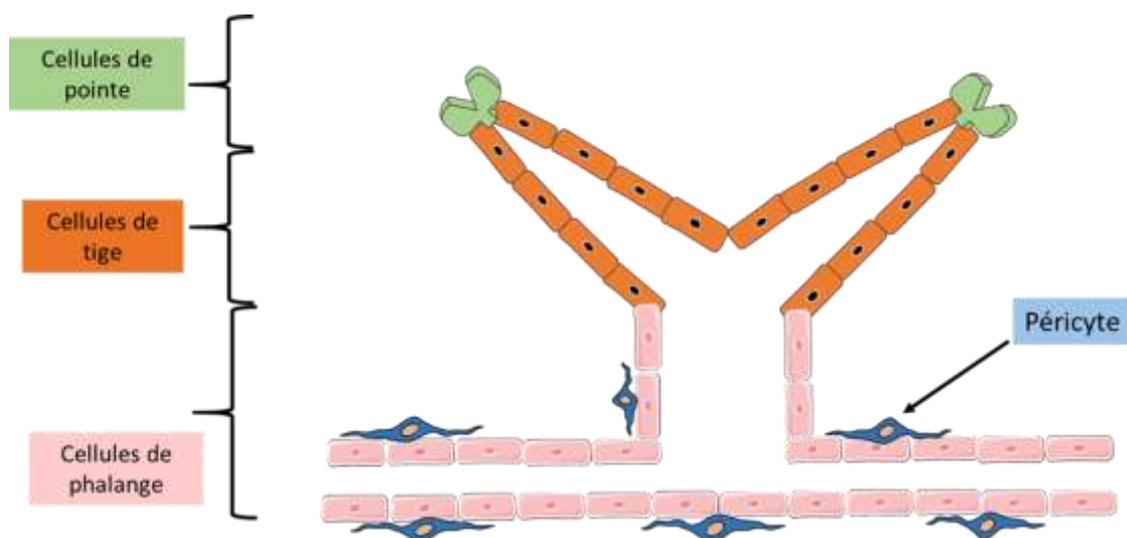


Figure 1.9. Types des CET (Hida et *al.*, 2018). Plusieurs types de CET sont présentes dans l'angiogenèse. Les cellules à l'extrémité de la branche de vaisseau sanguin (cellules de pointe) guident la germination vasculaire. Les cellules de tige suivent les cellules de pointe et les cellules de phalange améliorent l'oxygénation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les péricytes se fixent aux cellules de phalange (flèches noires).

1.1.7.2. Rôle de CET dans la progression tumorale

Les tumeurs se transforment progressivement vers un état agressif et maligne et les CET jouent un rôle important dans cette transformation. Elles fournissent les nutriments et l'oxygène à travers la circulation sanguine, forte expression régulée de récepteur VEGF qui peut adresser une réponse au CET afin d'exprimer le VEGF pour faciliter la néovascularisation désorganisée, ainsi que par une forte expression de molécules d'adhésion dans les CET qui forme un échafaudage des cellules tumorales provoque l'envahissement entre les CET. De plus, les CET libèrent des facteurs angiocrines et des médiateurs paracrines tels que l'IL-6, l'IL-8 et l'endothéline1 qui sont impliqués dans la croissance tumorale (Maishi et *al.*, 2019).

1.2. Métalloprotéinase (MMPs)

1.2.1. Définition

Les MMPs, découvertes en 1962 par Gross et Lapiere, sont une grande famille d'enzymes qui dégradent l'ECM et participent au traitement de molécules de surface (Li et *al.*, 2020; Shimoda and Khokha, 2017). Elles sont produites par la majorité des cellules immunitaires et non immunitaires, notamment par les macrophages, les neutrophiles, les CE et les cellules mésenchymateuse (Biancheri and MacDonald, 2017).

1.2.2. Structure

La structure de MMPs contient des domaines différents ce qui nous permet de les classés en six groupes. Structurellement, MMPs ont quatre domaines différents : un prédomaine (absent dans les MMPs de types membranaires), un domaine propeptide qui se compose d'environ 80 acide aminé (AA) et contient la séquence hautement conservée PRCGVDPV, domaine catalytique qui se compose d'environ 170 AA, contient une séquence conservée de trois histidine qui est responsable de la chélation en zinc (Zn) et enfin un domaine d'hémopexine d'environ 200 AA qui est indispensable pour les interactions avec d'autres MMPs et TIMPs (Fig 1.10). Les MMPs contiennent aussi un peptide linker connu sous le nom d'une région de charnière de longueur variable (Jabłońska-Trypuć et *al.*, 2016).

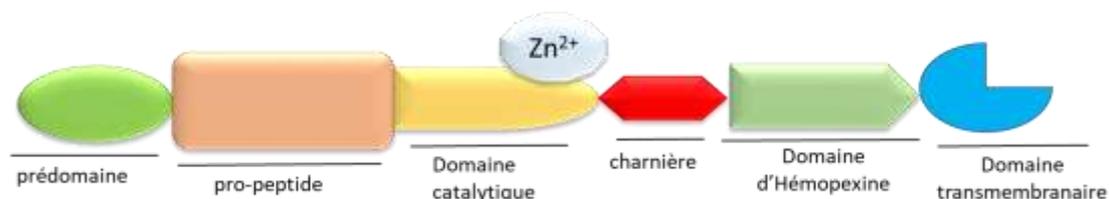


Figure 1.10. Structure des MMPs (Yadav et *al.*, 2014). Les MMPs sont composées d'un domaine propeptide qui est à la fin clivé pour permettre l'activation de l'enzyme, un domaine catalytique qui contient le Zn et est protégé sous la forme inactive de l'enzyme. Le domaine catalytique et Hémopoxine-like interagissent avec des domaines spécifiques des protéines cibles de l'enzyme.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2.3. Classification

La nomenclature des MMPs est complexe. Les MMPs sont numérotées par ordre de leur découverte, mais sont regroupées selon la spécificité de leurs substrats (Campana and Iredale, 2015). Les 24 MMPs sont classées en six groupes : Collagénase, Gélatinase, Stromelysines, Matrilysines, et les MMPs de type membranaire et les non classées (Tab 1.1) (King, 2016).

Tableau 1.1. Classification des MMPs selon leurs substrats spécifiques (Jabłońska-Trypuć et al., 2016).

Classification traditionnelle (nom commun)	Classification numérique	Localisation chromosomique	Substrat spécifique
1. Collagénase			
Collagénase-1	MMP-1	11q22-q23	Collagène (I, II, III, VII, VIII, X), caséine, entactine, laminine
Collagénase-2	MMP-8	11q21-q22	Collagène (I – III, V, VII, VIII, X), gélatine, aggrécan, fibronectine
Collagénase-3	MMP-13	11q22.3	-
2. Gélatinase			
Gélatinase A	MMP-2	16q13	Gélatine, collagène (IV – VI, X), élastine, fibronectine
Gélatinase B	MMP-9	20q11.2-q13.1	Gélatine, collagènes (IV, V, VII, X, XIV), élastine, fibrilline, ostéonectine
3. Stromelysines			
Stromelysin-1	MMP-3	11q23	Laminine, agrégane, gélatine, fibronectine
Stromelysin-2	MMP-10	11q22.3-q23	Collagènes (III – V), gélatine, caséine, aggrécan, élastine, MMP-1,8
Stromelysin-3	MMP-11	22q11.2	Fibronectine, laminine, aggrécan, gélatine
4. Matrilysines			
Matrilysine	MMP-7	11q21-q22	Collagène (IV – X), fibronectine, laminine, gélatine, aggrécan, pro-MMP-9
Métalloélastase	MMP-12	11q22.2-q22.3	Élastine, gélatine, collagène I, IV, fibronectine, laminine, vitronectine, Protéoglycanes

Chapitre 1. Revue de la littérature

Matrilysine-2	MMP-26	11p15	Gélatine, collagène IV, pro-MMP-9
5. MMPs de type membranaires			
MT-MMP-1	MMP-14	14q11-q12	Collagène (I, II, III), gélatine, fibronectine, laminine, agrécan, ténascine
MT-MMP-2	MMP-15	15q13-q21	Fibronectine, laminine, agrécan, perlécan
MT-MMP-3	MMP-16	8q21	Collagène III, gélatine, caséine
MT-MMP-4	MMP-17	12q24.3	Fibrinogène, précurseur du TNF
MT-MMP-5	MMP-24	20q11.2	Protéoglycanes

La famille de MMPs est composée de 24 membres et se divise en six grandes sous types selon leurs substrats spécifiques; Collagénases (MMP1,8,13), Gélatinases (MMP2,9), Stromelysines (MMP3,10,11), Matrilysines (MMP7,12,26), MMPs de type membranaire (MMP14,15,16, 17, 24) et le reste sont non classées. La localisation de MMPs au niveau de chromosomes se diffère d'un membre à un autre.

Les membres de la famille de MMPs partagent des similitudes structurelles (Fig 1.11). Certaines MMPs ont d'insertions supplémentaires qui contribuent aux différences fonctionnelles observées entre les différents membres de MMPs (Caley et al., 2015).

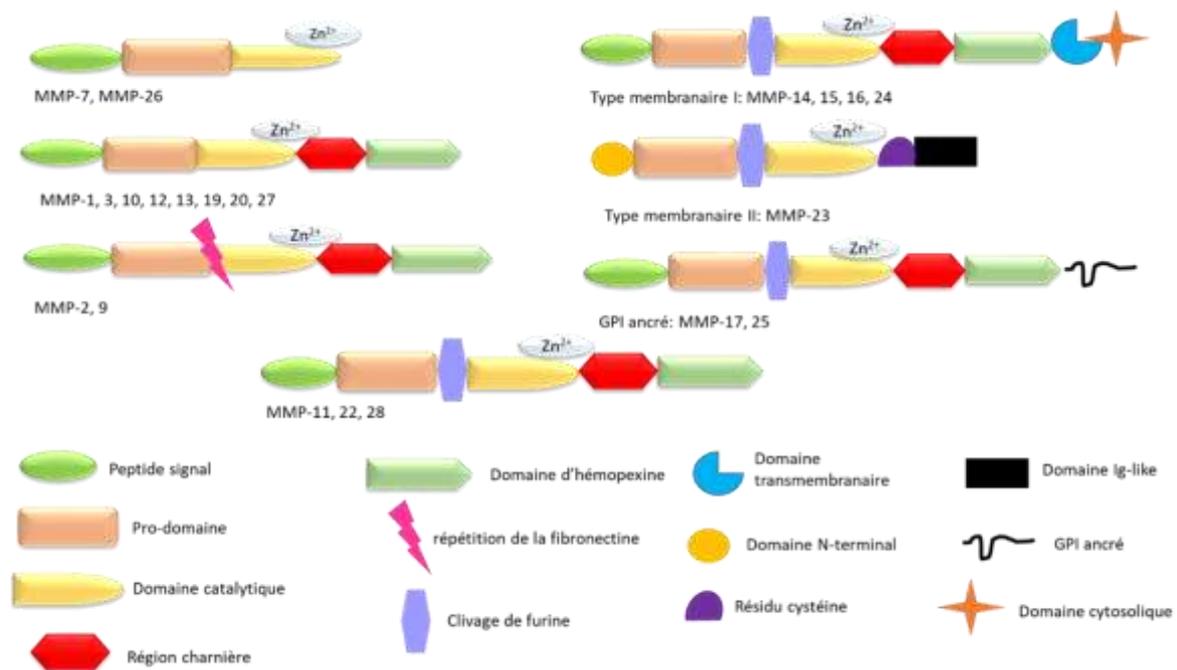


Figure 1.11. Classification structurale des MMPs (Araki and Mimura, 2017; King, 2016).

Les MMPs sont composées de différents sous-domaines. La plupart ont un domaine minimal (un peptide signal, un propeptide et un domaine catalytique), une région charnière et un domaine C-terminal de type hémopexine. Les gélatinases (MMP-2 et MMP-9) contiennent trois répétitions d'un motif de fibronectine de type II, dans le domaine catalytique. Le propeptide contient un site de clivage de la furine (motif RXKR) dans MMP-11, MMP-21, MMP-23, MMP-28 et MMP de type membrane. MMP-7, 23,26 ne contiennent pas la région charnière ou le domaine de l'hémopexine. MMP-23 est un peu différent, car il compose deux domaines qui lui sont propres le domaine immunoglobuline like (Ig-like) et les résidus de cystéines. MMP-17, 25 contient le glycoposphatidylinositol ancré (GPI) qui fixe la protéine à la membrane cellulaire. Fibronectine répétée présente dans MMP-2, 9 sont des unités qui lient le collagène au MMPs.

1.2.4. Expression génique des MMPs

Un équilibre entre l'activation et l'inhibition de MMPs est nécessaire pour une expression régulée de ces derniers (Chantrain and DeClerck, 2002). Les MMPs ne sont pas initialement exprimées de façon active, mais sous forme latente (pro-MMPs)(Caley et al., 2015). Donc, il existe trois niveaux essentiels pour l'expression de MMPs : régulation transcriptionnelle, activation de proenzymes et inhibition de l'activité enzymatique (Yadav et al., 2014).

L'expression de MMP est régulée. Les gènes de MMPs possèdent un site spécifique pour la liaison AP-1 dans leur région promotrice. Ce site est localisé à environ 70 paire de base (pb) en amont du site d'activation transcriptionnelle, ainsi la présence des médiateurs de communication cellulaires est indispensable dans l'activation transcriptionnelle de MMPs (Caley et al., 2015; Yadav et al., 2014). Les MMPs sont synthétisées de façon inactive « zymogène », après la rupture de l'interaction entre le cystéine-sulfhydryle de domaine propeptide et l'ion zinc lié au domaine catalytique. La rupture de cette interaction se fait par des facteurs d'activation physiques ou chimiques, pour permet l'autocatalyse et les MMPs seront actives (Isaacson et al., 2017; Yadav et al., 2014). La dernière étape est l'inhibition de l'activité protéolytique par des TIMP. Les TIMPs sont des protéines de 184 à 194 AA et de

Chapitre 1. Revue de la littérature

poinds moléculaire d'environ 210 Kilo Dalton (KDa), ils sont identiques à environ 40%. Leurs domaines N-terminal d'environ 125 AA qui interagissent avec le site actif de MMP d'une manière similaire aux substrats de MMPs est plus long que les domaines C-terminal 65 AA (Djuric and Zivkovic, 2017; Jackson et al., 2017). Ainsi, l'inhibition de MMPs se fait par de nombreuses molécules telles que α_2 -macroglobuline qui peut inhiber de façon irréversible les MMPs dans la circulation et la forme sécrétée de la protéine précurseur β -amyloïde peut inhiber MMP2 (Djuric and Zivkovic, 2017).

1.2.5. Métalloprotéinase-9

MMP-9 est l'une des membres de MMPs les plus étudiés, appartient à la sous famille de Gélatinases connue sous le nom de Gélatinase B de poids moléculaire 92 KDa. Le gène humain de MMP-9 est localisé au niveau du chromosome 20q13.12. Ce gène possède 13 exons et 12 introns. La structure de MMP-9 est définie par plusieurs domaines :

- un domaine d'hémopexine qui consiste en une hélice β à quatre pales pour former une structure en forme de tonneau. Ce domaine interagit avec des substrats comme la gélatine et le collagène
- Un domaine catalytique qui contient deux ions zinc, cinq ions calcium et trois répétitions de fibronectines de type II. Ces dernières sont nécessaires pour la dégradation des substrats
- un domaine propeptide et une région charnière qui confère une flexibilité entre le domaine d'hémopexine et le domaine catalytique
- un site actif et une région de la liaison de zinc (Huang, 2018; Yabluchanskiy et al., 2013)

La MMP9 est sécrétée par plusieurs types cellulaires ; neutrophiles, macrophages, fibroblastes et CE. Cette protéine est synthétisée sous forme zymogène avec 19 peptides signaux N-terminaux d'acide aminés dans les cellules, puis elle est sécrétée dans l'environnement extracellulaire sous forme pro-MMP9. Certaines protéases comme MMP-3 peuvent cliver la pro-MMP pour générer une MMP-9 active. La fonction majeure de MMP-9 est la régulation de l'ECM. Cette MMP clive le collagène dénaturé (gélatine) qui est l'élément principal de la membrane basale pour aider les lymphocytes et les leucocytes à entrer et quitter les circulations sanguines et lymphatiques (Huang, 2018; Ram et al., 2006).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2.6. Polymorphisme et mutations des MMPs dans les troubles héréditaires humaines

L'activité de MMPs dépend du gène qui les code, un polymorphisme génétique est le responsable de la détermination de niveau d'expression différent de ces gènes, ce qui aboutit un phénotype modifié de la maladie (Zhou et *al.*, 2013). La première mutation MMP associée à une déficience humaine dans deux familles consanguines d'Arabie Saoudite avec un syndrome de nodulose-arthropathie ostéolyse (NAO) ; une forme autosomique récessive d'ostéolyse multicentrique au niveau de chromosome 16. Deux mutations hétérozygotes MMP2 détectées chez un patient atteint du syndrome de Torg. La première est une R101H qui entraîne une déstabilisation de la liaison cystéine- zinc et la deuxième est une 1957delC qui provoque un décalage de cadre ce qui crée une protéine tronquée et non fonctionnelle (Fanjul-Fernández et *al.*, 2010). De plus, une mutation faux sens E404K entraîne une substitution de la position du glutamate en position 404 par la lysine à été observée chez les patients atteints du syndrome Winchester (Brinckerhoff, 2017). Une mutation autosomique dominante faux sens F56S dans la protéine de MMP13 est responsable du type Missouri de dysplasie spondyloépiméphysaire (SEMD) et conduit à une auto-dégradation anormale de la protéine MMP13 mutante. Enfin, des mutations de MMP20 sont impliquées ainsi dans une maladie héréditaire humaine « l'amélogenèse imparfaite autosomique récessive (ARAI) » qui est caractérisée par trois mutations; la première a été identifiée à l'extrémité 3' de l'intron 6 où AG a changé en TG, la deuxième W34X mutation de substitution qui génère un codon stop dans l'exon 1 de MMP20 et la dernière dans le gène H226Q modifie l'un des résidus d'histidine conservés dans le domaine catalytique en perturbant le site de ligand de zinc (Fanjul-Fernández et *al.*, 2010).

1.2.7. Rôle des MMPs

Les MMPs ont des rôles biologiques associés au renouvellement et au remodelage des composants de l'ECM (Rodríguez et *al.*, 2010). Elles sont impliquées dans la prolifération du comportement cellulaire, l'adhésion, la migration, la mort cellulaire « apoptose », l'homéostasie tissulaire, la morphogenèse, l'angiogenèse et la réparation tissulaire (Isaacson et *al.*, 2017, 2017). La dérégulation et la surexpression des MMPs sont considérées comme les principaux déclencheurs de plusieurs pathologies (Khamisabadi et *al.*, 2020), y compris l'arthrite, les maladies cardio-vasculaires, les maladies pulmonaires et le cancer (Isaacson et *al.*, 2017).

1.3. Implication des Métalloprotéinases dans le cancer

Le cancer est une instabilité ou bien une dérégulation génétique et épigénétique conduisant à des mutations soit uniques soit communes ainsi une surexpression des gènes étrangers dans certains tissus (Niederhuber, 2019). Chen et *al* ont décrit en 2013 le concept de l'immunité anti tumorale. La défense immunitaire contre les cellules cancéreuses repose sur un enchaînement continu de plusieurs étapes : libération des antigènes (Ag) tumoraux à partir des cellules tumorales, présentation de ces Ag par des cellules présentatrices de l'Ag aux lymphocytes T (LT) , activation de LT qui vont migrer pour éliminer et détruire les cellules tumorales (Abbassi et *al.*, 2020).

La famille des MMPs joue un rôle clé dans le développement et la progression tumorale. Certaines MMPs sont considérées comme des biomarqueurs de plusieurs cancer humains (Roy et *al.*, 2019). L'expression précoce de MMPs par les cellules stromales ou par les cellules tumorales elles-mêmes permet le remodelage de l'ECM et/ou la libération des facteurs de croissance liés à la membrane, ce qui fournit un environnement favorable à l'établissement de la tumeur primaire (Kapoor et *al.*, 2016). Les MMPs facilitent la métastase et l'invasion des cancers et permettent ainsi l'évasion des cellules tumorales dans les tissus environnants et l'approvisionnement en sang (Fig 1.12)(King, 2016)

1.3.1. MMPs et perte d'adhérence

Les MMP-3 et 7 sont impliquées dans la perte de la propriété d'adhérence cellulaire et la modification phénotypique de certains types de cellules. Par exemple dans les cellules épithéliales d'une tumeur carcinomateuse, ces MMPs digèrent la cadhérine-E , cessent les adhérences intercellulaires des épithélium et facilitent l'expression des gènes promoteurs du cancer en stimulant le transfert de la β -caténine à partir de la cadhérine-E vers le noyau de la cellule (Chantrain and DeClerck, 2002).

1.3.2. MMPs et invasion

L'invasion du cancer à travers de l'ECM est assurée par les MMPs qui jouent un rôle dans la dégradation de l'ECM, par la création des voies de migration cellulaire (Das et *al.*, 2017). Le sous type de Gélatinases (MMP-2 et 9) a une activité protéolytique anti-protéine de la membrane basale (Collagène IV et V) et MMP-1 et MT1-MMP agissent contre le collagène interstitiel (I, II ou III) au niveau des tissus conjonctifs qui entourent les cancers invasifs (Chantrain and DeClerck, 2002).

1.3.3. MMPs et prolifération

Les Stromélysines sont susceptible de digérer des protéines extracellulaires qui séquestrent les facteurs de croissance tels que l'IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein 3) qui forme un complexe avec IGF-II (insulin-like growth factor) ou de perlécan qui cache le bFGF (basic fibroblast growth factor). Les MMPs agissent sur la prolifération des cellules tumorales par des changements structurels et phénotypiques (Chantrain and DeClerck, 2002).

1.3.4. MMPs et angiogénèse

Le processus d'angiogénèse comprend diverses modifications comme la dégradation de la membrane basale vasculaire, la prolifération et la migration de CE, la structure de la lumière et la formation d'un réseau vasculaire (Guo et *al.*, 2018). Les MMPs peuvent stimuler ou inhiber l'angiogénèse. Ainsi, les membres suivants MMP-2, 9, 14 exercent un rôle important au cours de ce processus, dans la dégradation de composants d'ECM et aussi la perturbation de la membrane basale pour la migration de CE des vaisseaux existants vers les vaisseaux nouvellement créés. Les MMPs libèrent le facteur angiogénique VEGF et activent la voie intracellulaire de l'intégrine et dans l'autre part, les MMP-2, 7, 9 et 12 peuvent inhiber l'angiogénèse en libérant l'angiostatine après un clivage de plasminogène pour augmenter l'apoptose dans les cellules cancéreuses, ainsi la libération d'endostatine après clivage de Collagène XVII à partir de MMP-3, 7, 9, 12, 13 et 20 qui forment un complexe des complexes avec pro-MMP13 et 9 afin de bloquer leurs activation (Jabłońska-Trypuć et *al.*, 2016).

1.3.5. MMPs et métastase

L'étape de la métastase est considérée comme la cause principale de mortalité de la plupart des cancers solides. Les MMPs sont impliquées dans chaque étape de la formation de métastase. La MMP-7 permet la conversion de la E-cadhérine, une protéine d'adhésion cellule-cellule en une forme soluble dans le cancer, facilitant aux cellules tumorales de se déloger de la tumeur et de devenir motile. Ainsi, les MMPs dans la métastase sont impliquées dans l'intravasation de cellules tumorales dans la circulation à partir de la régulation de la MMP-1 de la perméabilité endothéliale et la migration trans-endothéliale (Isaacson et *al.*, 2017)

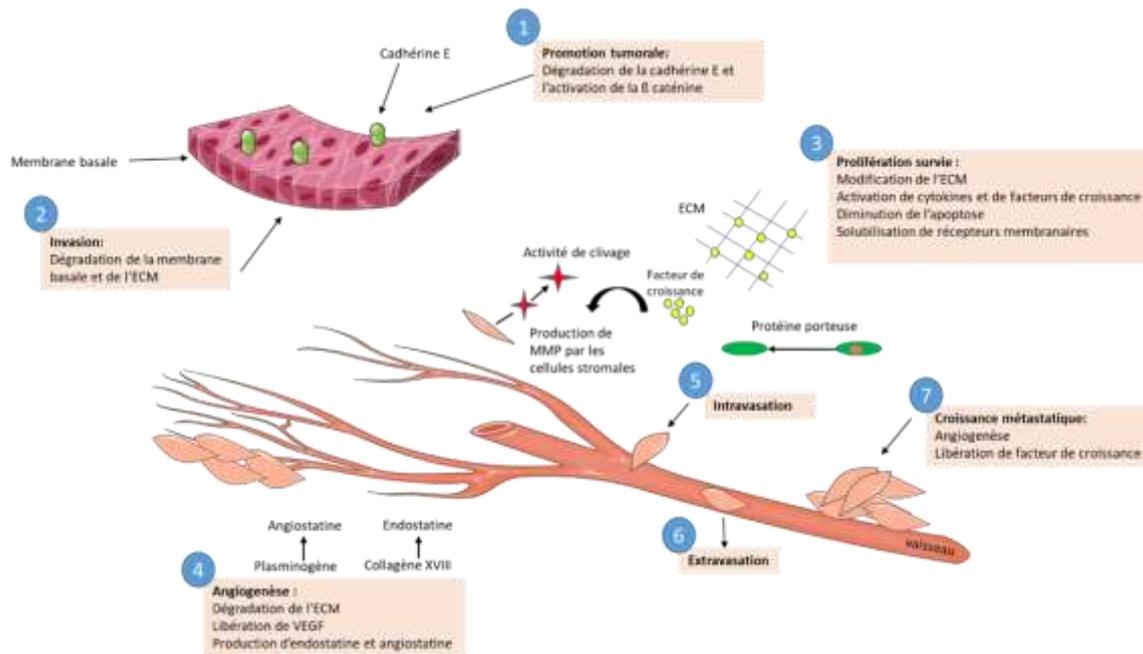


Figure 1.12. Rôle des Métalloprotéinases dans la progression tumorale (Chantrain and DeClerck, 2002). Les MMPs sont impliquées dans chaque étape de la progression de la tumeur. La promotion de la tumeur se fait par la dégradation de la cadhérine-E qui active la voie de la β -caténine. L'invasion se caractérise par la dégradation de l'ECM. La prolifération est associée avec une large libération de facteurs de croissance par la dégradation de l'ECM. La prolifération est associée avec une large libération de facteurs de croissance séquestrés, activation de l'activité cytokinique avec un changement au niveau de l'ECM. Dans l'étape de l'angiogenèse, il y a la production d'endostatine et d'angiostatine suivie par les étapes d'intravasation et extravasation et à la fin la phase métastatique.

1.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1.4.1. Définition

L'amplification de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) par PCR est l'un des développements technologiques les plus importants dans l'histoire de la biologie moléculaire (Martin, 2019). La PCR est une technique élégante, dont l'efficacité et la sensibilité dépendent largement de la spécificité des amorces. Elle permet l'amplification d'un segment d'ADN spécifique à partir d'un mélange complexe d'ADN (Garibyan and Avashia, 2013; Kumar and Chordia, 2015).

1.4.2. Principe

La PCR est basée sur plusieurs critères : elle demande de connaître les séquences d'extrémités de la région à amplifier et de les utiliser pour élaborer des amorces nucléotidiques. Après fixation des amorces sur leurs séquences par complémentarité, la région d'ADN visée est copiée par incorporation des désoxyribonucléotides (dNTP) libres grâce à une enzyme ADN polymérase (Uhel et al., 2019).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.4.3. Etapes et outils de la PCR

La PCR consiste des étapes nécessaires pour la réussite et la conformité des résultats (Fig 1.13).

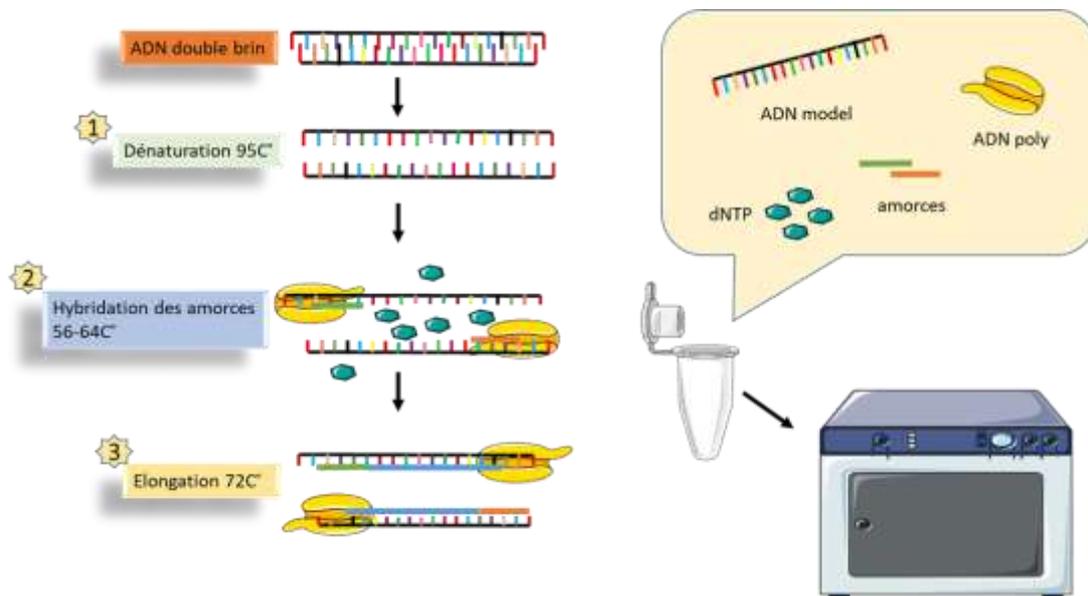


Figure 1.13. Processus de fonctionnement de la PCR(Marx, 2016; Uhel et al., 2019). La première étape est la dénaturation à 95°C pour séparer les deux brins d'ADN et ainsi pour inhiber l'activité de certaines enzymes présentes dans la solution. La deuxième étape est l'hybridation (56-64°C). Dans cette étape, les amorces se fixent avec leurs brins d'ADN dénaturés grâce à la complémentarité. Dans l'étape de l'élongation 72°C, l'enzyme Taq polymérase (Taq poly) synthétise le brin complémentaire de chaque brin d'ADN par l'intermédiaire de dNTP libres.

1.5. Problématique

Les CE sont le composant principal du système vasculaire en formant un organe spécifique appelé l'endothélium. Ces cellules sont considérées comme une barrière sélective de perméabilité vasculaire. Elles interagissent avec des facteurs chimiques et physiques dans la circulation et régulent l'homéostasie, le tonus vasomoteur et les réactions inflammatoires. Enfin, elles sont impliquées dans divers phénomènes physiologiques. Une lésion ou une dysfonction endothéliale est un signe de plusieurs états pathologiques.

Les MMPs sont membres d'une grande famille d'enzymes qui nécessitent un ion zinc dans leur site actif pour l'activité catalytique. Au cours de dernières décennies, de nombreuses études ont étudié le rôle de la famille de MMPs exprimées par les CE, notamment la MMP-9 au cours du développement tumoral.

Lors d'une réalisation d'une PCR, l'étape de conception des amorces est sans doute l'étape la plus critique de la réussite de la technique. Par conséquent, une aberrante conception conduit à une insuffisance à optimiser les conditions de la réaction. Le processus de conception comprend un travail complet qui nécessite une attention non seulement aux

Chapitre 1. Revue de la littérature

amorces elles-mêmes mais également à l'unicité, à la structure, et à l'emplacement de l'amplicon afin de créer une liaison d'amorce/amplicon.

Objectif : Concevoir les amorces du gène *MMP-9* exprimé par les CE au cours du cancer.

But : Déterminer la paire d'amorces spécifique au gène *MMP-9* qui servira à réaliser une PCR afin d'étudier l'importance de son expression par les CE au cours du cancer.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Choix des amorces

Les amorces sont les principaux déterminants de la spécificité de la PCR pour assurer une bonne amplification d'une telle séquence d'ADN. Les sites d'amorces sur l'ADN visé doivent être connus (van Pelt-Verkuil et al., 2008). Ce sont des courts fragments d'ADN ou d'Acides ribonucléiques (ARN) qui forment des paires de bases complémentaires avec l'ADN cible via l'appariement de Watson and Crick (Elkins, 2015).

Les amorces sont l'élément principal dans chaque essai PCR, elles doivent répondre aux critères suivants :

- La longueur de l'amorce : les apprêts (amorces) doivent être spécifiques pour la séquence visée. La longueur des amorces d'ARN sont relativement courtes d'environ 5 à 10 oligonucléotides, tandis que les amorces d'ADN sont plus longues d'environ 18 à 35 oligonucléotides (Elkins, 2015).
- La température de fusion (T_m) : une valeur T_m des amorces allant de 55 à 60 °C est recommandée. On peut calculer cette valeur en utilisant la formule de Wallace 1979, $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$ (Kamel, 2003; Rodríguez et al., 2015).
- La spécificité : la sélection des amorces est le critère de la réussite de leur conception. Les amorces doivent être choisies d'une manière précise. Elles doivent être uniques dans la séquence qu'on veut amplifier (Kamel, 2003).
- Le pourcentage en CG : pour la validation d'une bonne paire d'amorce le contenu de CG doit être compris de 40 et 60 % (Elkins, 2015).
- La complémentarité : les amorces doivent être conçues sans aucune homologie intra-amorces (auto-complémentarité) pour éviter l'épingle à cheveux et les erreurs d'amorçage (Kamel, 2003).

2.2. Conception d'amorces pour le gène *MMP-9*

2.2.1. Recherche de la séquence de référence du gène *MMP-9*

La première étape pour commencer la conception d'amorces du gène *MMP-9* est d'accéder à la base de données « Ensembl » à partir du site www.ensembl.org (Fig 2.1). Cette base de données nous permet de connaître la séquence complète du gène.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

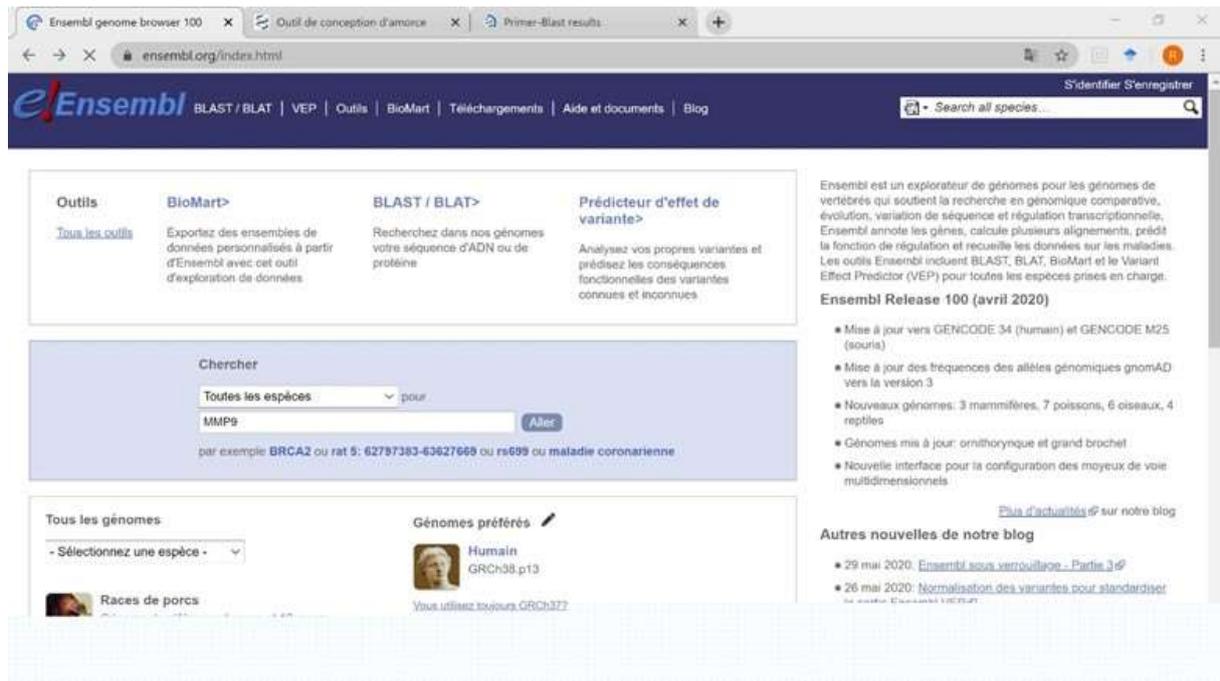


Figure 2.1. Plateforme de la base de données Ensembl.

La séquence complète de *MMP-9* est trouvée sous le code ENSG00000100985. En appuyant sur le titre de *MMP-9* (gène humain), une description génétique du gène (intron, exon, chromosome,...) s'affiche (Fig 2.2). La séquence s'affiche en cliquant sur « séquence » (Fig 2.3).

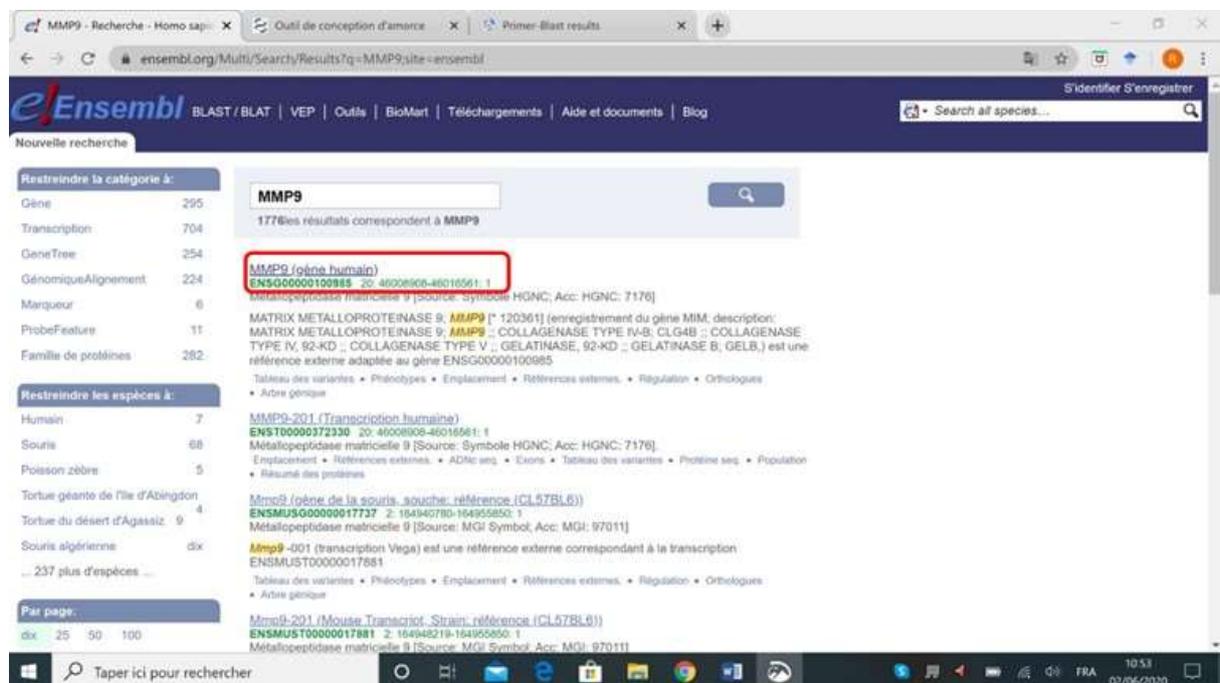


Figure 2.2. Le gène humain *MMP-9* à partir d'Ensembl.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

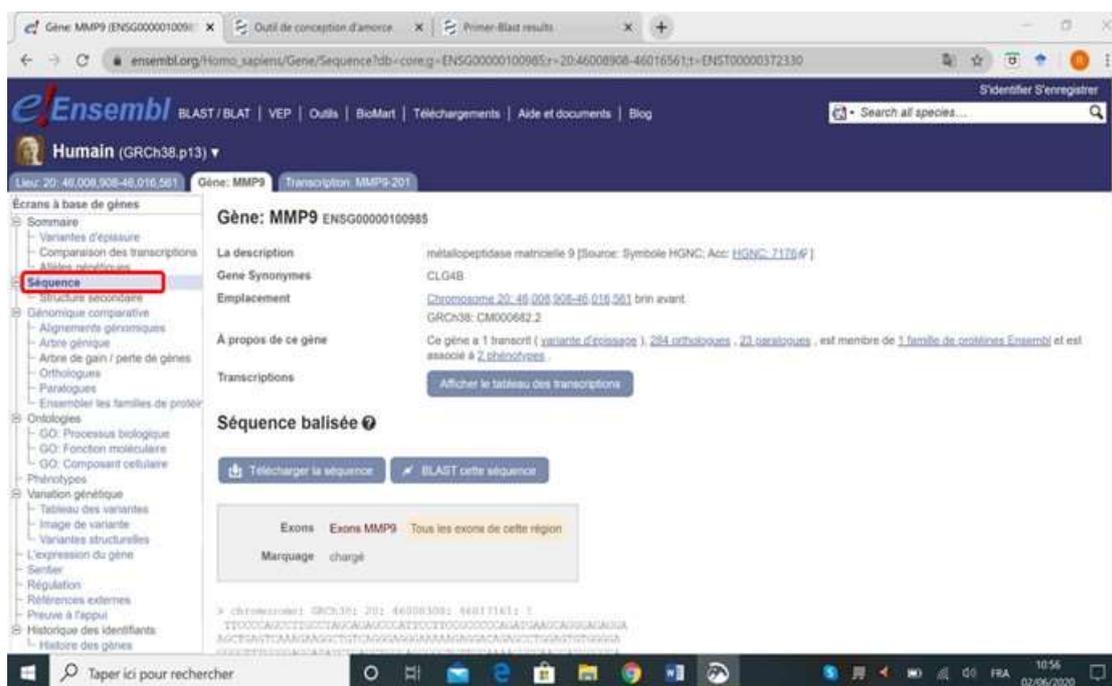


Fig 2.3. La séquence du gène ciblé et d'autres caractéristiques de ce gène.

Dans notre étude nous avons choisi l'exon 1. La séquence contenant l'intron (caractères en noir) et l'exon (caractères en rouge) est collée dans un document Word, puis encadrée (Fig 2.4).

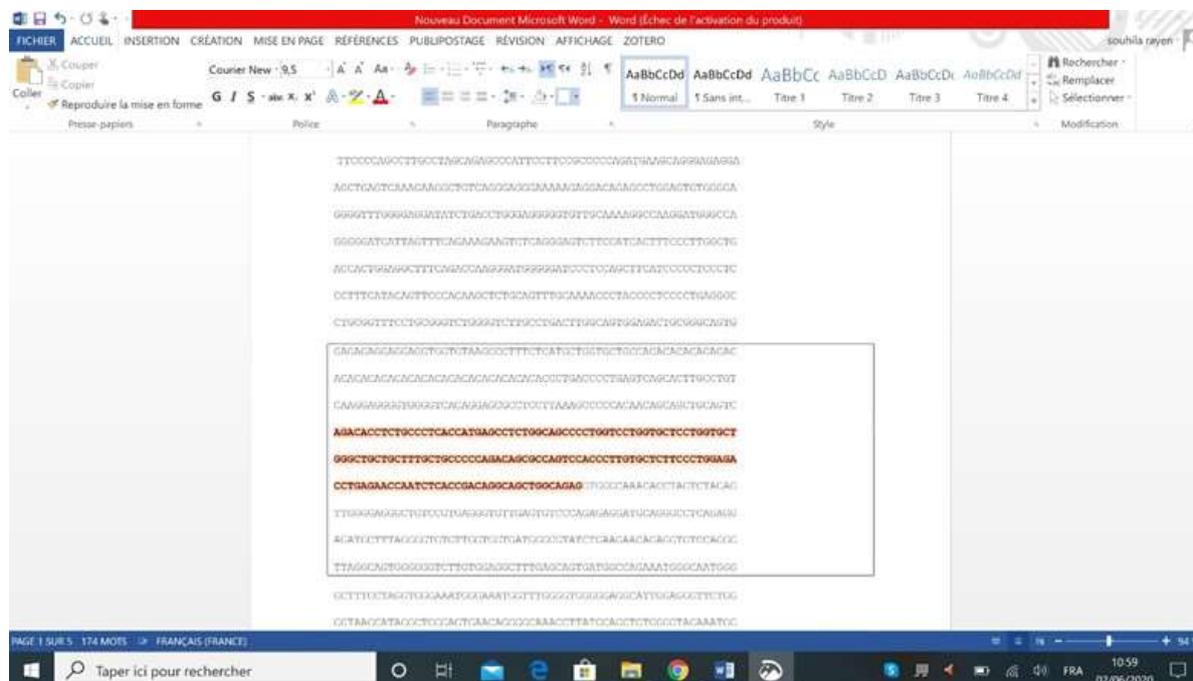


Figure 2.4. La partie encadrée de la séquence du *MMP-9* dans un document Word.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.2.2. Outil Primer-Blast

L'outil Primer-Blast à partir de la base de données généralisée National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Site : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) a été utilisé afin de concevoir les amorces à partir de la séquence encadrée (Fig 2.5 et 2.6).

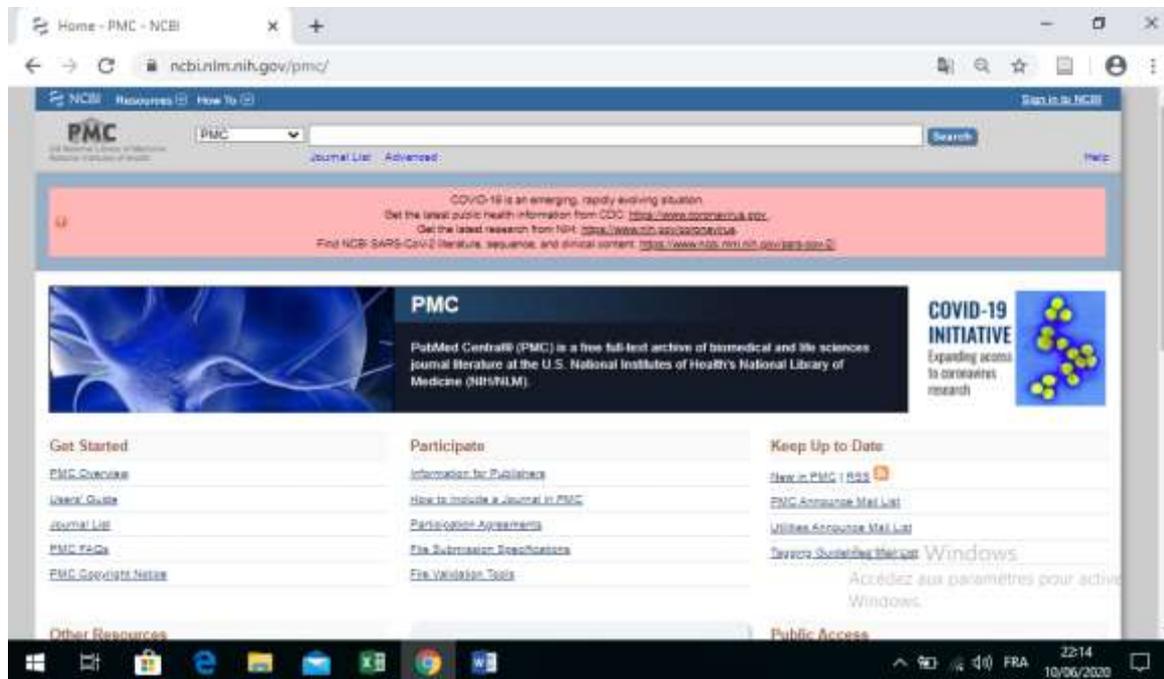


Figure 2.5. La base de données NCBI.

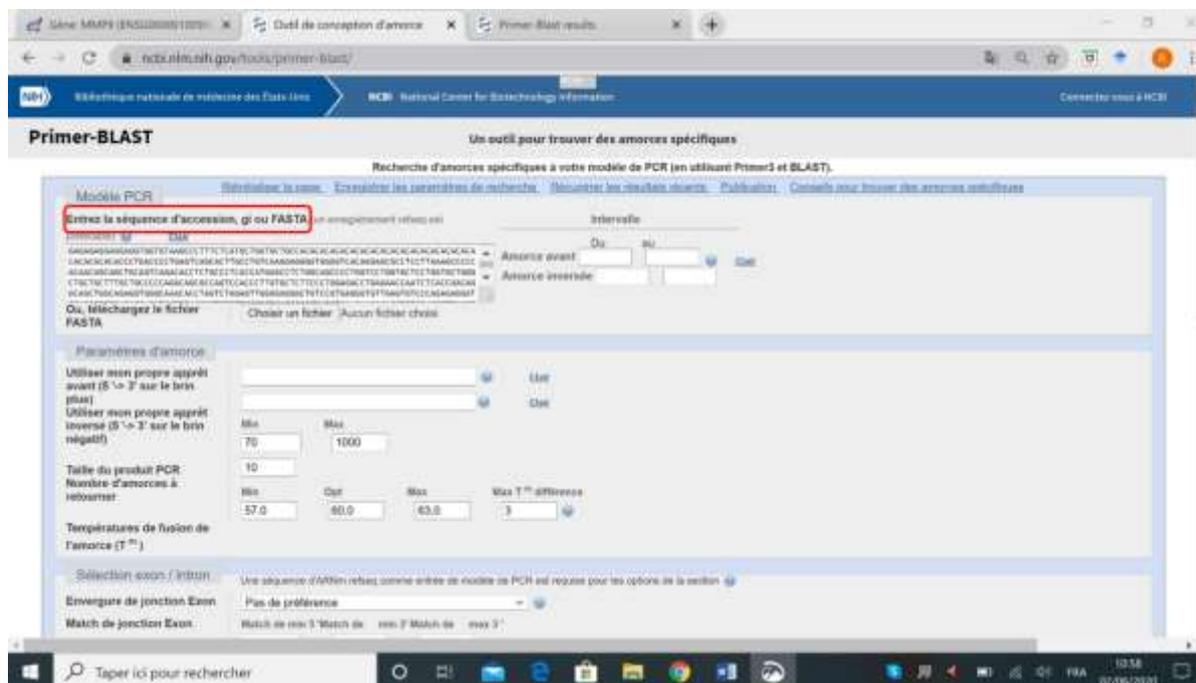


Figure 2.6. L'outil Primer-Blast.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

Certains paramètres de vérification de la spécificité de la paire d'amorce doivent être vérifiés (Fig 2.7). Après vérification, on lance l'opération de conception en appuyant sur « Get Primers ».

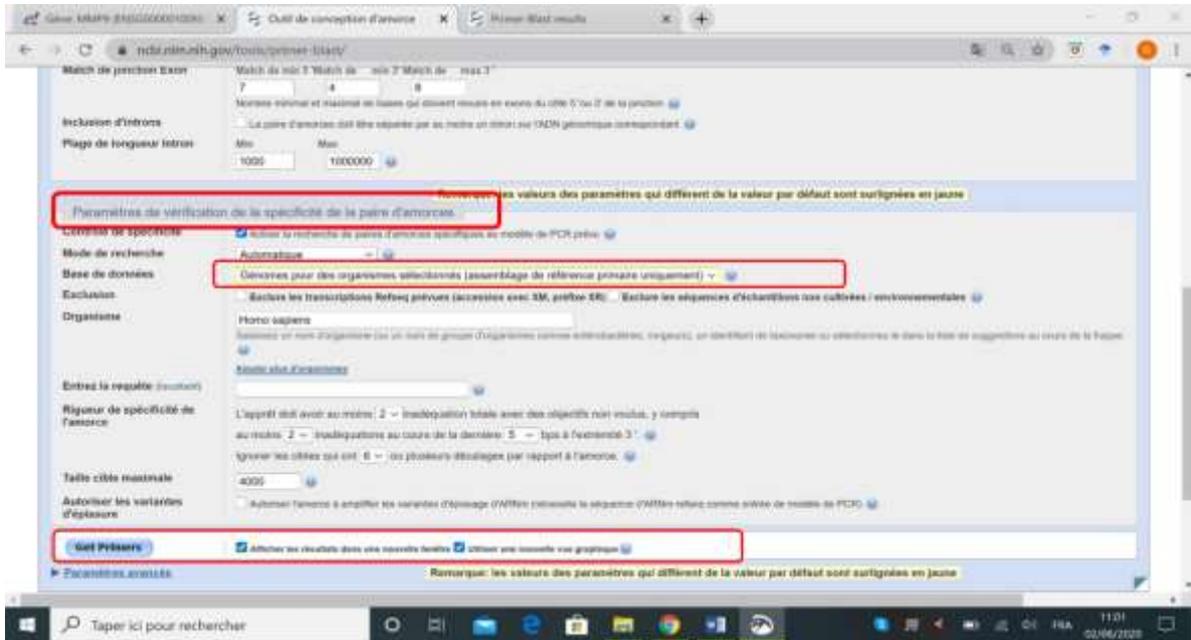


Figure 2.7. L'étape pour récupérer l'amorce ciblée dans Primer-Blast.

2.2.3. Confirmation des résultats : *in-silico* PCR

Afin de confirmer la fiabilité de nos amorces conçues, *in-silico* PCR a été réalisé en utilisant la base de données suivante : genome.ucsc.edu. La paire d'amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes d'amorces doit être vérifiée. Pour se faire, il faut copier la séquence de l'amorce sens obtenu à partir de l'outil Primer-Blast et la séquence de l'amorce anti-sens dans leurs cases appropriées (Fig 2.8).

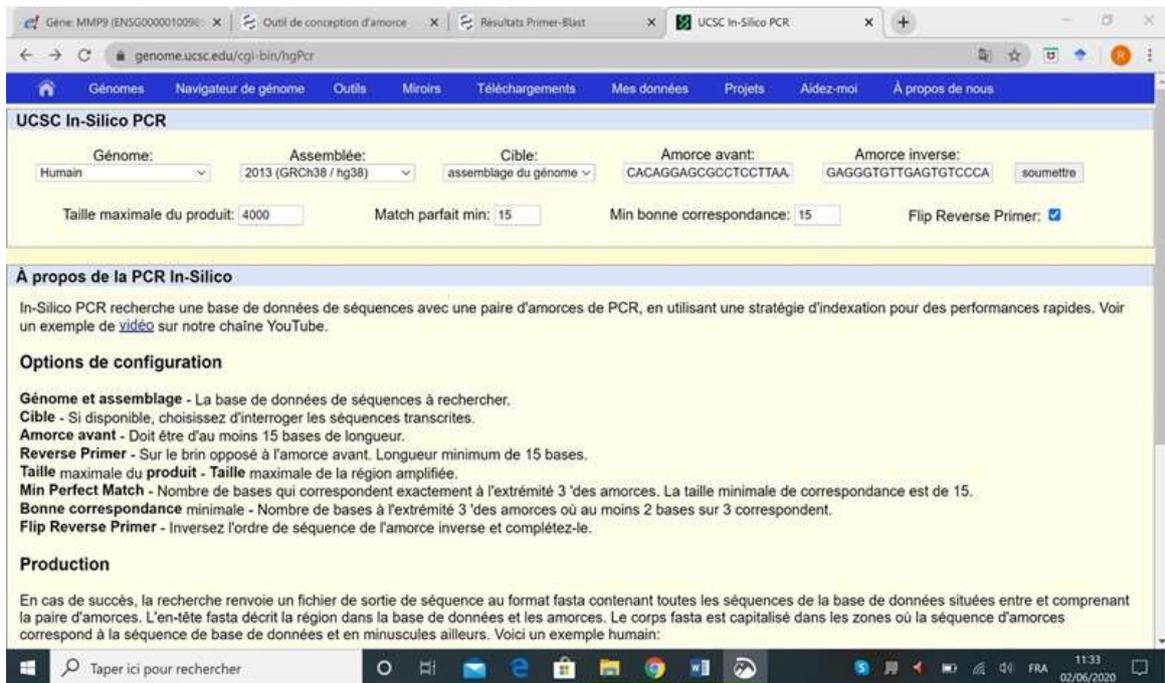


Figure 2.8. Site web *in-silico* PCR.

Chapitre 3. Résultats

3.1. Analyse de résultats de Primer-Blast

Dans le présent travail, nous avons passé par plusieurs étapes afin de concevoir nos amorces spécifiques au gène *MMP-9*. Après avoir connaître sa séquence en utilisant l'outil Ensembl, les amorces ont été conçu en utilisant l'outil Primer-Blast. Ce dernier nous a donné une dizaine de paires d'amorces. Nous avons choisi la première paire d'amorces parce qu'elle présente des produits aspécifiques supérieurs de 1000 pb (Fig 3.1 et 3.2).

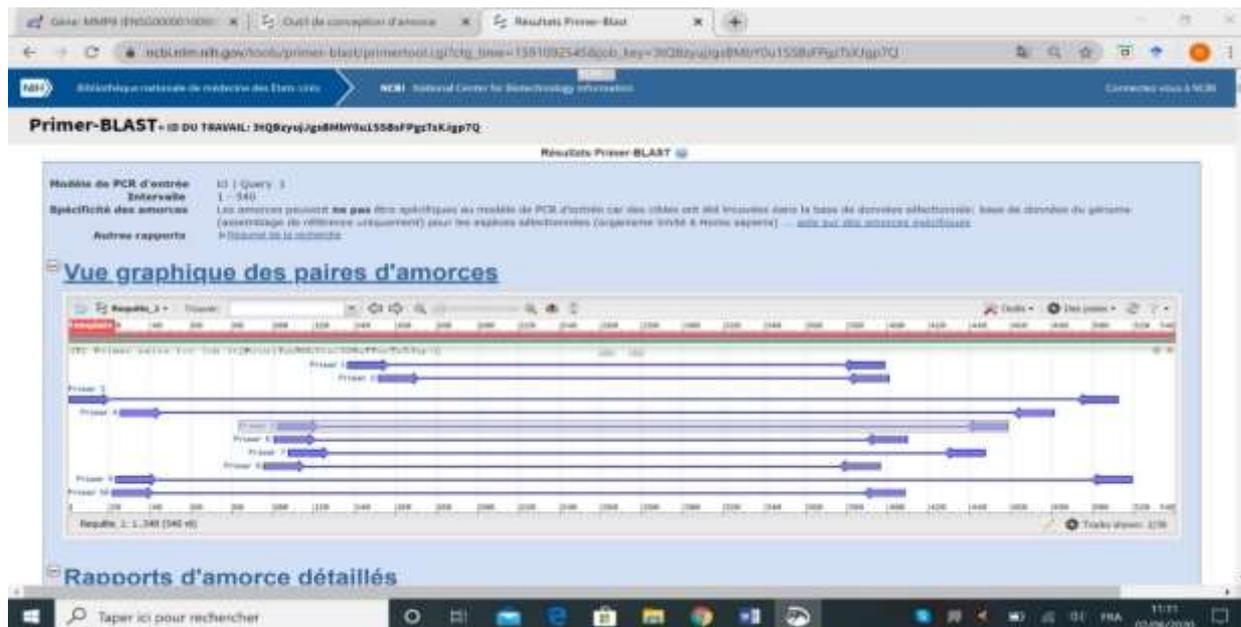


Figure 3.1. Vue graphique des paires d'amorces prise par Primer-Blast.

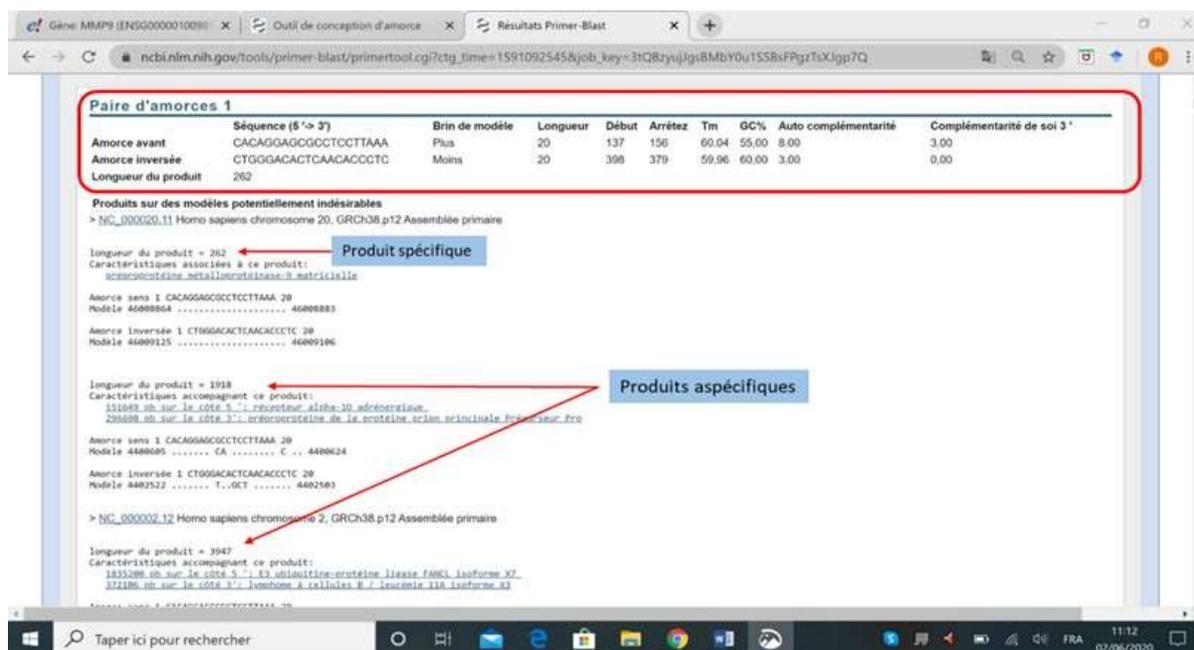


Figure 3.2. Caractéristiques de la première paire d'amorces.

Chapitre 3. Résultats

Le premier critère que nous a permis de choisir cette paire d'amorces est le fait qu'elle contient un produit spécifique inférieur à 1000pb (262pb) et des produits aspécifiques supérieurs à 1000 pb. La PCR n'a pas la capacité d'amplifier de produits plus de 3000 pb. De plus, cette paire d'amorces a une longueur de 20 nucléotides. Une bonne amorce doit avoir une longueur comprise entre 18 et 35 nucléotides pour le cas d'une amorce d'ADN.

Pour la T_m , la meilleure T_m est de 60 °C et la différence entre l'amorce sens et l'amorce anti-sens ne dépasse pas 5°C. La paire d'amorces que nous avons choisies répond parfaitement à ce critère. Elle présente une T_m de 60.04°C pour l'amorce sens et 59.96°C pour l'amorce anti-sens.

Enfin, le dernier paramètre qui nous a suscité de choisir la première paire d'amorce est son pourcentage en GC qui est compris entre 55-60%.

3.2. Résultat de confirmation par *in-silico* PCR

La paire d'amorce choisie a subi une confirmation par une *in-silico* PCR en utilisant le site <http://genome.ucsc.edu/>. Le résultat de la confirmation obtenu (Fig 3.3) nous montre que nos amorces se localisent sur le chromosome 20, ce qui a confirmé la spécificité de ses amorces du gène *MMP-9*.

The screenshot shows the UCSC In-Silico PCR results for the MMP-9 gene. The browser window displays the UCSC Genome Browser interface. The results section shows the genomic coordinates for chromosome 20 (46088864 to 46089125) and the corresponding DNA sequence. Below the sequence, the melting temperatures for the forward and reverse primers are shown as 62.7°C and 60.6°C, respectively. The page also includes a 'Aidez-moi' section with links for help and local machine replication.

Figure 3.3. Résultats d'*In-Silico* PCR.

Chapitre 4. Conclusions et perspectives

Les CE sont le composant clé de l'endothélium qui tapisse la face interne de vaisseaux sanguins et qui impliqué dans divers processus physiologiques ou pathologiques. En cas de son dérèglement, des troubles cardio-vasculaires et une croissance tumorale peuvent s'installer.

Les MMPs sont une famille d'enzymes protéolytiques qui ont la capacité de dégrader les composants de l'ECM. Elles sont produites par la plupart de cellules immunitaires et participent à la prolifération, la migration, l'adhésion et la mort cellulaire. Une expression aberrante de MMPs permet l'apparition des plusieurs maladies. En effet, plusieurs méthodes de biologie moléculaire sont utilisées afin de contrôler l'expression des MMPs et de comprendre leur implications dans plusieurs pathologies. La MMP-9 est l'une des MMPs les plus étudiées. Elle permet de réguler le remodelage des tissus par la dégradation de l'ECM et l'activation les cytokines et les chimiokines.

La conception des amorces afin de réaliser une PCR a plusieurs avantages dans les domaines médicaux et biologiques. En médecine, cette méthode permet de diagnostiquer les maladies génétiques. En biologie, la conception des amorces facilite l'identification des polymorphismes dans les séquences nucléotidiques pour la production pharmacologique ainsi le développement des combinaisons thérapeutiques pour traiter les tumeurs.

Dans notre travail, nous avons conçu des amorces spécifiques du gène *MMP-9* afin d'étudier ultérieurement son expression par les EC en cas de cancer.

Les procédures de biologie moléculaire sont des techniques prometteuses qui fournissent une excellente sensibilité, spécificité et un gain de temps par rapport aux techniques conventionnelles, donc la conception des amorces est nécessaire avant de toute étude, c'est pour cela des algorithmes de bio-informatiques nous aident de retrouver les séquences de références pour faire une parfaite conception.

Chapitre 5. Bibliographie

Abbassi, L.M., Cao, K.I., and Kirova, Y.M. (2020). Immunothérapie et radiothérapie dans la prise en charge du cancer du sein : rationnel et synthèse de la littérature sur les applications cliniques actuelles. *Cancer/Radiothérapie* 24, 73–80.

Aird, W.C. (2012). Endothelial Cell Heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, a006429–a006429.

Aitoufella, H., Maury, E., Guidet, B., and Offenstadt, G. (2008). L'endothélium : un nouvel organe. *Réanimation* 17, 126–136.

Al-Soudi, A., Kaaij, M.H., and Tas, S.W. (2017). Endothelial cells: From innocent bystanders to active participants in immune responses. *Autoimmunity Reviews* 16, 951–962.

Araki, Y., and Mimura, T. (2017). Matrix Metalloproteinase Gene Activation Resulting from Disordred Epigenetic Mechanisms in Rheumatoid Arthritis. *IJMS* 18, 905.

Biancheri, P., and MacDonald, T.T. (2017). Matrix Metalloproteinases. In *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*, D.C. Baumgart, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 135–140.

Boström, K.I., Yao, J., Wu, X., and Yao, Y. (2018). Endothelial Cells May Have Tissue-Specific Origins. *J Cell Biol Histol* 1.

Brinckerhoff, C.E. (2017). Matrix metalloproteinases in health and disease: sculpting the human body.

Bus, P., Gerrits, T., Heemskerk, S.A.C., Zandbergen, M., Wolterbeek, R., Bruijn, J.A., Baelde, H.J., and Scharpfenecker, M. (2018). Endoglin Mediates Vascular Endothelial Growth Factor-A–Induced Endothelial Cell Activation by Regulating Akt Signaling. *The American Journal of Pathology* 188, 2924–2935.

Caley, M.P., Martins, V.L.C., and O'Toole, E.A. (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care* 4, 225–234.

Campana, L., and Iredale, J. (2015). Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors. In *Stellate Cells in Health and Disease*, (Elsevier), pp. 107–124.

Chantrain, C., and DeClerck, Y.A. (2002). Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)* 18, 565–575.

Chao, H., and Hirschi, K.K. (2010). Hemato-vascular origins of endothelial progenitor cells? *Microvascular Research* 79, 169–173.

Das, A., Monteiro, M., Barai, A., Kumar, S., and Sen, S. (2017). MMP proteolytic activity regulates cancer invasiveness by modulating integrins. *Sci Rep* 7, 14219.

Djuric, T., and Zivkovic, M. (2017). Overview of MMP Biology and Gene Associations in Human Diseases. In *The Role of Matrix Metalloproteinase in Human Body Pathologies*, F. Travascio, ed. (InTech), p.

Elkins, K.M. (2015). Primer Design for PCR Reactions in Forensic Biology. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 17–30.

Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., and López-Otín, C. (2010). Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 3–19.

- Garibyan, L., and Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1–4.
- Gimbrone, M.A., and García-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 620–636.
- Gomez-Salineró, J.M., and Rafii, S. (2018). Endothelial cell adaptation in regeneration. *Science* 362, 1116–1117.
- Guo, D., Murdoch, C.E., Liu, T., Qu, J., Jiao, S., Wang, Y., Wang, W., and Chen, X. (2018). Therapeutic Angiogenesis of Chinese Herbal Medicines in Ischemic Heart Disease: A Review. *Front. Pharmacol.* 9, 428.
- Hida, K., and Maishi, N. (2018). Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression. *Oral Science International* 15, 1–6.
- Hida, K., Maishi, N., Annan, D., and Hida, Y. (2018). Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression. *IJMS* 19, 1272.
- Hollmann, E.K., Bailey, A.K., Potharazu, A.V., Neely, M.D., Bowman, A.B., and Lippmann, E.S. (2017). Accelerated differentiation of human induced pluripotent stem cells to blood–brain barrier endothelial cells. *Fluids Barriers CNS* 14, 9.
- Hong, L., Du, X., Li, W., Mao, Y., Sun, L., and Li, X. (2018). EndMT: A promising and controversial field. *European Journal of Cell Biology* 97, 493–500.
- Huang, H. (2018). Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors* 18, 3249.
- Isaacson, K.J., Martin Jensen, M., Subrahmanyam, N.B., and Ghandehari, H. (2017). Matrix-metalloproteinases as targets for controlled delivery in cancer: An analysis of upregulation and expression. *Journal of Controlled Release* 259, 62–75.
- Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., and Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 31, 177–183.
- Jackson, H.W., Defamie, V., Waterhouse, P., and Khokha, R. (2017). TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nat Rev Cancer* 17, 38–53.
- Kamel, A.A.-E. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr. J. Biotechnol.* 2, 91–95.
- Kapoor, C., Vaidya, S., Wadhwan, V., Hitesh, Kaur, G., and Pathak, A. (2016). Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Can Res Ther* 12, 28.
- Kasprzak, A., and Adamek, A. (2018). Role of Endoglin (CD105) in the Progression of Hepatocellular Carcinoma and Anti-Angiogenic Therapy. *IJMS* 19, 3887.
- Khamisabadi, A., Tahmasbpour, E., Ghanei, M., and Shahriary, A. (2020). Roles of matrix metalloproteinases (MMPs) in SM-induced pathologies. *Toxin Reviews* 39, 24–33.
- King, S.E. (2016). Matrix metalloproteinases: new directions toward inhibition in the fight against cancers. *Future Medicinal Chemistry* 8, 297–309.
- Kumar, A., and Chordia, N. (2015). In Silico PCR Primer Designing and Validation. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 143–151.

Chapitre 5. Bibliographie

- Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 4391–4396.
- Li, K., Tay, F.R., and Yiu, C.K.Y. (2020). The past, present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* 207, 107465.
- Liao, J.K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J. Clin. Invest.* 123, 540–541.
- Mahe, G. (2011). Physiopathologie et évaluation fonctionnelle de la capacité de marche au cours de l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. *Physiopathology and walking capacity assessment in peripheral artery disease.*
- Maishi, N., Annan, D.A., Kikuchi, H., Hida, Y., and Hida, K. (2019). Tumor Endothelial Heterogeneity in Cancer Progression. *Cancers* 11, 1511.
- Martin, J. (2019). Updating PCR. *BioTechniques* 67, 3–5.
- Marx, V. (2016). PCR: the price of infidelity. *Nat Methods* 13, 475–479.
- Masciantonio, M.G., Lee, C.K.S., Arpino, V., Mehta, S., and Gill, S.E. (2017). The Balance Between Metalloproteinases and TIMPs. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 101–131.
- McCarron, J.G., Lee, M.D., and Wilson, C. (2017). The Endothelium Solves Problems That Endothelial Cells Do Not Know Exist. *Trends in Pharmacological Sciences* 38, 322–338.
- Mondal, S., Adhikari, N., Banerjee, S., Amin, S.A., and Jha, T. (2020). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *European Journal of Medicinal Chemistry* 194, 112260.
- Naito, H., Iba, T., and Takakura, N. (2020). Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *International Immunology* dxaa008.
- Niederhuber, J.E. (2019). *Abeloff's clinical oncology* (Philadelphia, PA: Elsevier).
- Park, H.S., Ko, K.H., Kim, J.O., An, H.J., Kim, Y.R., Kim, J.H., Lee, W.S., and Kim, N.K. (2019). Association Study between the Polymorphisms of Matrix Metalloproteinase (MMP) Genes and Idiopathic Recurrent Pregnancy Loss. *Genes* 10, 347.
- Paulus, P., Jennewein, C., and Zacharowski, K. (2011). Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 16, S11–S21.
- Pérez, L., Muñoz-Durango, N., Riedel, C.A., Echeverría, C., Kalergis, A.M., Cabello-Verrugio, C., and Simon, F. (2017). Endothelial-to-mesenchymal transition: Cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 33, 41–54.
- Pries, A.R., and Kuebler, W.M. (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 1–40.
- Puissant, C., Abraham, P., Durand, S., Humeau-Heurtier, A., Faure, S., Rousseau, P., and Mahé, G. (2014). La fonction endothéliale : rôle, méthodes d'évaluation et limites. *Journal des Maladies Vasculaires* 39, 47–56.
- Qian, T., Maguire, S.E., Canfield, S.G., Bao, X., Olson, W.R., Shusta, E.V., and Palecek, S.P. (2017). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells. *Sci. Adv.* 3, e1701679.

- Ram, M., Sherer, Y., and Shoenfeld, Y. (2006). Matrix Metalloproteinase-9 and Autoimmune Diseases. *J Clin Immunol* 26, 299–307.
- Rathouska, J., Nemeckova, I., Zemankova, L., Strasky, Z., Jezkova, K., Varejckova, M., and Nachtigal, P. (2015). Cell adhesion molecules and eNOS expression in aorta of normocholesterolemic mice with different predispositions to atherosclerosis. *Heart Vessels* 30, 241–248.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J.J., and Andrade, M.J. (2015). Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In *PCR Primer Design*, C. Basu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 31–56.
- Rodríguez, D., Morrison, C.J., and Overall, C.M. (2010). Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 39–54.
- Roy, R., Morad, G., Jedinak, A., and Moses, M.A. (2019). Metalloproteinases and their roles in human cancer. *Anat Rec ar.24188*.
- Salvador, B., Arranz, A., Francisco, S., Córdoba, L., Punzón, C., Llamas, M.Á., and Fresno, M. (2016). Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacological Research* 108, 46–56.
- Shimoda, M., and Khokha, R. (2017). Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 1989–2000.
- Siavashi, V., Nassiri, S.M., Rahbarghazi, R., Vafaei, R., and Sariri, R. (2016). ECM-Dependence of Endothelial Progenitor Cell Features: ECM REGULATION OF EPC FEATURES. *J. Cell. Biochem.* 117, 1934–1946.
- Song, S., Zhang, R., Cao, W., Fang, G., Yu, Y., Wan, Y., Wang, C., Li, Y., and Wang, Q. (2019). Foxm1 is a critical driver of TGF- β -induced EndMT in endothelial cells through Smad2/3 and binds to the Snail promoter. *J Cell Physiol* 234, 9052–9064.
- Sturtzel, C. (2017). Endothelial Cells. In *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, S. Sattler, and T. Kennedy-Lydon, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 71–91.
- Sumpio, B.E., Timothy Riley, J., and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 1508–1512.
- Uhel, F., Zafrani, L., and Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Méd. Intensive Réa*.
- Uldry, E., Faes, S., Demartines, N., and Dormond, O. (2017). Fine-Tuning Tumor Endothelial Cells to Selectively Kill Cancer. *IJMS* 18, 1401.
- Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R.P., Hall, M.E., and Lindsey, M.L. (2013). Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)* 28, 391–403.
- Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Ahmad, R., and Kaur, G. (2014). Matrix Metalloproteinases and Cancer - Roles in Threat and Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15, 1085–1091.
- Yang, G., Mahadik, B., Choi, J.Y., and Fisher, J.P. (2020). Vascularization in tissue engineering: fundamentals and state-of-art. *Prog. Biomed. Eng.* 2, 012002.

Chapitre 5. Bibliographie

Yang, J., Yan, J., and Liu, B. (2018). Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Front. Immunol.* 9, 978.

Zhou, H., Wu, Y., Jin, Y., Zhou, J., Zhang, C., Che, L., Jing, J., Chen, Z., Li, W., and Shen, H. (2013). Genetic polymorphism of matrix metalloproteinase family and chronic obstructive pulmonary disease susceptibility: a meta-analysis. *Sci Rep* 3, 2818.

(2008). PCR Primers. In *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*, (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 63–90.

(2017). The role of matrix metalloproteinase in human body pathologies.

Résumé

Introduction : Les cellules endothéliales (CE) forment la paroi interne d'un vaisseau sanguin et fournissent une barrière sélective anticoagulante entre la paroi vasculaire et le sang. Elles participent dans plusieurs processus physiologiques, la réponse immunitaire, la coagulation, et la production de composants de la matrice extracellulaire (ECM). Les métalloprotéinases (MMPs) sont une famille d'enzymes protéolytiques qui jouent un rôle dans la dégradation et le remodelage de l'ECM. Parmi ces enzymes, le membre MMP-9, qui appartient de la sous famille des Gélatinases, est impliqué dans la progression tumorale et facilite la métastase et l'invasion. La conception de bonnes amorces pour le gène *MMP-9* servira à amplifier ce gène en utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), et ceci afin de développer une thérapie anti-cancéreuse.

Objectif : l'objectif de ce travail est de concevoir des amorces du gène *MMP-9* exprimé par les CE au cours du cancer.

Matériel et méthodes : la séquence du gène humain *MMP-9* a été prise à partir de la plateforme Ensembl. Ensuite, l'outil Primer-Blast de la base de données NCBI a été utilisé pour la conception des amorces pour ce gène. Enfin, la paire des amorces choisie et qui répond aux critères de choix de bonnes amorces a été vérifiée par le site *in silico*-PCR.

Résultats : l'outil Primer-Blast nous a permis de donner une dizaine de paires d'amorces et seulement la première paire d'amorces qui répond aux critères d'une meilleure amorce utilisée pour réaliser une PCR. La confirmation de ce résultat par une *in-silico* PCR nous a montré que cette paire se localise au niveau de chromosome 20, ce qui a confirmé la spécificité des amorces du gène *MMP-9* choisies.

Conclusion : La conception de bonnes amorces du gène *MMP-9* exprimé par les CE au cours du cancer permettra de réaliser une PCR. Cela a plusieurs avantages dans les domaines médicaux et biologiques et permet le diagnostic et l'identification de la tumeur et la production de traitements anti-cancéreux.

Mots clés : cancer, cellule endothéliale, amorces, MMP-9, PCR.

Abstract

Introduction: Endothelial cells (EC) form the inner wall of a blood vessel and provide a selective anticoagulant barrier between the vascular wall and blood. They participate in several physiological processes, such as, the immune response, coagulation, and the production of components of the extracellular matrix (ECM). Metalloproteinases (MMPs) are a family of proteolytic enzymes that play a role in the degradation and remodeling of ECM. Among these enzymes, MMP-9 member, which belongs to the subfamily of gelatinase is involved in tumor progression and facilitates metastasis and invasion. The design of good primers for *MMP-9* gene will serve to amplify this gene using polymerase chain reaction (PCR), and in order to develop a cancer therapy.

Objective: The objective of this work is to design primers for *MMP-9* genes expressed by ECs during cancer.

Materials and methods: the sequence of the human *MMP-9* gene was taken from the Ensembl platform. Next, the Primer-Blast tool from the NCBI database was used to design the primers for this gene. Finally, the pair of primers chosen and which meets the criteria for choosing good primers was verified by the *in silico*-PCR site.

Results: the Primer-Blast tool allowed us to yield about ten pairs of primers and only the first pair of primers that meets the criteria for a best primer used to perform PCR. Confirmation of this result by *in-silico* PCR showed us that this pair is localized at chromosome 20, which confirmed the specificity of the *MMP-9* gene primers chosen.

Conclusion: The design of good primers for the *MMP-9* gene expressed by ECs in cancer will allow PCR to be carried out. This has several advantages in the medical and biological fields and allows the diagnosis and identification of the tumor and the production of anti-cancer treatments.

Keywords: cancer, endothelial cell, primers, MMP-9, PCR.

ملخص

مقدمة: تشكل الخلايا البطانية (EC) الجدار الداخلي للأوعية الدموية وتوفر حاجزًا انتقائيًا مضادًا للتخثر بين جدار الوعاء والدم. كما أنها تساهم في العديد من العمليات الفسيولوجية، مثل الاستجابة المناعية، التخثر، وإنتاج مكونات المصفوفة خارج الخلية (ECM). إن البروتينات المعدنية (MMPs) هي مجموعة من الإنزيمات المحللة للبروتين التي تلعب دورًا في تدهور وإعادة تشكيل ECM، من بين هذه الإنزيمات، يشارك العضو *MMP-9*، الذي ينتمي إلى فصيلة الجيلاتيناز الفرعية، في تطور الورم ويسهل الانتبات والغزو. يعمل تصميم البرايمر لجين *MMP-9* على توضيح هذا الجين باستخدام تفاعل سلسلة البوليميراز (PCR)، من أجل تطوير علاج مضاد للسرطان.

الهدف: من هذا العمل هو تصميم برايمر لجينات *MMP-9* التي عبرت عنها EC في السرطان.

المواد والأساليب: تم أخذ تسلسل جين *MMP-9* البشري من منصة Ensembl. بعد ذلك، تم استخدام أداة Primer-Blast من قاعدة بيانات NCBI لتصميم البادئات لهذا الجين. أخيرًا، تم التحقق من زوج البادئات التي تم اختيارها والتي تلبى معايير اختيار البادئات الجيدة من خلال موقع *in silico*-PCR.

النتائج: سمحت لنا أداة Primer-Blast بإنتاج حوالي عشرة أزواج من البادئات فقط أول زوج من البادئات التي استوفت معايير أفضل برايمر يستخدم لأداء PCR. أظهر لنا تأكيد هذه النتيجة من خلال *in silico*-PCR أن هذا الزوج موضعي في الكروموزوم 20، والذي أكد على خصوصية الجينات *MMP-9* المختارة.

الخاتمة: إن تصميم البرايمر لجين *MMP-9* الذي عبرت عنه ECs في السرطان سيسمح بإجراء PCR. هذا له مزايا عديدة في المجالات الطبية والبيولوجية ويسمح بتشخيص الورم والتعرف عليه وإنتاج العلاجات المضادة للسرطان.

الكلمات المفتاحية: سرطان، خلية بطانية، برايمر، ميتالوبروتيناز، PCR.