

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة جيلالي بونعامة
Université de Djilali Bounaama khemis miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de **Biologie**



Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master

En Science Biologique

Spécialité : Physiologie Cellulaire et Physiopathologie

**La mise au point d'un protocole de zymographie pour évaluer
l'activité enzymatique des MMP-2 et -9 au niveau plasmatique et
rénal**

Présenté par :

M^{elle} Bentaiba Karima & ***M^{elle} Sadi Mahammed Fatiha***

Soutenu le 12 juillet 2018, devant le jury composé de :

Présidente : M SAHRAOUI A.

MCB (U.D.B.KM)

Promoteur : M. CHAOUAD B.

MAA (U.D.B.KM)

Examineur : M. BOUSSOUBEL

MAA (U.D.B.KM)

Année universitaire : 2017-2018

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur M. CHAOUAD B. pour d'avoir encadrée durant ces mois de thème, d'avoir dirigé notre travail avec attention et optimisme, d'avoir toujours poussée à dépasser mes limites, nous avons été ravi d'avoir pu travailler à leurs côtés.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, d'avoir acceptées d'évaluer notre travail :

- Merci également au M. SAHRAOUI A. pour avoir accepté de présider notre jury de thème pour leur gentillesse et leur soutien, merci pour accepter d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*
- Un immense merci au M. BOUSSOUBEL A. pour sa patience, pour les explications détaillées, l'aide apportée et pour le soutien, surtout les derniers mois. Merci également d'avoir supporté, en tant que voisin de bureau, toute notre divagation philosophique, merci pour ses très nombreux conseils et ses critiques scientifiques toujours avisées.*

Merci aussi à tous les membres de laboratoire de zoologie et biochimie pour son immense soutien et son extrême gentillesse.

A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je remercie tout d'abord ALLAH tout puissant de m'avoir donné la patience, la santé et la volonté, et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail

Que je dédie à :

Mon très cher père que « dieu » l'accueille dans son vaste paradis

Ma très chère mère pour leur soutien, que « dieu la garde et la protège »

Mes frères et mes sœurs et toute ma famille

Les ingénieurs de laboratoire Aicha, Amine, Faissal, Naima, Nawel et Samira

Mes chères amies Aida, Ahlem, Hayat, Hiba, Nadjat et Sara.

Ma binôme Karima et toutes sa famille

Toute la promotion 2017-2018 et surtout mes collègues de physiologie cellulaire et physiopathologie

Je dis : merci du fond du cœur

Fatiha

Dédicace

Je dédie ce travail à ...

A mes chers parents

Pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A mes chers frères

Pour leur appui et leur encouragement.

A mes chères ami(e)s

Ahlem, Iman B, Iman H, Nadia, Nina, Tiha, Sara.....

Pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

Spécifiquement à ma chère sœur Hafida

Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

Merci d'être toujours là pour moi.

Merci aussi à Samira, Abdellah, Naima, Aicha, Nawal, et tous les membres de laboratoire pour leur soutien.

Karima

Résumé

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont une famille d'endopeptidases Zn^{2+} dépendante et comportent plus de vingt types. Les gélatinases A et B (ou MMP2 et 9) constituent un groupe de MMPs largement étudiés à raison de leur association cohérente avec divers processus physiopathologiques. L'objectif de ce travail, est la mise au point d'un protocole de la technique de zymographie pour déterminer et quantifier l'activité enzymatique de MMP2 et 9 au niveau du plasma et du rein chez la souris de laboratoire en adaptant le protocole de Kupai (2011).

Après plusieurs essais de cette technique en modifiant quelques paramètres (la dilution des échantillons, les constituants de gel, la durée de migration, la durée d'incubation,.....), nous n'avons pu mettre au point de la technique que dans le plasma et le rein.

Nos résultats montrent que les gélatinases A et B sont exprimées à la fois au niveau plasmatique et au niveau rénal. Cependant, la gélatinase B est plus exprimée au niveau du rein que la gélatinase A (61 vs 39%), et au niveau plasmatique, c'est la gélatinase A qui est la plus exprimée (60 vs 40%). Dans ces 2 tissus de la souris, la forme active de la gélatinase A est très fortement exprimée que la forme inactive et dépasse 95%. La forme active de la gélatinase B est également plus exprimée que la forme inactive mais avec un taux beaucoup moins élevé que la gélatinase A (dépasse 67%). Nous avons également, constaté une relation linéaire entre les différentes fractions de MMP-2 et 9 (latentes et actives) et l'activité gélanolytique obtenue en fonction de la dilution.

Mots clés : MMP2 - MMP9 - Zymographie - Plasma - Rein -MEC

Abstract

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of endopeptidases Zn^{2+} dependent and comprise more than twenty types. Gelatinases A and B (or MMP2 and 9) constitute a group of MMPs widely studied because of their consistent association with various physiopathological processes. The objective of this work is the development of a protocol of the zymography technique to determine and quantify the enzymatic activity of MMP2 and 9 at the level of plasma and kidney in laboratory mice by adapting the protocol of Kupai (2011).

After several tests of this technique by modifying some parameters (the dilution of the samples, the gel constituents, the duration of migration, the duration of incubation ...), we have been able to develop the technique only in the plasma and kidney.

Our results show that gelatinases A and B are expressed both at the plasma level and at the renal level. However, gelatinase B is more expressed in the kidney than gelatinase A (61 vs 39%), and at the plasma level, gelatinase A is the most expressed (60 vs 40%). In these 2 tissues of the mouse, the active form of gelatinase A is very strongly expressed as the inactive form and exceeds 95%. The active form of gelatinase B is also more expressed than the inactive form but with a much lower level than gelatinase A (exceeds 67%). We also found a linear relationship between the different fractions of MMP-2 and 9 (latent and active) and the gelolytic activity obtained as a function of dilution.

Key words: MMP2 - MMP9 - Zymography - Plasma - Kidney -ECM

ملخص

الإنزيمات الهاضمة لبروتينات النسيج البيني الضام هي عائلة تعتمد علي وجود الزنك لهضم البروتينات، تضم أكثر من عشرين نوع، الجيلاتيناز أ و الجيلاتيناز ب (او انزيم هاضم 9 و انزيم هاضم2) هي مجموعة تمت دراستها على نطاق واسع بسبب ارتباطها المتسق مع مختلف العمليات الفيزيولوجية و المرضية.

الهدف من هذا العمل هو تطوير بروتوكول تقنية الهجرة الكهربائية لتحديد و قياس النشاط الانزيمي للإنزيم الهاضم 9 و الانزيم الهاضم 2 في البلازما و الكلى على فئران التجارب المخبرية بواسطة بروتوكول العالم كوبي (2011).

بعد عدة اختبارات لهذه التقنية بتعديل بعض المعاملات (تمديد العينات، مكونات الهلام، مدة الهجرة الكهربائية، مدة الحضارة.....) تمكنا من تطوير التقنية فقط في البلازما و الكلى.

تظهر نتائجنا أن كل من الجيلاتيناز أ و الجيلاتيناز ب يتم التعبير عنها على مستوى البلازما و الكلى، بحيث تكون الجيلاتيناز ب الأكثر ظهورا عن الجيلاتيناز أ في الكلى (61 مقابل 39%) و على مستوى البلازما تكون الجيلاتيناز أ هي الأكثر ظهورا (60 مقابل 40%)، في هذين النسيجين الشكل النشط للجيلاتيناز أ هو الأقوى ظهورا عن الشكل المثبط بنسبة تفوق 95%، الشكل النشط للجيلاتيناز ب يكون أيضا أكثر ظهورا عن الشكل المثبط لكن بنسبة أقل من الجيلاتيناز أ (تفوق 67%)، استنتجنا أيضا ان هنالك علاقة خطية بين مختلف الاشكال للإنزيمات الهاضمة 2 و الإنزيمات الهاضمة 9 (الشكل النشط و المثبط) و أيضا النشاط الانزيمي بدلالة التمديد.

الكلمات المفتاحية: : انزيم هاضم 2- انزيم هاضم 9- الهجرة الكهربائية- بلازما- كلى- النسيج البيني الضام.

Sommaire

Résumé	
Sommaire	
Abréviations	
Introduction	01
Revue bibliographique	02
I. Généralité sur les métalloprotéinases matricielles	03
I.1. Famille des gélatinases	04
I.2. Activité et rôle biologique des gélatinases	04
I.3. Structure en domaine	05
I.3.1. Peptide signalé	06
I.3.2. Prodomaine	06
I.3.3. Domaine catalytique	06
I.3.4. Charnière	08
I.3.5. Domaine hémopexine C-terminale	08
I.4. Gènes des gélatinases	09
I.4.1. Gène de gélatinase A	09
I.4.2. Gène de gélatinase B	09
I.5. Système de régulation des gélatinases	10
I.5.1. Régulation de la gélatinase A	10
I.5.2. Régulation de gélatinase B	12
II. Physiopathologie des gélatinases	14
II.1. Gélatinases et cancer	15
II.2. Gélatinases et maladies cardiovasculaires	15
II.3. Gélatinases et autre pathologie	16
III. Méthodes d'études et de détection des gélatinases	16
III.1. Zymographie de gélatine	16
III.2. Western blot	17
III.3. ELISA	17
Matériels et méthodes	18
I. Matériels	19
I.1. Matériel biologique	19
I.2. Matériels non biologiques	20

II. Méthodes	20
II.1. Préparation des solutions	20
II.2. Préparations des échantillons	21
II.2.1. Prise de sang	21
II.2.2. Dissection et prélèvement des organes	21
II.2.3. Extraction des protéines	22
II.3. Préparation de la cuve d'électrophorèse	23
II.3.1. Coulage des plaques	23
II.3.2. Préparation de gel	24
II.3.2.1. Gel de la séparation	24
II.3.2.2. Gel de concentration	24
II.4. Migration électrophorétique	25
II.5. Développement de gel	26
II.5.1. Lavage	26
II.5.2. Incubation	26
II.5.3. Coloration et décoloration de gel	26
II.6. Analyse de gel et quantification des bandes	27
Résultats et discussion	28
I. Résultats	29
I.1. Au niveau rénal	30
I.1.1. La MMP-9	30
I.1.2. La MMP-2	32
I.2. Au niveau plasmatique	35
I.2.1. Gélatinase B	35
I.2.2. Gélatinase A	38
I.3. Comparaison des gélatinases A et B au niveau du plasma et rein	40
II. Discussion	41
Conclusion et perspectives	45
Références bibliographiques	
Index	
Annexe	

Abréviations

AP-1: Activator protein-1
AP-2: Activator protein- 2
b-FGF: basic fibroblast growth factor
CaCl₂ : Chlorure de calcium
CD-44 : Clusters de différenciation-44
CD-91: Clusters de différenciation -91
C / EBP : CAAT/enhancer binding protein
Cys : Cystéine
C : Cytosine
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
E-26 : Facteur de transcription 26
EGF: epidermal growth factor
ELISA: Enzyme-linked immuno-sorbent
ETS-1: Avian erythroblastosis virus E26 homolog-1
HCL: Acide chlorhydrique
His: Histidine
IL-8: Interleukin -8
GC: Guanine cytosine
Glu: Glutamate
Gly: Glycine
LDL: Low density lipoprotein
LRP-1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1
MCP3: Monocyte chemotactic protein-3
MEC : Matrice extracellulaire
MMPs : Métalloprotéinases matricielles
MMP-2 : Métalloprotéinase matricielle de type 2
MMP-9: Métalloprotéinase matricielle de type 9
MMP-14 : Métalloprotéinase matricielle de type14
NaCl : Chlorure de sodium
NaN₃ : Azoture de sodium
NaOH : Hydroxyde de sodium
NF-kB: Nuclear factor-kappa B
NGF: Nerve growth factor
O: Oxygène

OG: O-glycosylé

PDGF: Platelet-derived growth factor

PEA-3: Polyomavirus enhancer A-binding protein-3

P53: Protéine 53

Pro-IL-1 β : Pro-interleukine-1

Pro-IL-8: Pro-interleukine -8

Pro-TGF β : Pro-Transforming growth factor beta

Pro-TNF α : Pro- Tumor necrosis factor alpha

SAF-1: Serum amyloid A-activating factor-1

SDS: Sodium dodecyl sulphate

SP1: Specificity protein 1

T: Tyrosine

TATA: Tyrosine adenosine tyrosine adenosine

TEMED: Tetra-methylethylenediamine

TIMPs: Tissue inhibitor of metalloproteinases

TIMP-1: 1 Tissue inhibitor of metalloproteinases 1

TIMP-2: Tissue inhibitor of metalloproteinases 2

TGF- β 1: Transforming growth factor beta

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

UPA: Urokinase type plasminogen activator

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Introduction

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont une famille d'endopeptidases Zn^{2+} dépendante qui régulent la dégradation et le remodelage de la MEC (Galasso et al., 2012). Les MMPs sont impliquées dans divers processus physiologique et pathologique des tissus, y compris le développement des organes, la cicatrisation des plaies, l'inflammation et le cancer (Mittal et al., 2014).

Plus de vingt MMPs ont été identifiées et sont divisées en six groupes en fonction de leur structure et leur spécificité au substrat (Hu et Beeton 2010). Le groupe des gélatinases comprenant la gélatinase A ou MMP-2 de 72 kDa et la gélatinase B ou MMP-9 de 92 kDa (Ricci et al., 2015) sont largement étudiés à raison de leur association cohérente avec un certain nombre de processus physiologiques et pathologiques (Chhabra et Rani 2018). La MMP-2 et la MMP-9 sont classées selon la spécificité du substrat à la gélatine (Murphy et Nagase, 2008). Contrairement aux autres MMP, les MMP-2 et MMP-9, contiennent trois répétitions de type fibronectine-II dans leur région catalytique leurs conférant une grande capacité de dégrader la gélatine (Malla et al., 2008).

Plusieurs techniques, telles la technique d'ELISA, de Western blot, d'immunohistochimie et de la RT-PCR, permettent de détecter et de quantifier la concentration et/ou l'activité de ces protéases dans divers tissus et organes. Ces techniques sont difficile à réalisées et nécessitent la disponibilité des produits et/ou des instruments très couteux comme les anticorps, le lecteur ELISA, le thermocycleur.....

Une autre technique beaucoup moins couteuse et qui permet de détecter et de quantifier l'activité enzymatique de la MMP2 et 9 est la zymographie en gélatine qui utilise une approche électrophorétique à base du gel de polyacrylamide. C'est une technique très sensible et fiable qui intègre la capacité de ses enzymes à dégrader leurs substrat, la gélatine (Frankowski et al., 2012). Plusieurs protocoles de cette technique sont décrits dans la bibliographie et une très grande hétérogénéité a été constatée en ce qui concerne certains produits utilisés, la durée de migration, d'incubation et de traitements, le réglage du PH et de voltage.....

L'objectif de ce travail, est la mise au point d'un protocole de la technique de zymographie sur le plasma et le rein chez la souris de laboratoire et d'adapter le protocole de Kupai (2011), réalisé principalement sur le cœur, sur nos échantillons en modifiant plusieurs paramètres (la dilution des échantillons, les constituants de gel, la durée de migration, la durée d'incubation,.....).

Revue bibliographique

I. Généralité sur les métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont des enzymes appartenant à la famille des endopeptidases zinc dépendantes (Bencsik et al., 2017). D’au moins 26 protéases identifiés, dont 23 chez l’homme, agissent comme des acteurs clés dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et dans diverses conditions physiologiques et pathologique (Jaiswal et al., 2011).

Les MMPs ont été décrites pour la première fois par Gross et Lapiere en 1962 chez le têtard au cours de métamorphose (Gialeli et al., 2011). Ces enzymes répondent aux critères suivants :

- Un atome de zinc dans le domaine catalytique de l'enzyme.
- Une activité dépendant de la disponibilité du milieu en ions Ca^{2+} .
- Une synthèse et une sécrétion sous forme de zymogènes inactifs latents (pro-MMP).
- Une capacité à dégrader les composants de la matrice extracellulaire à PH physiologique (Giral et al., 2003).

Les MMPs sont groupés en plusieurs familles et cela selon leur spécificité au substrat (Figure 01).

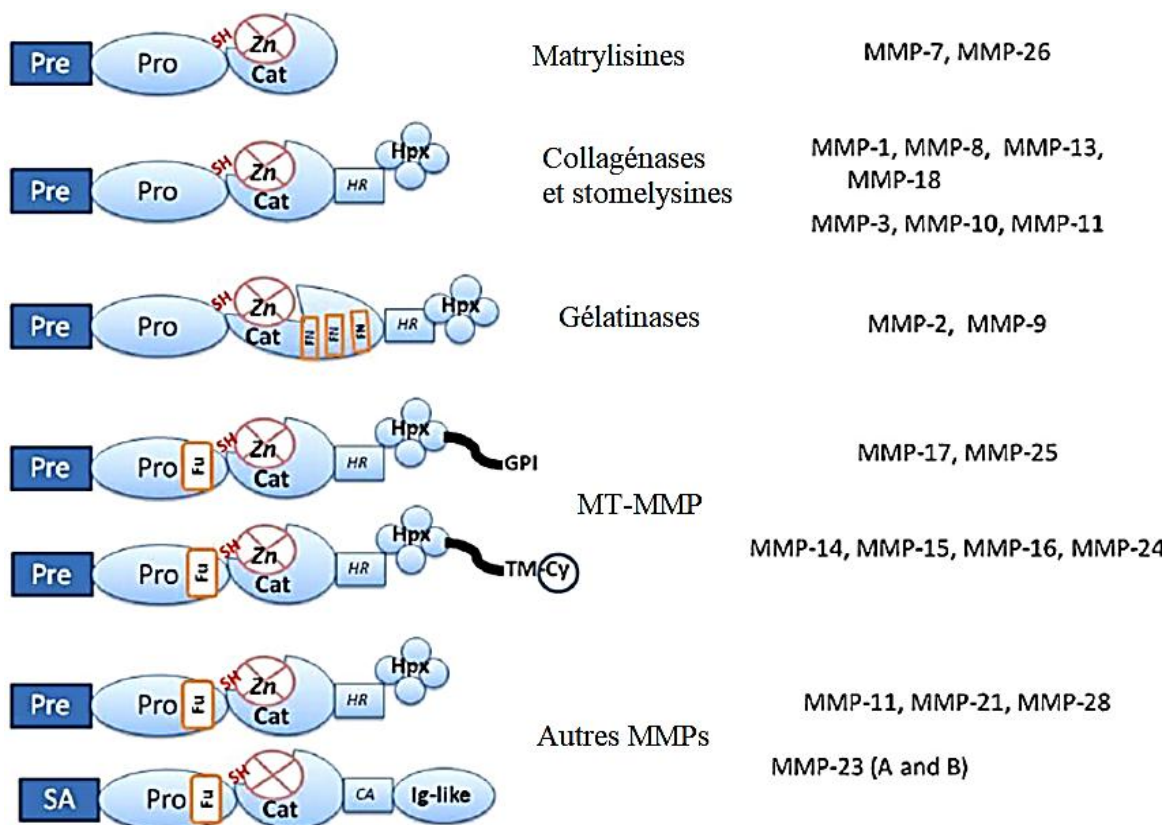


Figure 01 : Classification des MMPs (Mannello et Medda, 2012).

Les MMPs jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, y compris l'embryogenèse, angiogenèse, la cicatrisation et l'involution de l'utérus post-partum (Bencsik et al., 2017). En revanche, l'activité des MMPs en excès est corrélée avec diverses maladies, comme la tumeur, l'arthrite, les maladies parodontales, la cirrhose du foie, l'athérosclérose et la sclérose en plaques (Vihinen et al., 2005).

L'activité des MMPs est strictement réglementée par l'expression de gènes, l'activation de la pro-enzyme et l'inhibition de l'enzyme par des inhibiteurs endogènes, tel que les inhibiteurs tissulaires des MMPs : TIMPs (Franco et al., 2017).

I.1. Famille des gélatinases

Les gélatinases, MMP-2 et MMP-9, sont deux membres de la famille des MMPs qui ont été largement étudiés par suite de leur association cohérente avec un certain nombre de processus physiologiques et pathologiques (Chhabra et Vibha, 2018).

Les MMP-2 et MMP-9 sont classifiés selon la spécificité du substrat à la gélatine (Murphy et Nagase, 2008). Une des caractéristique structurelle de ces gélatinases est la présence, au sein du domaine catalytique, de trois séquences peptidiques répétitives analogues aux motifs de la fibronectine de type II. Ces dernières permettent la liaison à la gélatine (DeClerck, 2000).

Les gélatinases sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs, la pro-MMP-2 de 72 kDa, et la pro-MMP-9 de 92 kDa. Avec le clivage d'un prodomaine produisant la forme active (MMP-2 de 65 kDa et MMP-9 de 82 kDa) (Bauvois, 2012).

I.2. Activité et rôle biologique des gélatinases

Concernant la fonction biologique, les gélatinases dégradent un large spectre de molécules de la MEC comme des types de collagène IV, V, VII, X, IX, l'élastine, gélatine, fibronectine, agrécan, vitronectin et laminin (Overall, 2002), mais aussi beaucoup de molécules non-MEC incluant pro-TNF- α , (Miriam et al., 2010), pro-TGF- β (Yu et Stamenkovic, 2000), pro-IL-1 β , pro-IL-8 et la MCP-3 (Mcquibban et al., 2002).

La MMP-9 en coordination avec d'autres MMPs joue un rôle dans les remodelages tissulaires normaux tels que croissance neuronale, développement embryonnaire,

angiogénèse, ovulation, cicatrisation des plaies, formation osseuse ostéoblastique (Rangaswami et al., 2004).

Pour la fonction de la MMP-2, des recherches récentes ont démontré que la forme active complètement mature induit l'apoptose dans les cellules endothéliales et inhibe la néovascularisation, tandis qu'une forme activée intermédiaire dans le complexe avec MMP-14 améliore la survie cellulaire et favorise l'angiogénèse (Shapiro et al., 2010).

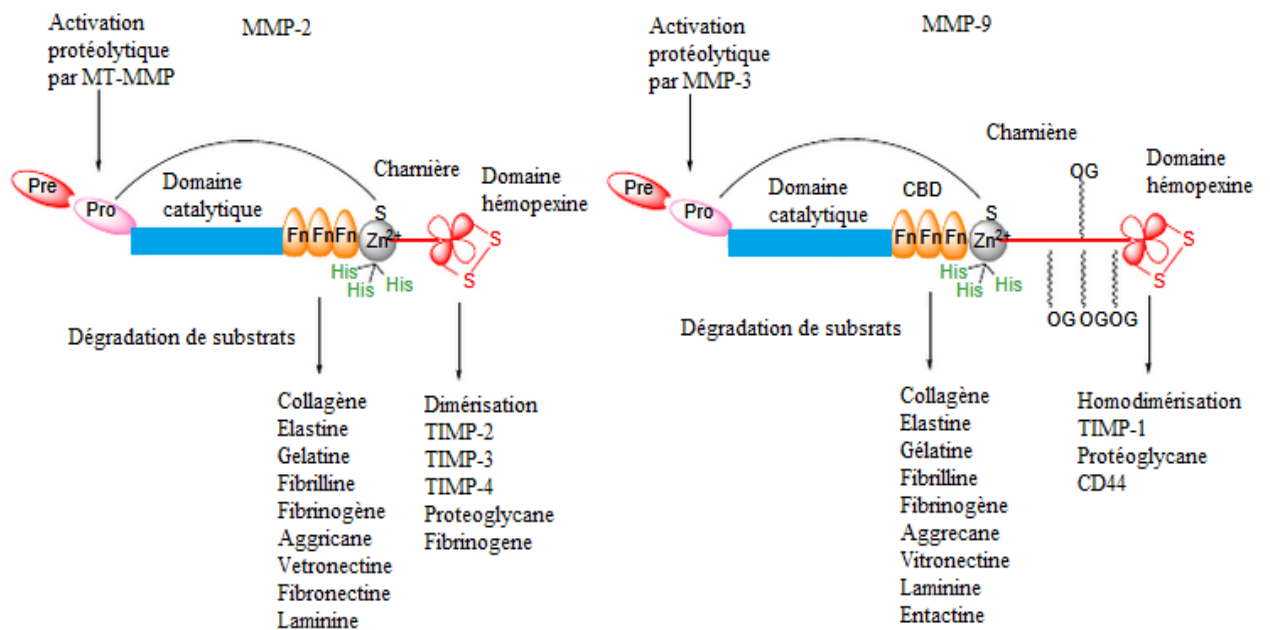


Figure 02 : Différents fonctions des gélatinases (Bourguet et al., 2012)..

I.3. Structure en domaine

La famille partage des composants fonctionnels et structuraux spécifiques, dont un peptide signal, un domaine pro-peptide, un domaine catalytique avec un site de liaison au zinc hautement conservé et un domaine C-terminal hémopexine qui est lié au domaine catalytique via une région de charnière flexible (Kessenbrock et al., 2010).

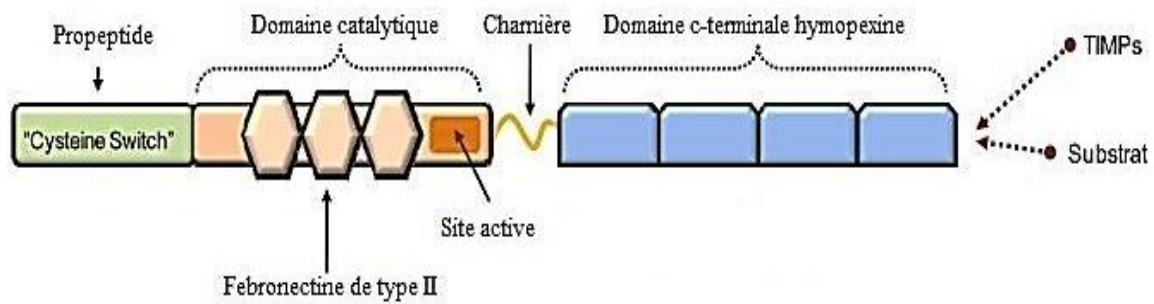


Figure 03 : Structure des gélatinases (Mccarty et al., 2012)

I.3.1. Peptide signale

Les gélatinases sont composées d'un peptide signal hydrophobe (Kessenbrock et al., 2010). Contient d'environ 19 acide aminés (Elkins et al., 2002), trouvé dans la partie N-terminal de la protéine, nécessaire pour leurs sécrétion (Frankowski et al., 2012) et leurs adressage vers le réticulum endoplasmique (Ricci et al., 2016).

I.3.2. Prodomaine

La structure du pro-domaine est commune pour MMP-2 et MMP-9 (Visse et Nagase, 2003). Ce domaine, composé d'environ 80 résidus, s'étend de l'extrémité N-terminale à l'extrémité de domaine catalytique (Ricci et al., 2016).

Il se compose de trois hélices α et des boucles de connexion (Visse et Nagase, 2003). Une région peptidique, étendue après l'hélice 3, contenant le résidu cystéine du « cystein switch » portée par la séquence Pro-Arg-Cys-Xxx-Xxx-Pro-Asp (Tocchi et Parks, 2013). Le cystéine forme un quatrième ligand du zinc du site actif, maintenant le zymogène inactif (Visse et Nagase, 2003).

I.3.3. Domaine catalytique

Le domaine catalytique est composé d'une chaîne polypeptidique d'environ 170 acides aminés (Bode et al., 1999). Elle est responsable de l'activité enzymatique (Rannou et al., 2005). La chaîne se compose d'une feuille β plissée à 5 brins ($\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5$), de trois hélices α ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$) et de boucles de connexion (Visse et Nagase, 2003).

Les gélatinases diffèrent des autres MMPs par la présence au niveau de ce domaine de trois répétitions homologues au module de type II de la fibronectine (Yabluchanskiy et al., 2013). Elles sont localisées dans la boucle entre la feuille β_5 et l'hélice α_1 , constituent de deux

feuillet β antiparallèles reliés à une courte hélice α et stabilisés par deux liaisons disulfures (Nagase et al., 2006). Chaque module de fibronectine de type II contient 58 acides aminés (Yabluchanskiy et al., 2013).

Les répétitions de fibronectine de type II contiennent chacune quatre résidus Cys, dont le premier forme un pont disulfure avec le troisième Cys et le second avec le quatrième Cys. Ses répétitions ont été trouvés pour former une poche hydrophobe, qui probablement explique la liaison à la gélatine (Steen et al., 2002).

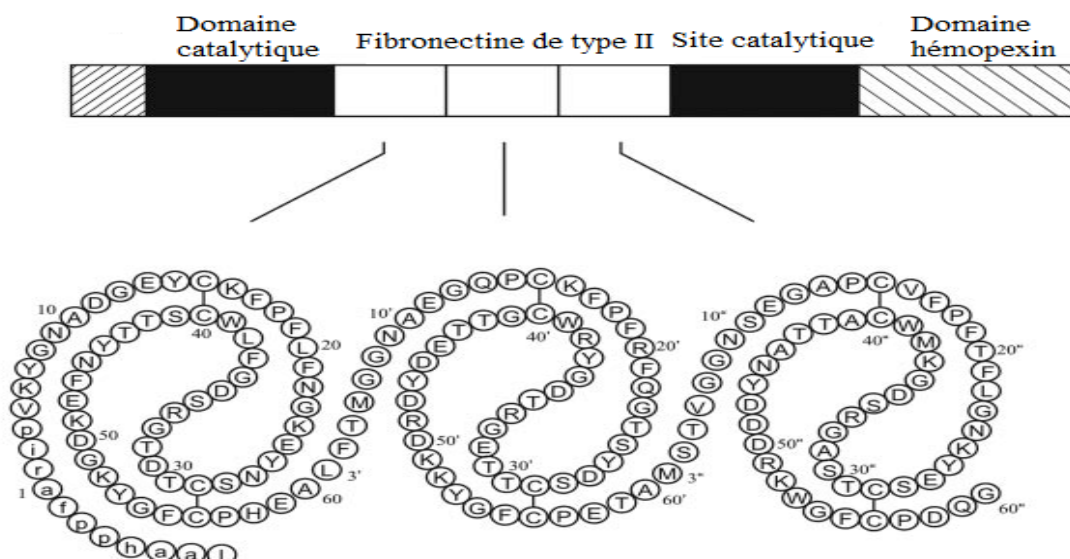


Figure 04 : Structure de fibronectine de type II de MMP-2 (Gehrmann et al, 2004).

Le domaine protéinase contient un zinc catalytique, un zinc structural et, généralement, trois ions calcium (Visse et Nagase, 2003).

L'ion zinc catalytique, trouvée au fond d'une structure peptidique tridimensionnelle en forme de poche, est coordonnée par les atomes N des trois histidines (Gomiz-Rüth, 2009), qui conservées dans le séquence His-Glu-Xxx-Gly- His-Xxx-Xxx-Gly-Xxx-Xxx-His (Dorman et al., 2010). Lors de l'activité enzymatique, un résidu de glutamate, trouvé dans le motif catalytique, joue un rôle base/acide (Ra et Parks, 2007).

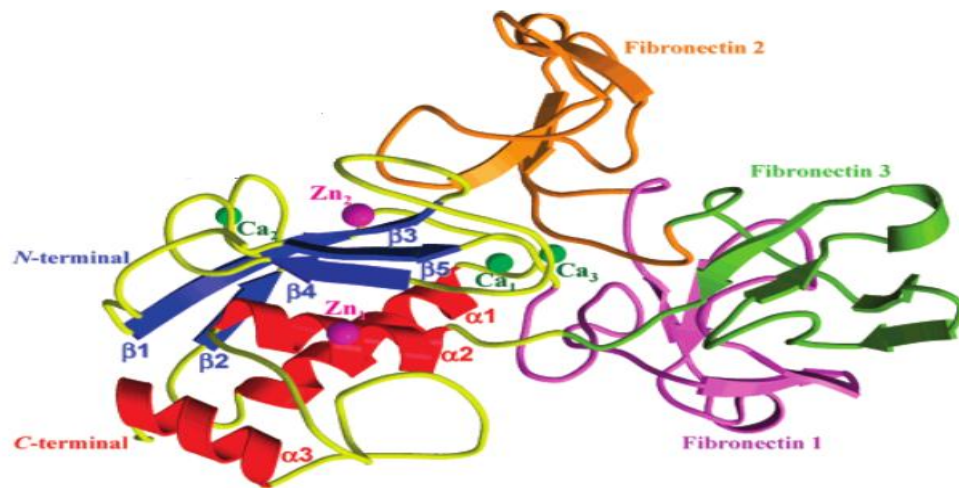


Figure 05 : Structure de domaine catalytique de MMP-2 (Diaz et Suarez, 2007).

Le domaine catalytique est le principal domaine impliqué dans la reconnaissance de substrats (Gioia et al., 2007).

I.3.4 Charnière

Les gélatinases comprennent une séquence de liaison unique qui relie le site actif au domaine de l'hémopexine (Vandooren et al., 2013). Elle représente un lien flexible de 64 acides aminés (Van Den Steen et al., 2006). Elle est riche en résidus proline, sérine et thréonine (Vandooren et al., 2013).

I.3.5. Domaine hémopexine C-terminale

Le domaine hémopexine contient 196 acides aminés (Van Den Steen et al., 2006). Il possède une structure ressemblant à une hélice à 4 pales, dont chacune est formée d'un feuillet β à quatre brins antiparallèles et d'une hélice α (Nagase et al. 2006, Klein et Bischoff 2011). Le centre de l'hélice contient généralement un ion calcium et un chlorure (Murphy et Nagase, 2008).

L'ions Ca^{2+} central de la MMP-2 sont structurellement importants, dont leur chélation élimine les interactions entre l'héparine et la fibronectine (Overall, 2002). Ce domaine est lié aux inhibiteurs tissulaires endogènes des MMPs (TIMPs) et de certains substrats MMPs et intervient dans l'activation des MMPs (Kessenbrock et al., 2010).

Le domaine hémopexine de MMP- 9 contient un site de liaison pour la protéine-1 associée au récepteur de la lipoprotéine de basse densité ou LRP-1 (Van Den Steen et al., 2006), CD-

91 ou différentes formes isomères de CD-44, protéine Ku (Malla et al., 2008; Monferran et al., 2004).

La MMP-9 diffère de la MMP-2 par une séquence de liaison unique de fonction inconnue reliant le site actif et le domaine de l'hémopexine, avec une longueur de plus de 50 acides aminés (Van Den Steen et al., 2006). Cette séquence contient 11 répétitions de motif T / SXXP, qui empêchent la dimérisation de l'enzyme à l'intérieur de la cellule (Van den Steen et al., 2001). Ses derniers forment des sites de fixation pour des multiples glycanes liés à O qui servent à prolonger le domaine de cette protéine dans une structure de "bouteille-brosse" (Van Den Steen et al., 2002).

Le domaine OG est nécessaire pour orienter correctement le domaine de l'hémopexine pour l'inhibition par TIMP-1 (Van Den Steen et al., 2006).

I.4. Gènes des gélatinases

Les métalloprotéinases matricielles sont une grande famille de protéines chez les vertébrés, comprenant plus de 24 gènes chez l'homme (Harrison et al., 2004). Les différentes MMPs ont une structure génomique similaire, ce qui suggère que leurs gènes proviennent d'un gène ancestral commun (Zinzindohoué et al., 2005).

I.4.1. Gène de gélatinase A

Le gène MMP-2 est cartographié dans la région du chromosome 16q21 chez l'homme, il se compose de 13 exons et de 12 introns (Zhang et Chen, 2017).

Le polymorphisme de MMP-2 est porté sur une substitution de thymine (T) en cytosine (C) en position -1306 « C>T » (Price et al., 2001). L'allèle -1306C augmente l'affinité du site de fixation pour le facteur de transcription Sp1, ainsi que sa présence augmente le niveau transcriptionnel du gène (Zinzindohoué et al., 2005).

I.4.2. Gène de gélatinase B

La gélatinase B occupe un site unique sur le chromosome 20 humain, sous-bande q12-q13 (Jean et al., 1995). Par contre, chez les souris le gène de MMP-9 se localise sur le chromosome 2 (Leco et al., 1997).

La MMP-9 comprend deux polymorphismes, portés sur une substitution -1562 C>T et une duplication du motif -90 « CA » (Nelissen et al., 2000; Zhang et al., 1999). Le promoteur qui

porte -1562T a une affinité inférieure pour les protéines histones et est associé à une augmentation de l'activité transcriptionnel (Zinzindohoué et al., 2005).

I.5. Système de régulation des gélatinases

Il existe plusieurs façons de réguler l'activité des gélatinases, y compris l'expression génique, la compartimentalisation, l'activation du zymogène, l'inactivation enzymatique par des inhibiteurs extracellulaires et le catabolisme (Fanjul et al., 2010)..

I.5.1 Régulation de la gélatinase A

MMP-2 est soumise à trois niveaux de régulation, y compris l'induction transcriptionnelle, l'activation de la proenzyme, la liaison et l'inhibition par les TIMP (Docherty et al., 1992).

L'expression de MMP-2 peut être induite par le TGF- β 1 (Brown et al., 1990), l'IL-8 (Singh et al., 1995), la concanavaleine A (Yu et al., 1995) et par l'exposition à court terme aux interférons alpha et gamma (Hujanen et al., 1994). La stimulation par ses acteurs induit l'activation des facteurs de transcriptions localisés dans le promoteur de gène de MMP-2 agissant en cis, y compris AP-2 et Sp1 (Qin et al., 1999).



Figure 06 : facteurs de transcription localisés au sein de promoteur de gène de MMP-2 (schéma modifié) d'après (Turner et Porter, 2012).

La MMP-2 ne possède pas de boîte TATA, AP-1 et PEA-3 (Benbow et Brinckerhoff, 1997). Par conséquent, l'initiation de la transcription peut être débutée à des multiples endroits. De plus, l'expression de la MMP-2 est majoritairement gouvernée par des facteurs de transcription ubiquitaires de la famille Sp-1 se fixant à une boîte GC proximale. Pour cette raison, l'expression de ce MMP est souvent constitutive (Yan et Boyd, 2006).

La MMP2 ne subit pas une étape de glycosylation, ceci explique que ce protéine est non glycosylée, cette enzyme est strictement présente comme un monomère dans le plasma (Ricci et al., 2016).

La MMP-2 est exprimée initialement dans un état enzymatique inactif (Kessenbrock et al., 2010). Elle est sécrétée par plusieurs cellules, en particulier les fibroblastes, les kératinocytes,

les chondrocytes, les cellules endothéliales, les monocytes et les ostéoblastes (Beaudeau et al., 2004), les cardiomyocytes, les cellules musculaires lisses vasculaires, et les macrophages (Lindsey et al., 2005). La pro-MMP-2 (72 kDa) est activée en formant un complexe avec inhibiteur tissulaire de métalloprotéase de type 2 (TIMP-2), qui est à son tour un substrat pour la MMP membranaire de type 1 (MMP-14), ce dernier élimine le pro-domaine et donnant l'enzyme active tronquée de 64 kDa (Deryugina et al., 2001).

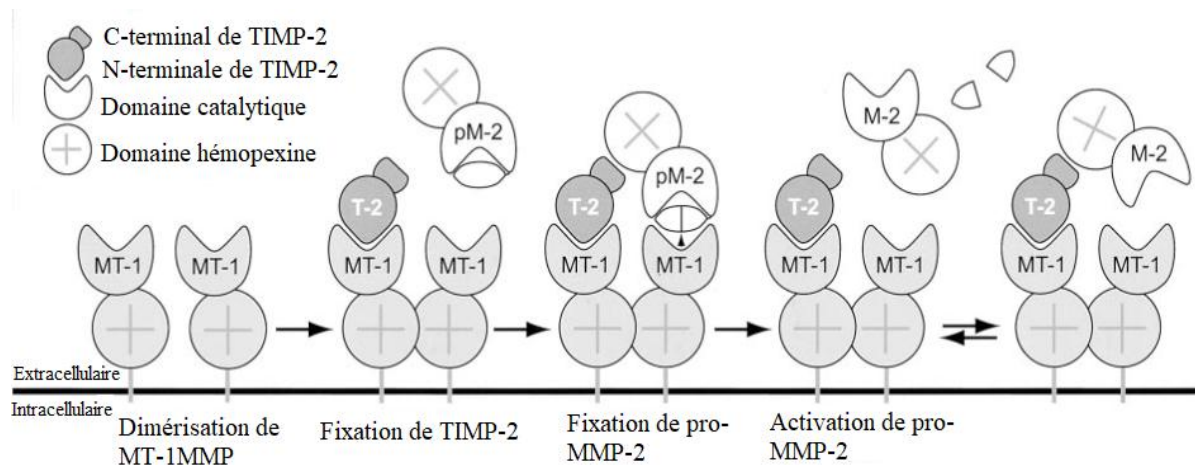


Figure 07 : Mode d'activation de MMP-2 par la MT-MMP de type I et de TIMP-2 d'après (Visse et Nagase, 2003).

En plus de cette voie d'activation, le pro-MMP-2 peut également être activé par la thrombine, la protéine C activée (Nguyen, 2000). De plus l'interaction de pro-MMP-2 avec de faibles concentrations de collagène $\alpha 2$ de type VI induit son auto-activation (Freise et al., 2009).

Normalement, la MMP-2 est spécifiquement inhibée par TIMP-2 et l'équilibre MMP-2 / TIMP-2 est considéré comme un facteur majeur dans la régulation de l'activité de cet enzyme (Ricci et al., 2016).

Deux mécanismes ont été rapportés d'interagir, d'endocyter et d'induire la dégradation de la MMP-2 par LRP1, un membre de la superfamille des récepteurs LDL (Hahn-Dantona et al., 2001). L'une de ses mécanismes implique la liaison de la pro-MMP-2 avec son inhibiteur le TIMP-2 (Emonard et al., 2005), l'autre, l'intervention d'une molécule de la matrice extracellulaire, la thrombospondine 2 (Yang et al., 2001). Ces complexes lient de manière réversible aux LRP1 (Hahn-Dantona et al., 2001).

I.5.2 Régulation de gélatinase B

L'activité de la gélatinase B peut être régulée à plusieurs niveaux : au niveau de la transcription génique, de la glycosylation, de la sécrétion, de l'activation, et au niveau de l'inhibition et du catabolisme (Van Den Steen et al., 2002) :

Au niveau transcriptionnel, l'expression génétique de MMP-9 implique l'intervention de plusieurs cytokines et facteurs de croissance telle que les interleukines, interféron, EGF, NGF, b-FGF, VEGF, PDGF, TNF- α , TGF- β et également l'ostéopontine (Ricci et al., 2016). Ces signaux environnementaux via la transduction du signal, stimulent des facteurs de transcription, agissant en cis au sein de promoteur du gène de MMP-9 (Benbow et Brinckerhoff, 1997). Ceux-ci comprennent deux sites de reconnaissance pour AP-1, de multiples éléments PEA3 (Sato et Seiki, 1993). E-26 (Ets), PEA3, SAF -1 (Yabluchanskiy et al., 2013). D'autres sites incluent ceux pour Sp-1 et NF- κ B (Crowe et Brown, 1999). Cette enzyme possède une boîte TATA et une boîte GC (Van Den Steen et al., 2002).

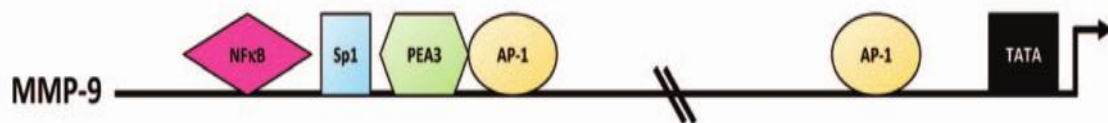


Figure 08 : facteur de transcription localisé au sien de promoteur de gène de MMP-9 (schéma modifié) d'après (Turner et Porter, 2012).

Un autre système de régulation de l'activité de la MMP-9 est la glycosylation (Van den Steen et al., 2001). Il soumis à une N- glycosylation dans le pro-domaine et le domaine catalytique et un certain nombre de glycanes liés à O (Ricci et al., 2016b). Ce domaine O-glycosylé participe en outre à la dimérisation de la MMP-9 et régule le trafic des compartiments intracellulaires et de la sécrétion (Van Den Steen et al., 2006).

La MMP-9 est sécrété sous forme de précurseur inactif nommé pro-MMP-9 par nombreuses types cellulaires, les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les neutrophiles, les macrophages et les fibroblastes (Yabluchanskiy et al., 2013)

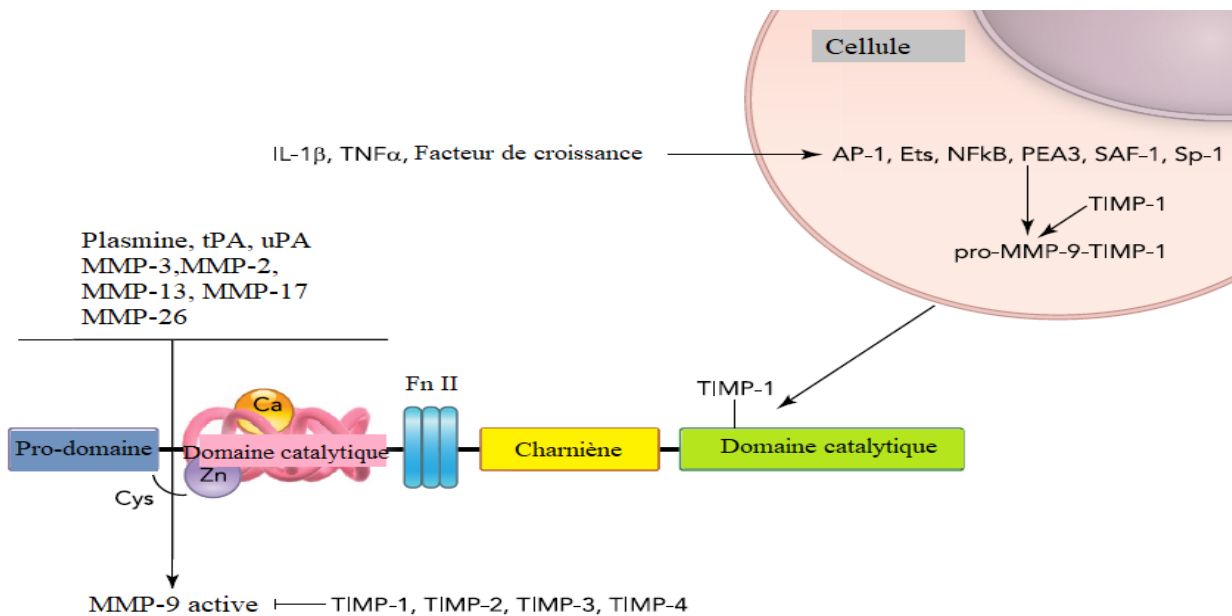


Figure 09 : Régulation d'expression de MMP-9 (Yabluchanskiy et al., 2013).

La MMP-9 est exprimée comme pro-enzyme de 92-kDa, qui peut être activé à l'enzyme mûre 83-kDa (Klein et Bischoff, 2011). MMP-9 existe physiologiquement comme un monomère, dimère ou associé à la protéine de transport lipocalin (Van Den Steen et al., 2002).

L'activation de MMP-9 est médiée par l'élimination du pro-domaine par des sérine protéases ou d'autres MMPs, en particulier la MMP-3 (Johnson et al., 2011), la plasmine, la trypsine-2, la MMP-2, la MMP-13 (Björklund et Koivunen, 2005; Fridman et al., 2003), ou peut être une réponse directe au stress oxydatif qui perturbe le changement de cystéine (Maeda et al., 1998).

D'autres mécanismes d'activation ont été suggérés pour expliquer l'activité catalytique de pro-MMP-9 dont, la liaison de pro-MMP-9 à une surface revêtue de collagène de type gélatine ou IV pourrait conduire à une activation réversible de la MMP-9 par désengagement du pro-peptide du site actif (Bannikov et al., 2002).

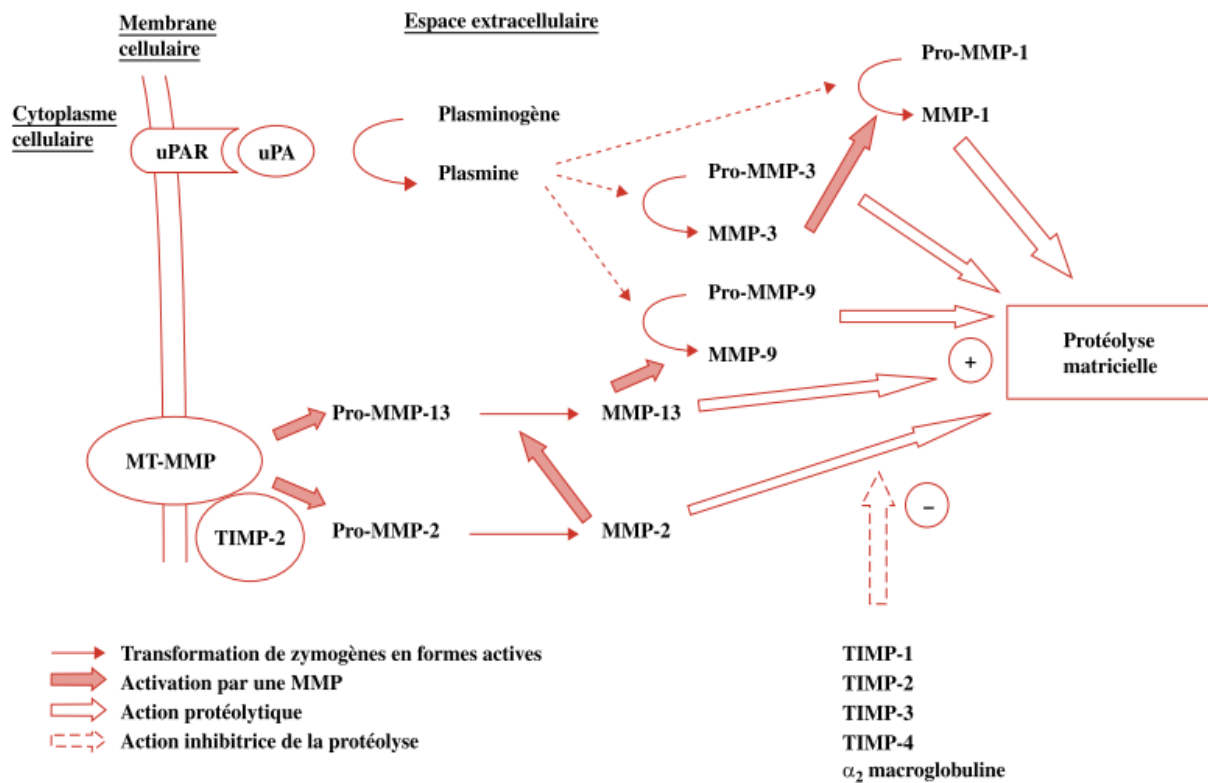


Figure 10 : Mécanismes d'activation des MMP conduisant à la protéolyse de la matrice extracellulaire, d'après (Beaudeau et al., 2004).

Une fois la gélatinase B sécrétée et activée, son activité peut encore être régulée par dégradation ou inhibition. La gélatinase B est inhibée par l' α_2 -macroglobuline, l'inhibiteur de protéase universel présent dans le sérum humain (Birkedal-Hansen et al., 1993). De plus, la MMP-9 a une affinité pour l'inhibiteur tissulaires TIMP-1, TIMP-2 et la TIMP-3 (Van Den Steen et al., 2002).

Comme la MMP-2, le catabolisme de MMP-9 régulé par le LRP1, l'endocytose de la MMP-9 semble quant à elle être précédée par l'association de la protéase avec son inhibiteur le TIMP1, ou par une protéine associée au récepteur de 39 kDa (RAP) qui sont liés à leur tour à LRP (Hahn-Dantona et al., 2001).

II. Physiopathologie des gélatinases

Le renouvellement de la MEC résulte de la mise en place d'un équilibre entre l'activité des MMPs et celles des TIMPs. Le déséquilibre de cette balance semble être impliqué dans des pathologies associées à un renouvellement non contrôlé de la MEC (Khoury et al., 2006)

II.1. Gélatinases et cancer

Les gélatinases jouent un rôle clé dans l'invasion des cellules tumorales qui est la deuxième étape de progressions du cancer. Elle est correspondue à la perturbation d'adhérence entre les cellules et la matrice extracellulaire, en particulier la membrane basale (Chantrain et DeClerck, 2002), ouvrant la voie à la migration des cellules endothéliales pour former de nouveaux vaisseaux sanguins (Risau, 1997).

Plusieurs études, en effet, ont identifié que l'expression des gélatinases est augmentée dans de nombreuses tumeurs primaires, telles que le cancer colorectale, le cancer du sein ou le cancer gastrique (Herszényi et al., 2012 ; Liu et al., 2014). La MMP-2 a été trouvée dans 80% des tumeurs primaires (Talvensaaari-mattila et al., 2005)

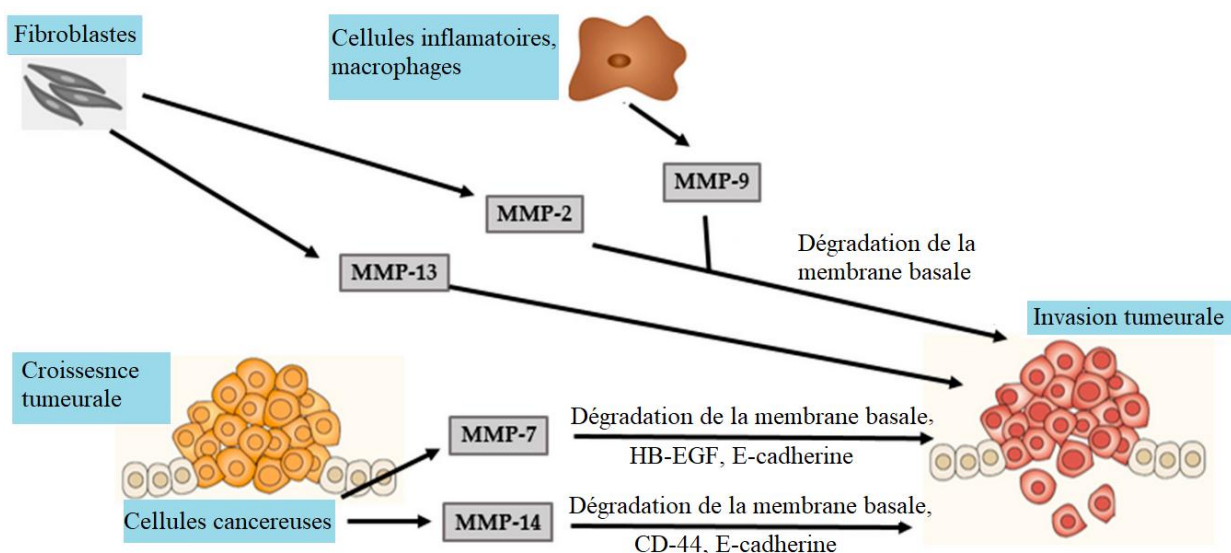


Figure 11 : Rôle des MMPs dans l'invasion tumorale (Pittayapruerk et al., 2016).

II.2. Gélatinases et maladies cardiovasculaires

La MMP-2 a été identifiée comme une cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires, car elle a été décrite comme une protéase, responsable de la dégradation des peptides vasodilatateurs qui va donner des fragments ayant des propriétés vasoconstrictrices, pouvant mener à l'hypertension (MARTÍNEZ et al., 2004).

De plus, la MMP-9 possède un rôle dans la formation et la déstabilisation des plaques d'athérosclérose (Newby, 2005). Le remodelage artériel est également associé à une augmentation de l'accumulation et de la dégradation du collagène I et IV digéré par la MMP-9 (Yabluchanskiy et al., 2013).

II.3. Gélatinases et autre pathologie

Dans les maladies auto-immunes, les gélatinases sont impliquées à la fois dans la génération des épitopes restants et dans la modulation des interférences entre les compartiments du système immunitaire (Cauwe et al., 2011). De plus, les gélatinases jouent également un rôle important dans les troubles métaboliques, tels que le diabète de type 2 et l'obésité (Gonçalves et al., 2009), et dans les maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence d'Alzheimer (Romi et al., 2012). Les principale stratégie thérapeutique pour lutter contre la dérégulation des MMPs est la conception de médicaments pour cibler leurs domaines catalytiques (Tallant et al., 2010).

III. Méthodes d'études et de détection des gélatinases

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'analyse des formes actives et latentes des gélatinases A et B dans des échantillons biologiques. Ici, nous décrivons brièvement les principales techniques utilisées pour la détection de MMP-2 et MMP-9 (Ricci et al., 2016).

III.1. Zymographie de gélatine

La zymographie est une technique simple, d'abord décrite en 1980 par C. Heussen et EB Dowdle (Hu et Beeton, 2010), impliquée dans la séparation des protéines dans un gel de polyacrylamide contenant un substrat spécifique (Leber et Balkwill, 1997). Cette technique est semi-quantitatif, il peut donc être utilisée pour déterminer les niveaux de MMP dans les échantillons (Hu et Beeton, 2010). La zymographie de la gélatine permet de distinguer les formes latente et active de la MMP-2 et de la MMP-9 (Tatsuguchi et al., 1999).

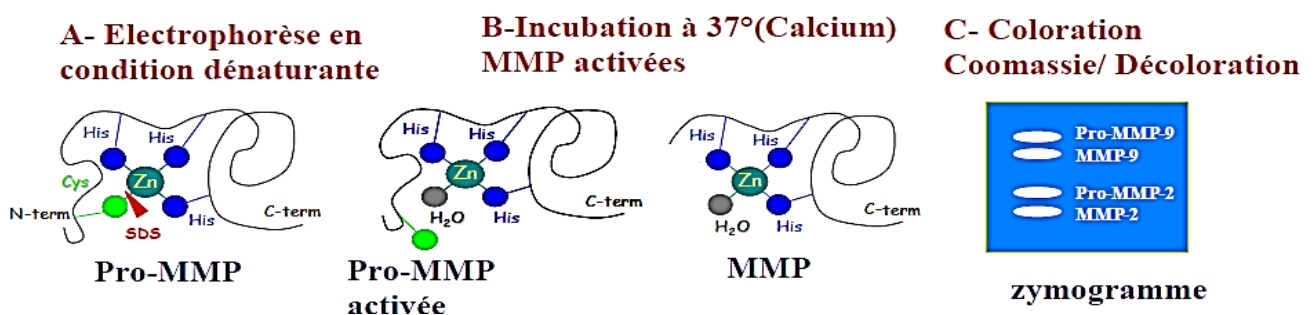


Figure 12 : Principe d'électrophorèse d'après (Ribeiro-fleury, 2010).

III.2 Western blot

Western blot est une procédure puissante et importante pour l'immuno-détection des MMPs post-électrophorétique (Hao et al., 1999). Les échantillons sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE à 10% suite par une incubation avec un tampon de blocage en présence d'un anticorps primaire anti-MMP-2 ou anti-MMP-9. D'autre incubation suivante avec un anticorps secondaire et un substrat luminescent permet la révélation du signal qui est directement liée à la quantité de protéines (Ricci et al., 2016). Cette technique exige la connaissance du substrat natif des MMPs et la disponibilité d'anticorps. De plus, elle est cher et prend du temps (Cheng et al., 2008). Ses limites de détections sont beaucoup plus faibles que celles des autres méthodes (Krizkova et al., 2011; Lombard et al., 2005).

III.3. ELISA

ELISA (Enzyme-Linked Immun-Sorbent Assay) est une technique utilisée pour les dosages sérologiques (Engvall, 2010). Elle a été récemment développée pour la quantification des MMPs. Dont, la détermination quantitative des collagénases leucocytaire et les gélatinases humaines (Bergmann et al., 1989 ; Yoshioka et al., 1987). Par conséquent, cette technique implique l'utilisation des kits ELISA in vitro pour l'homme, ainsi que d'autres espèces, les kits MMP-2 et MMP-9 sont disponibles dans le commerce « par ex. Biotrack®, systèmes de R & D Quantikine HS®, etc. » (Ricci et al., 2016). Cette technique est décrite d'abord par la caractérisation des anticorps monoclonaux dirigés contre le collagénase de fibroblastes humains. L'un de ces anticorps a été utilisé en combinaison avec un anticorps anti-collagénase polyclonal dans un test ELISA sandwich de double anticorps pour mesurer la collagénase (Clark et al., 1992). Deux combinaisons étaient applicables à l'immunodosage: un anticorps de capture monoclonal avec un anticorps de détection polyclonal (Plumpton et al., 1995).

Les tests ELISA ne permettent pas de distinguer les formes actives et latentes des enzymes ou entre les MMPs spécifiques et leurs complexes TIMP. Le principal inconvénient de cette technique est que, même si la sensibilité est élevée, elle nécessite deux anticorps différents pour chaque MMP individuelle, et une plaque d'essai séparée doit être utilisée pour la mesure de chaque MMP, ce qui rend le test très long (Ricci et al., 2016).

Matériels et méthodes

I. Matériels

La partie pratique de notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire de zoologie et de biochimie de l'université Djilali Bounaama de Khemis Miliana. Notre expérimentation a été effectuée régulièrement du mars jusqu'à fin juin.

Le présent travail a pour objectif la mise au point de la technique de zymographie sur certains organes chez la souris de laboratoire et d'analyser l'activité enzymatique des MMPs 2 et 9. Plusieurs manipulations ont été réalisées afin de trouver la meilleur dilution de l'échantillon, la meilleur composition de gel et de trouvé également la meilleur durée d'incubation. Le protocole est composé de quatre parties :

- ✓ La préparation des différentes solutions mères nécessaire à la zymographie.
- ✓ Le sacrifice de l'animal, le prélèvement des organes et de plasma, l'extraction des protéines et la préparation des différents échantillons.
- ✓ La migration électrophorétique et le développement de gel.
- ✓ L'identification des bandes et la quantification des MMPs 2 et 9 contenants dans le gel à l'aide de l'image-j.

I.1. Matériel biologique

Notre étude a été conduite sur les souris albinos de souche NMRI, de sexes différents (mâles et femelles), provenant de l'institut Pasteur d'Alger, leur masse corporelle est comprise entre 25 et 35g. Les souris ont été gardées dans des conditions contrôlées, ayant libre accès à l'eau et la nourriture (alimentés par des granules ONAB) et acclimatés aux conditions d'élevage de l'animalerie.



Figure 13 : Modèle des souris NMRI

Le choix de l'animale a pour raisons de :

- ✓ les souris partagent une similarité génétique considérable avec les humains.
- ✓ leur capacité à se reproduire et croître rapidement.
- ✓ Rapidité d'avoir les résultats.

I.2. Matériels non biologiques

Le matériel non biologique utilisé dans le cadre de notre travail est :

Instruments

- Appareil d'électrophorèse, Seringue Hamilton, Vortex, Agitateur, Plaque chauffante, Bain marie, Micropipette, Pipette, Propipette, Tubes eppendorfs, Matériel de dissection, Hôte, Centrifuge réfrigérée, Balance de précision, Tubes (hépariné, sec et capillaire), Verreries et Scanner.

Réactifs et produits chimiques

- Tris base, Acrylamide, Bisacrylamide, Glycine, SDS, Persulfate d'ammonium, Gélatine, Glycérol, Bleu de bromophénole, Triton-X100, NaCl, CaCl₂, NaN₃, Bleu de Coomassie Brilliant G-250, Méthanol, Acide acétique glacial, Acide acétique, NaOH, HCL, Chlorophorme.

Outil informatique

- Image-J 1.47u de National institutes of health, Mendely

II. Méthodes

II.1. Préparation des solutions

La détection des gélatinases A et B par zymographie nécessite la préparation de plusieurs réactifs, appartenant aux constituants du gel, son développement ainsi que les produits de l'échantillonnage (voire l'annexe). Chaque réactif possède des propriétés physicochimiques, influençant de façon directe ou indirecte sur le comportement des enzymes ciblés sur le gel.

Les solutions préparées sont :

- Tampon d'échantillon
- Tampon Tris 1.5 M pH 8,8 pour gel de séparation
- Tampon Tris 0.5 M pH 6.8 pour le gel de concentration
- La solution d'Acrylamide / bisacrylamide 30 : 0,8%
- Tampon d'électrophorèse (5X) pH 8.3

- Persulfate d'ammonium à 10%
- Solution de gélatine
- Triton X-100 à 2,5%
- Tampon d'incubation à pH 7,8
- Blue de Coomassie Brilliant (0,05%)
- Solution de décoloration
- Tampon d'homogénéisation pH 7.4 (50 mM Tris, 0.5% triton)

II.2. Préparations des échantillons

Les gélatinases contenant dans les organes sont existées au niveau intracellulaire et extracellulaire ou au niveau plasmatique. Leur extraction permet de préparer des homogénats tissulaire consentant les MMPs :

II.2.1. Prise de sang

Un prélèvement sanguin a été réalisé au niveau du sinus-rétro-orbital de l'œil à l'aide d'un tube capillaire menée d'un anticoagulant. Le sang prélevé sur des tubes héparinés est centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes et le plasma recueilli.



Figure 14 : Prise du sang

II.2.2. Dissection et prélèvement des organes

Après le prélèvement sanguin, l'animal est rapidement euthanasié par le chlorophorme, fixé sur le dos à l'aide d'aiguilles puis disséqué (figure 15). Les organes sont rapidement prélevés sur des tubes ependorfs menés au frais pour empêcher toute dégradation enzymatique avant d'être pesés sur une balance de précision.



Figure 15 : Sacrifice de l'animale et prélèvement des organes.

II.2.3. Extraction des protéines

Après avoir pesé les organes, chaque 30mg de l'organe est mélangé avec 120 μ l de tampon d'homogénéisation froid (4°C) dans un tube sec. Les organes sont broyés par la suite 3 fois de 10 secondes chacun sur la glace avec un piston. Puis centrifugé 5000 tours par 10 min dans une centrifugeuse. Le surnageant à la fin est récupéré sur des tubes endorphs.



Figure 16 : Les étapes d'échantillonnage.

Pour chaque surnageant, on prépare une gamme de dilution afin d'analyser l'influence des différentes dilutions sur l'intensité des bandes. Les dilutions sont réalisées en cascade en

utilisant le tampon d'homogénéisation (Figure 17). Pour le plasma, les dilutions sont réalisées par l'eau distillée.

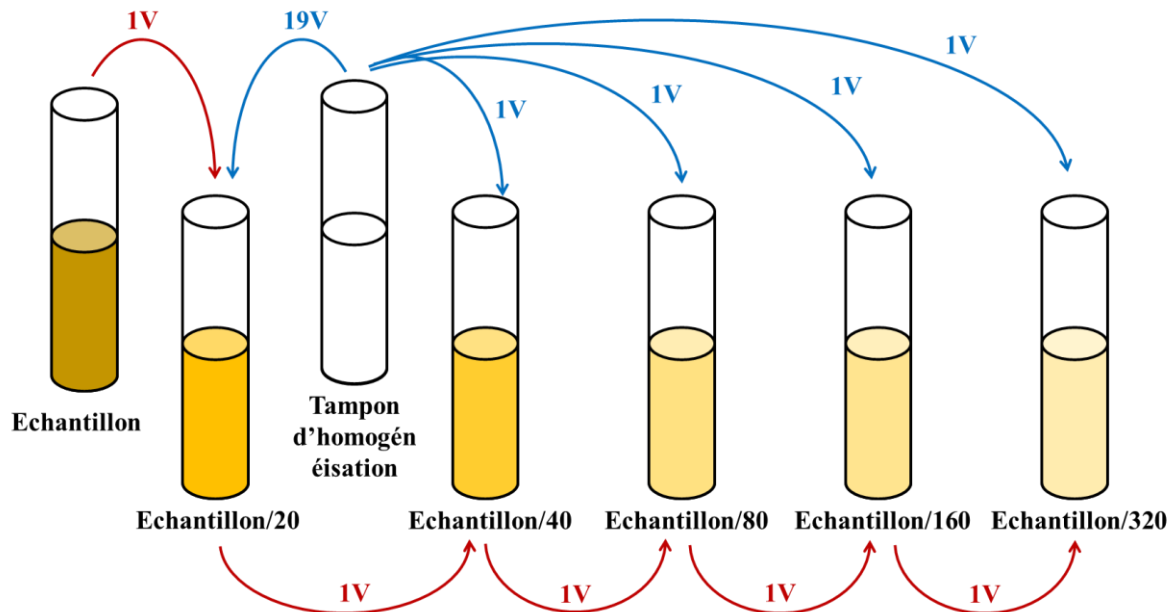


Figure 17 : Dilution des échantillons par cascade.

Pour chaque volume de ces dilutions on ajoute le même de tampon d'échantillon.

II.3. Préparation de la cuve d'électrophorèse

Le protocole suivant est pour la préparation de deux gels

II.3.1. Coulage des plaques

Le coulage des plaques consiste à assembler les deux plaques du verre avec un espaceur afin de créer un espace de 1,5mm. Ces plaques sont montées puis glissées dans le support. L'étanchéité est testée avec de l'eau distillée à l'aide d'une seringue. L'eau doit être complètement éliminée par un papier filtre. Le niveau de gel de séparation doit être marqué sur les plaques.



Figure 18 : Coulage des plaques

II.3.2. Préparation de gel

II.3.2.1. Gel de la séparation

La solution de gel de séparation consiste à préparer extemporanément une solution du persulfate d'ammonium (APS) à 10% en dissolvant 0,1g de l'APS dans 1mL d'eau distillée. Par la suite une solution de gélatine est préparée en dissolvant 0,1g de gélatine (substrat digérés pour les gélatinases) dans 4,5mL d'eau distillée. Pour accélérer la solubilité, la solution doit être placée dans un bécher d'eau tiède. On ajoute ensuite 0,5mL de solution d'APS à 10% à la solution de gélatine.

Le gel de séparation de polyacrylamide à 8% consiste à mélanger soigneusement 5,75mL d'eau distillée, 3,75mL de Tris 1,5 M pH 8,8, 4mL de polyacrylamide/bisacrylamide à 30% et 1,5mL de la solution de gélatine dans un bécher.

Le mélange est laissé reposer pendant 3 minutes avant l'ajout de 60 μ L d'APS et 20 μ L du TEMED. Ses derniers induisent la polymérisation de polyacrylamide ainsi que l'augmentation de la viscosité de la solution. Par conséquent, la solution doit être versée rapidement dans la chambre de coulage du gel en utilisant une seringue. L'ensemble doit être polymérisé pendant 20min. Le niveau du gel de séparation est recouvert par l'eau distillée.

II.3.2.2. Gel de concentration

Le gel de concentration à 4% consiste à combiner 3,05 mL d'eau distillé, 1,25 mL de Tris 0,5M pH 6,8, 50 μ L de SDS 10%, et 0,65mL de polyacrylamide/bisacrylamide à 30%. Par la suite on ajoute 35 μ L d'APS à 10% et 20 μ L de TEMED pour activer la polymérisation.

L'eau distillée versée est retiré de gel de séparation et le gel de concentration est coulée jusqu'à atteindre le haut de la petite plaque. En suite le peigne est inséré et l'ensemble laisse reposer pendant 15 à 20 min jusqu'à la polymérisation du gel de concentration. Une fois la polymérisation du gel est achevée, on enlève le peigne et on aspire les bulles d'air formés dans les puits.

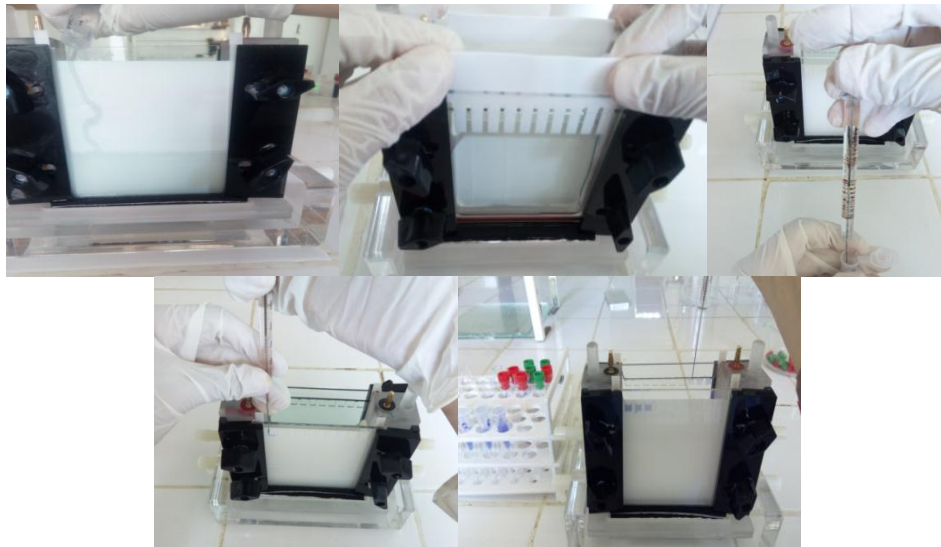


Figure 19 : Coulage de gel.

II.4. Migration électrophorétique

Dans chaque puits, on dispose 20 μ L de chaque échantillon, de plus dilué à moins dilué. On enlève les plaques du support de coulage et on les place dans le bloc électrode afin de serrer le dispositif et d'insérer le tout dans la cuve d'électrophorèse.

On prépare ensuite le tampon d'électrophorèse 1X en diluant 140 mL de tampon 5X dans 560 mL d'eau distillée. 175 mL de tampon d'électrophorèse 1X est ajouté dans la chambre interne de la cuve et 525 mL dans la chambre externe.

Le couvercle est placé sur la cuve et le gel est déposé sous un courant électrique de 90v produit par générateur pendant 60 minutes jusqu'à ce que le front de colorant atteigne le fond du gel. La migration des échantillons contenants dans les puits de gel est réalisée, ainsi, sur le plan vertical selon leur poids moléculaire.

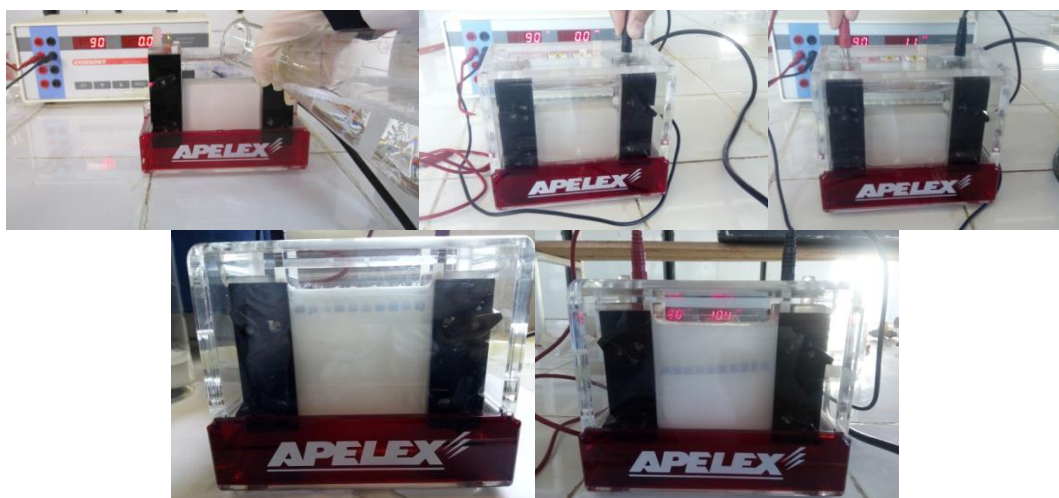


Figure 20 : Migration électrophorétique.

II.5. Développement de gel

Le développement de gel consiste de suivre certaines étapes pour faire apparaître les différentes bandes des gélatinases.

II.5.1. Lavage

Après la fin de la migration électrophorétique, les plaques sont démontées et le gel est délicatement retiré puis placé dans un récipient qui contient 400 mL de tampon du lavage de gel pendant 40 min et sous une agitation douce.

Le lavage du gel est une étape critique de cette procédure. Pendant ce temps, le Triton-X100 est échangé contre le SDS présent dans le gel, ce qui permet la renaturation et l'activation partielle de l'enzyme.

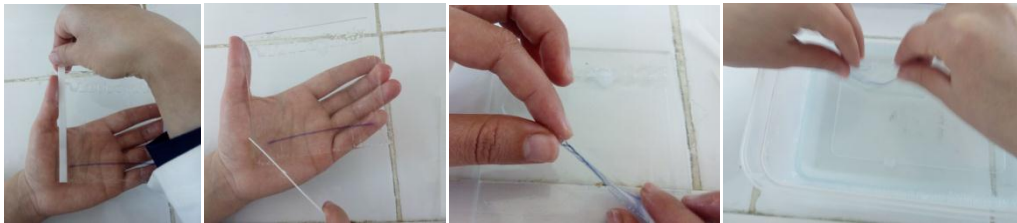


Figure 21 : Lavage et renaturation de gel

II.5.2. Incubation

Cette étape consiste à l'activation totale des gélatinases en présence des ions calciques contenus dans un tampon d'incubation. Le gel est incubé dans ce tampon à 37°C pendant 42 h sous une agitation douce, l'incubation conçue pour permettre à la protéase de digérer son substrat (la gélatine).



Figure 22 : Incubation de gel dans le bain marie.

II.5.3. Coloration et décoloration de gel

Après l'incubation, le gel est placé dans une solution de coloration de bleue Coomassie pendant 1 h à température ambiante, sous une agitation douce.

La décoloration est l'étape finale de notre expérimentation. Elle consiste de placer le gel dans un tampon de décoloration pendant 2 h sous l'agitation douce, jusqu'à ce que les bandes claires des gélatinases A et B soient révélées. Le gel décoloré est lavé par l'eau distillée puis, Scellé dans une pellicule plastique avec un scellant.



Figure 23 : Coloration et décoloration de gel.

II.6. Analyse de gel et quantification des bandes

Le gel est immédiatement scanné avec un scanner numérique afin de procéder à la quantification des différentes bandes. Cette quantification est réalisée à l'aide de logiciel image-J 1.42q qui transforme les bandes en graphes dont les surfaces calculées changent avec l'intensité et l'épaisseur de ces bandes et donc avec l'activité des MMPs.

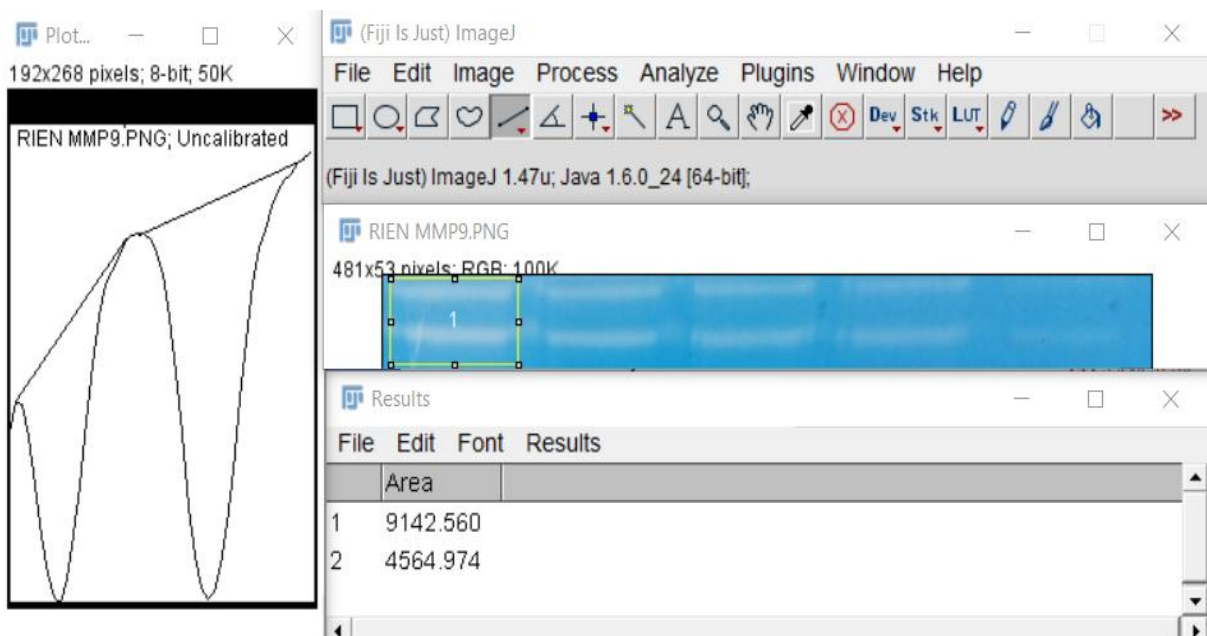


Figure 24 : Analyse et quantification de gel.

Résultats et discussion

I. Résultats

Notre étude vise la mise au point d'un protocole de la technique de zymographie pour analyser l'activité enzymatique des MMP-2 et MMP-9 dans le plasma et dans différents organes (cœur, foie, rein et poumon) chez la souris de laboratoire. Après plusieurs essais, seul ceux du plasma et du rein sont réussis. Nous avons présenté dans ce travail, donc, seul les résultats obtenues pour le rein et le plasma.

I.1. Au niveau rénal

Les résultats de la technique de zymographie pour évaluer l'activité de MMP-2 et 9 au niveau du rein est représentés par le gel d'électrophorèse (figure 25). Comme attendu, on observe l'apparition de 4 bandes dont la distance de migration dépend de poids moléculaire de ces protéines. Plus la protéine a un petit poids moléculaire plus sa migration dans le gel est loin. Par conséquent, la première bande en haut de gel ne peut-être que la Pro-MMP-9 qui a le PM le plus élevé de 92kDa. La 2^{ème} bande représente la MMP-9 active de 82kDa. La 3^{ème} bande c'est la Pro-MMP-2 de 72kDa et finalement la dernière bande représente la forme active de la MMP-2 de 65kDa.

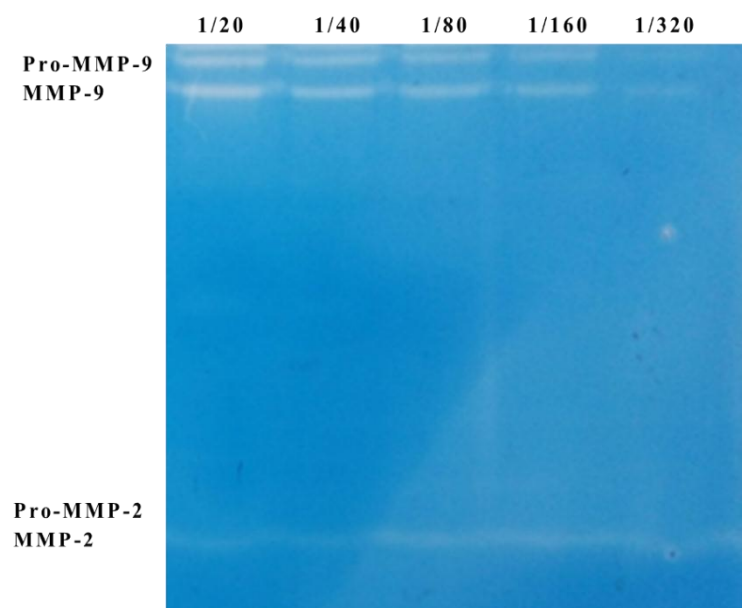


Figure 25 : Zymogramme des gélatinases au niveau du rein.

L'observation directe de gel permet de distinguer une différence d'ordre décroissant de l'intensité des bandes de la MMP-2 et -9 et de ses formes inactives en fonction de la dilution. Plus on dilue l'homogénat de l'organe dans le tampon d'homogénéisation plus les bandes apparaissent claires.

I.1.1. La MMP-9

L'activité gélatinolytique de MMP-9 détectés dans le surnageant d'homogénat du rein est analysée en fonction des différentes dilutions. En effet nous avons testé 5 dilutions de la solution mère de l'homogénat rénal : 1/20, 1/40, 1/80, 1/ 160 et 1/320.

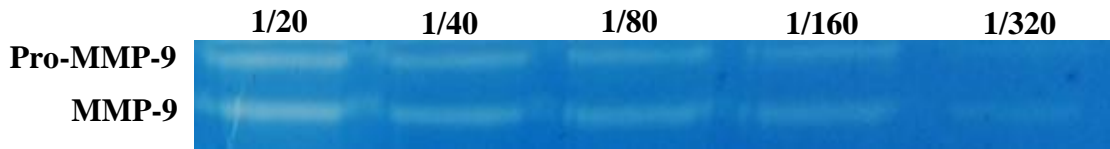


Figure 26 : Zymogramme de la gélatinase B du rein.

Nous avons constaté une diminution de l'intensité des bandes sur le plan horizontale en fonction de la dilution (de plus concentré vers le moins concentré). La dilution 1/20 semble la meilleur dilution pour avoir bonne apparence des bandes. En analysant ce puits, on constate que la MMP-9 activée est plus exprimée que sa forme inactive dans le rein de cet animal.

La quantification de ces différentes bandes par l'image-J sert à indiquer l'intensité de ces bandes sous une forme de surfaces exprimées en unité arbitraire. Cette quantification nous permet de déterminer les concentrations de la pro-MMP-9 ainsi que son degré d'activation (la relation entre la MM-9 et la pro-MMP-9). Les résultats de cette quantification sont reportés dans le tableau et les figures suivants :

Tableau 01 : Intensité des bandes de la gélatinase B au niveau rénal mesuré par l'imag-j

Dilution	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Pro MMP-9	1016,598	2010,276	2328,983	3273,12	4564,975
MMP-9	5649,146	6417,882	7314,874	8399,924	9142,560

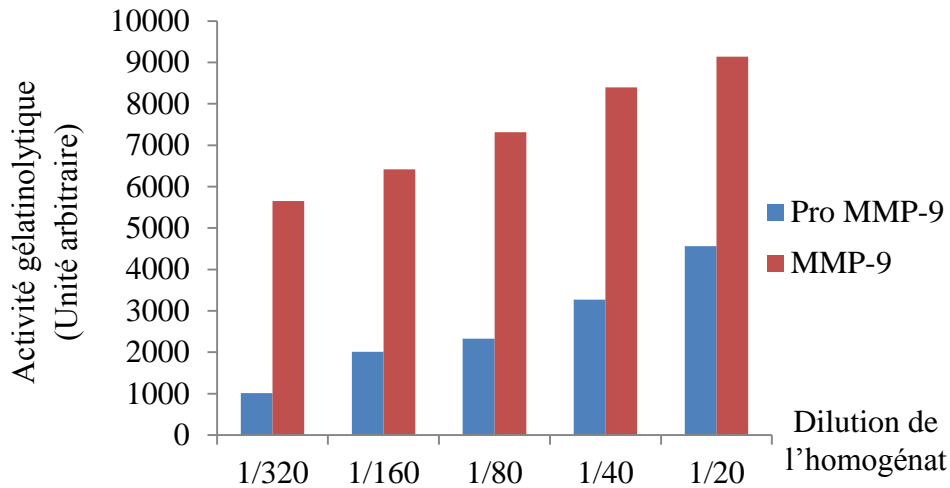


Figure 27 : L'intensité des bandes de gélatinase B en fonction de la dilution dans l'homogénat rénal

L'analyse des histogrammes montre l'existence d'une relation linéaire entre l'intensité des bandes de la MMP-9 ou la pro-MMP-9 et la concentration de ces protéines dans l'homogénat (figure 27). Le coefficient de détermination est de 0,996 pour la MMP-9 et 0,965 pour la pro-MMP-9.

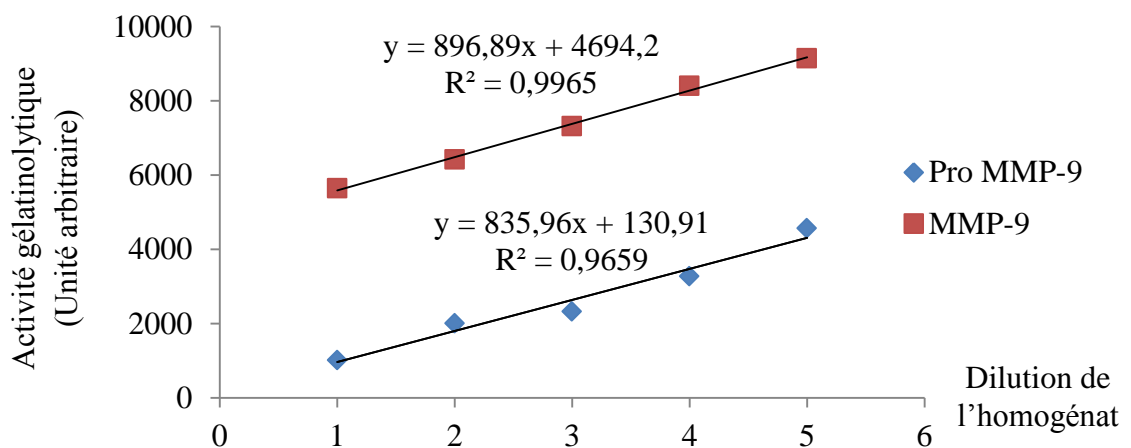


Figure 28 : Coefficient de détermination pour la MMP-9 et la pro-MMP-9 au niveau du rein.

La quantification de ces bandes montre également que la forme active de la MMP-9 est plus exprimée que la forme inactive (pro-MMP-9). L'étude de la variation de l'intensité des bandes entre MMP-9 et Pro-MMP-9 en fonction de la dilution (figure 28) montre qu'il y a une relation de proportionnalité entre la pro-MMP-9 et la MMP-9 avec un rapport pro-MMP-9/MMP-9 est égale à 0,357

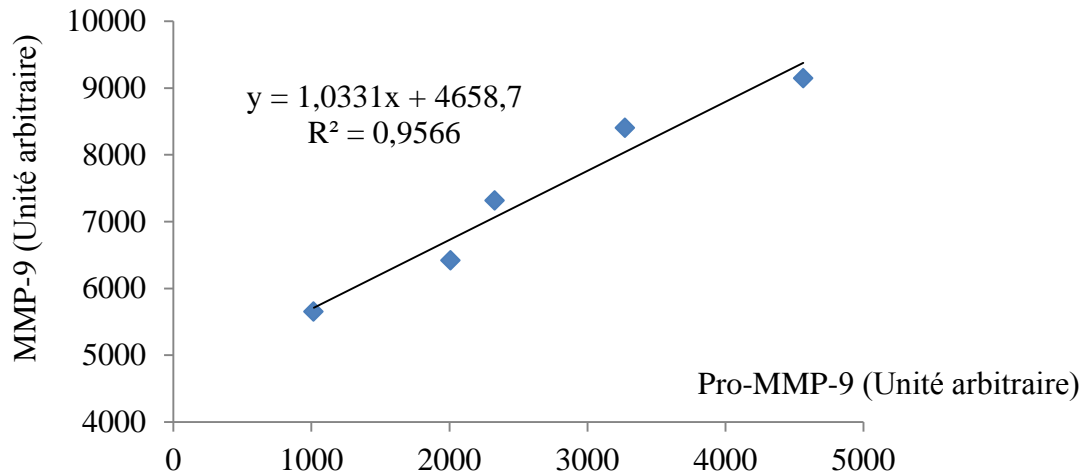


Figure 29 : Variation de l’intensité des bandes entre MMP-9 et Pro-MMP-9 en fonction de la dilution

L’exploitation de ces données montre dans le rein de cet animal, la forme active de la MMP-9 représente 73,67% de la totalité de la MMP-9 exprimée (tableau 04).

Tableau 02 : Taux de MMP9 et Pro-MMP9 dans le rein

	Moyenne	Pourcentage %
Pro-MMP-9	2638,79	26,32
MMP-9	7384,88	73,67

I.1.2. La MMP-2

La gélatinase A est détectée dans le rein sous deux isoformes active avec un poids de 64KDa et latente de poids 72KDa. La forme majoritaire est la forme active.

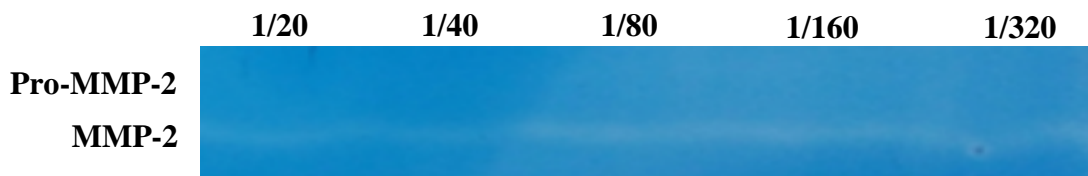


Figure 30 : zymogramme de la gélatinase A au niveau du rein.

Tout comme la gélatinase B, la densité des bandes de la gélatinase A est inversement corrélée avec la dilution. A l’œil nu, on voit qu’il existe une seule bande de la gélatinase A. La quantification par l’imagej mis en évidence une 2^{ème} bande en haut de la première et qui ne peut être que la pro-MMP-2 (tableau 03 et figure 30).

Tableau 03 : Intensité des bandes de gélatinase A mesuré par l’imag-j

Dilution	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Pro MMP-2	101,728	185,556	275,284	335,049	418,627
MMP-2	1600,477	2440,811	3684,982	5066,004	8310,430

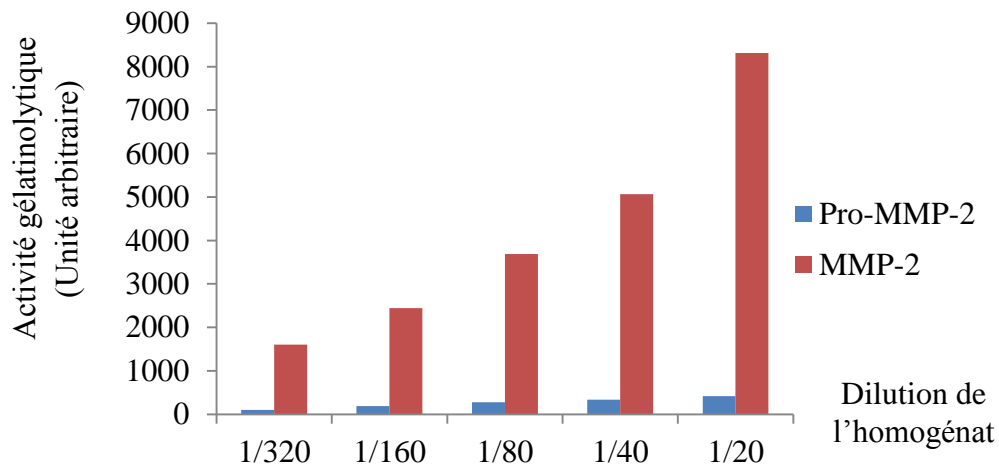


Figure 31 : L’intensité des bandes de la gélatinase A en fonction de la dilution dans l’homogénat rénal

On remarque clairement que la densité des bandes correspondante au MMP-2 est beaucoup plus élevée que la densité des bandes du pro-MMP-2. De plus, les activités gélatinolytiques de la pro-MMP-2 est proportionnellement inversées avec la dilution avec un coefficient de détermination de $R=0.996$. Egalement, l’activité gélatinolytique de la MMP-2 est aussi corrélée inversement avec la dilution avec un coefficient de détermination de $R=0.962$.

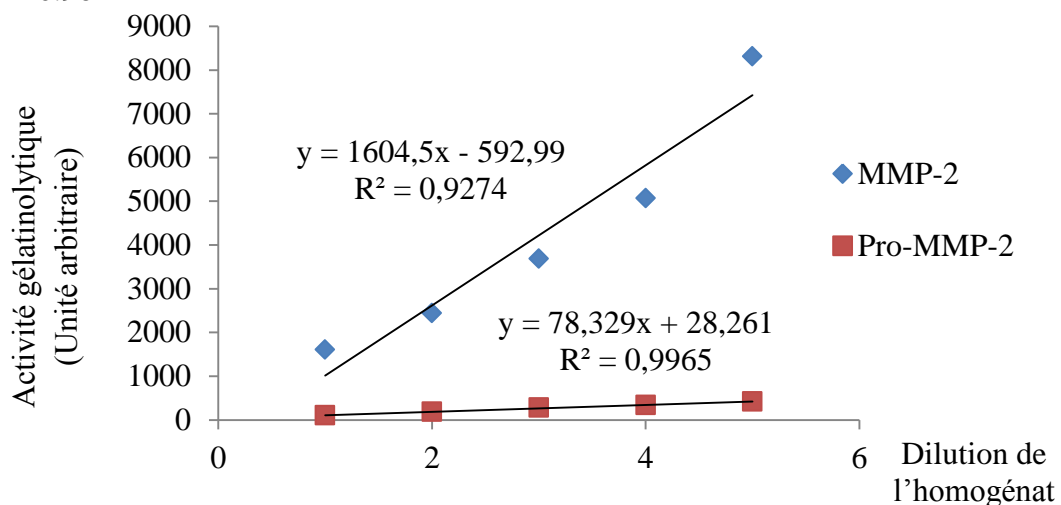


Figure 32 : Coefficient de détermination de MMP-2 et pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau du rein.

La représentation graphique montre qu'il existe une relation linéaire entre les deux formes de MMP-2 en fonction de la dilution. Celle-ci est confirmée par un coefficient de corrélation de $R^2=0.9159$ (figure 33) et un rapport pro-MMP-2/MMP-2 est égale à 0.0623

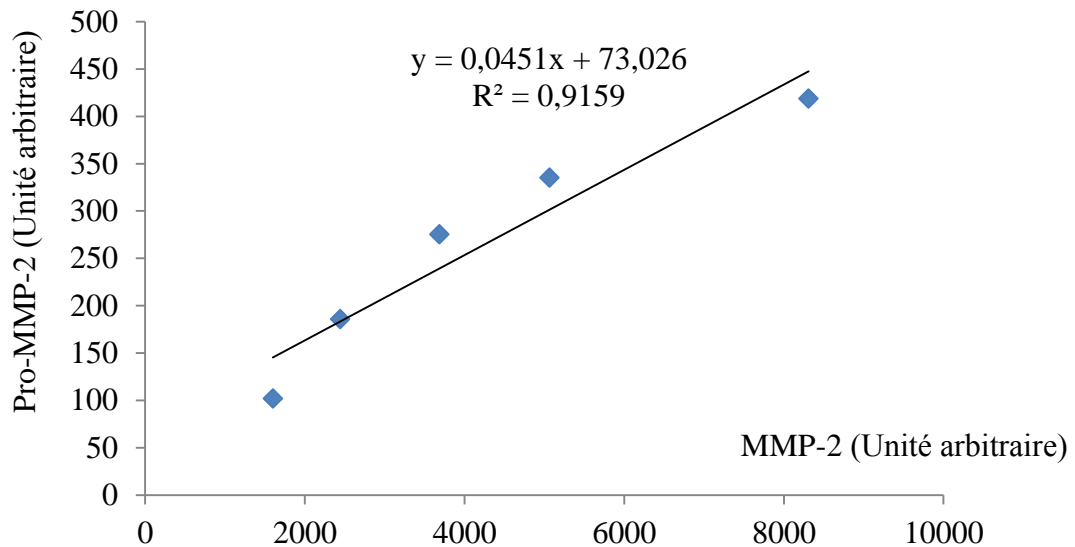


Figure 33 : Variations d'activité enzymatique de MMP-2 par rapport à la pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau du rein

La forme active de la MMP-2 est plus exprimée que sa forme inactive dans le rein de cet animale. La forme active représente 94,13% et la forme inactive 5,87%. Donc la MMP2 est 16 fois plus exprimée dans le rein que la pro-MMP-2 (tableau 04).

Tableau 04: Taux de MMP2 et Pro-MMP2 dans le rein

	Moyenne	Pourcentage %
Pro-MMP-2	263,2488	5,87
MMP-2	4220,5408	94,13

I.2. Au niveau plasmatique

La figure 30 montre le gel de la zymographie réalisé sur différentes dilutions du plasma de la souris. Les bandes de la gélatinases A et B détectées ayants des caractéristiques différentes de celles notées au niveau rénal : les bandes sont plus épaisses mais moins claires.

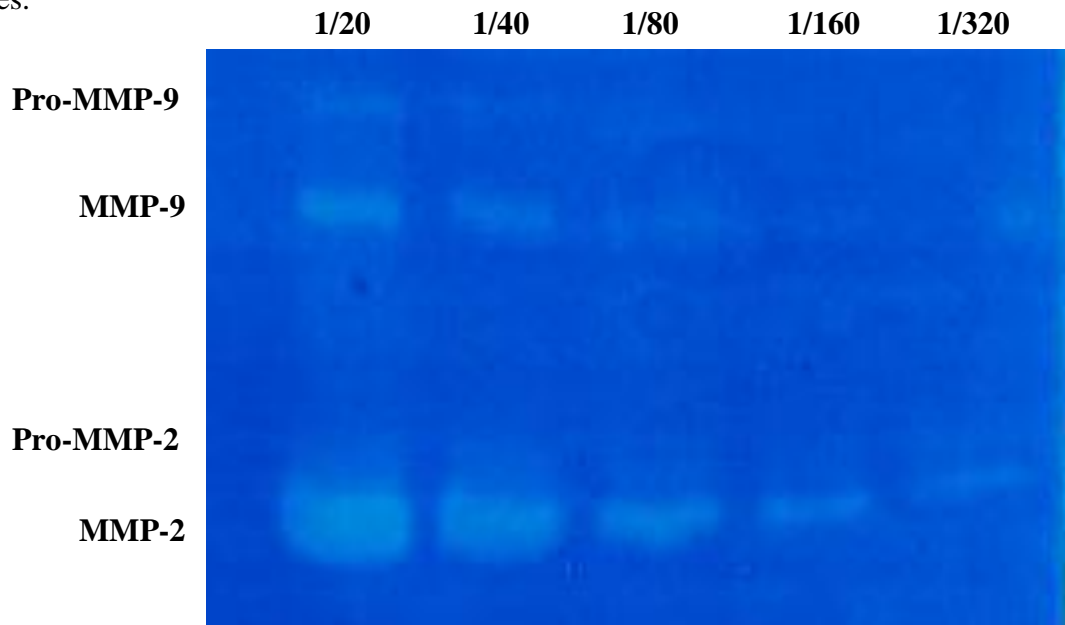


Figure 34 : Zymogramme des gélatinases A et B au niveau de plasma.

Notre gel est consisté du 5 puits chargées du surnageant du plasma en fonction de la dilution. On constate que l'intensité des bandes dépend de la dilution à l'échelle horizontale et du poids moléculaire à l'échelle verticale. Les bandes claires (MMP-9, MMP-2) représentent les formes actives de ses enzymes.

I.2.1. Gélatinase B

Dans la figure 31 on observe l'activité gélatinolytique de la MMP-9 et sa forme inactive la pro-MMP-9 détectée au niveau plasmatique d'une souris en fonction de différentes dilutions.

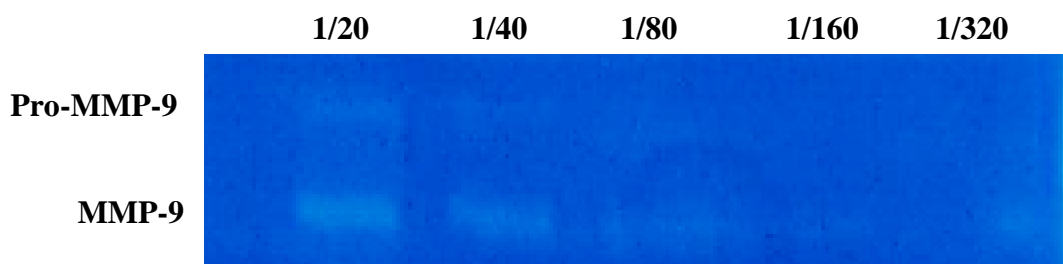


Figure 35 : Zymogramme de gélatinase B au niveau de plasma

Nous constatons sur le plan horizontal, une diminution de la densité des bandes par apport à l'ordre de la dilution (de plus concentré vers le moins concentré). Sur le plan vertical et pour chaque dilution, on constate une surexpression de MMP-9 par rapport à la pro-MMP-9. Les valeurs de la quantification de ces différentes bandes sont reportées dans le tableau et la figure suivante :

Tableau 05 : Intensité des bandes de gélatinase B au niveau plasmatique mesurée par l'imagj

Dilution	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Pro MMP-9	681,456	1154,406	1239,841	2087,175	2664,761
MMP-9	4504,255	5282,255	6966,338	7476,338	7718,666

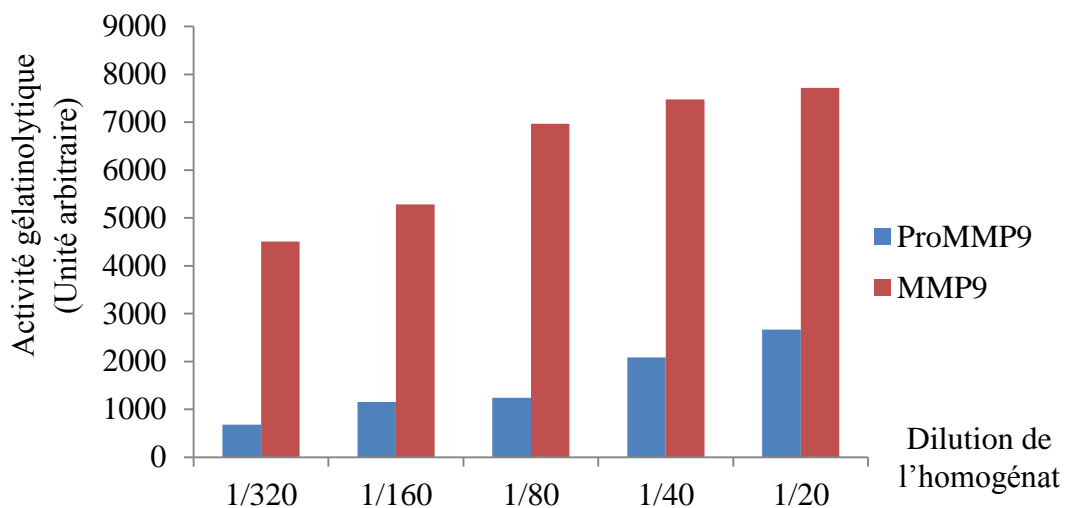


Figure 36 : L'intensité des bandes de la gélatinase A en fonction de différentes dilutions du plasma

En analysant le graphe, on remarque que l'activité gélatinolytique de la forme active est supérieure à celle de la forme inactive et une augmentation linéaire de l'activité gélatinolytique de la MMP-9 et la pro-MMP-9 en fonction de la concentration (l'inverse de la dilution). Effectivement, le coefficient de détermination mesuré est 0,922 pour la MMP-9 et 0,946 pour la pro-MMP-9. Donc on peut choisir la dilution 1/20 comme la meilleur dilution qui permet d'obtenir une bonne apparence des bandes.

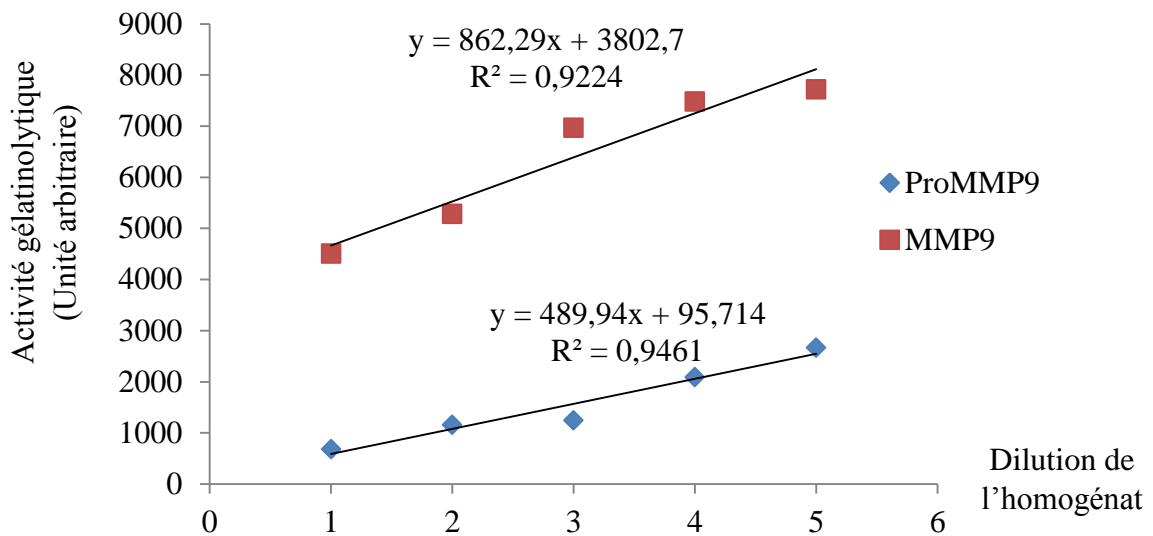


Figure 37 : Coefficient de détermination de MMP-2 et pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau du plasma.

L'étude de la variation de l'activité gélatinolytique de MMP-9 par rapport à celle de Pro-MMP-9 en fonction de différentes dilutions réalisées montre une corrélation presque linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,767. La dilution 1/80 semble fausser nos résultats.

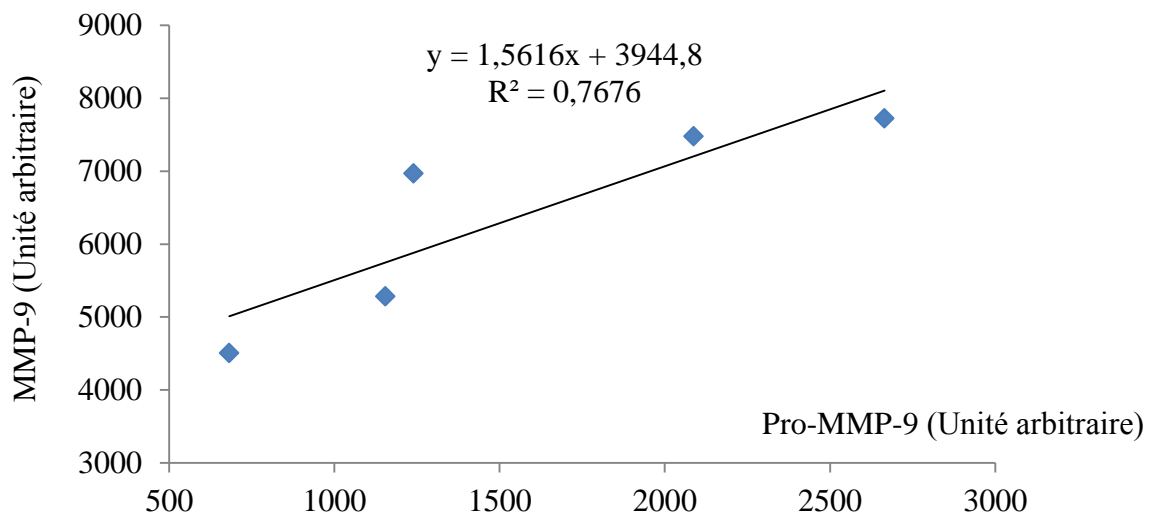


Figure 38 : Variations d'activité enzymatique de MMP-9 par rapport à la pro-MMP-9 en fonction de la dilution au niveau de plasma.

Egalement, nous constatons au niveau du plasma que la forme activée de la MMP-9 est plus exprimée avec un pourcentage de 80,32%. La forme inactive de MMP-9 est peu exprimée et représente 19,67%. Donc la forme active est 5 fois plus exprimée que la forme inactivée dans le plasma de cette souris.

Tableau 06 : Taux de MMP9 et Pro-MMP9 dans le plasma

	Moyenne	Pourcentage %
Pro-MMP-9	1565,5278	19,67
MMP-9	6389,5704	80,32

I.2.2. Gélatinase A

La gélatinase A est détectée dans le plasma de la souris sous deux isoformes active avec un poids de 64KDa et latente de poids 72KDa. La forme majoritaire est, en concertation avec le rein, la forme active.

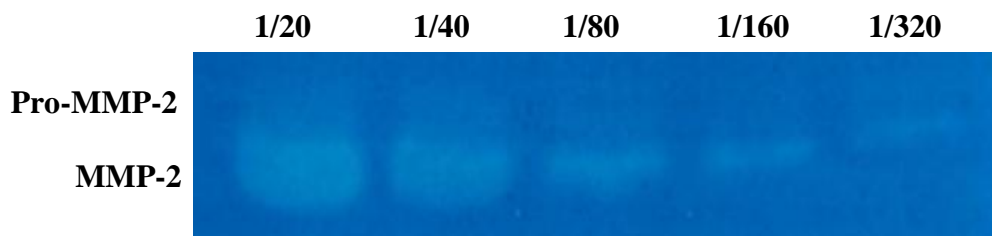


Figure 39 : Zymogramme de gélatinase A au niveau de plasma

Egalement, on constate que plus le plasma est dilué, plus la densité des bandes est faible. La meilleure dilution qui permet d’avoir une bonne apparence des bandes est 1/160. Les dilutions 1/20, 1/40 et 1/80 permettent d’avoir des bandes épaisses. Les valeurs de la quantification de ces différentes bandes sont reportées dans le tableau et la figure suivante :

Tableau 07 : Intensité des bandes de gélatinase A au niveau plasmatique mesurée par l’imagj

Dilution	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Pro MMP-2	199,971	267,142	366,284	525,669	560,841
MMP-2	8948,803	9446,146	11739,681	13377,915	15318,258

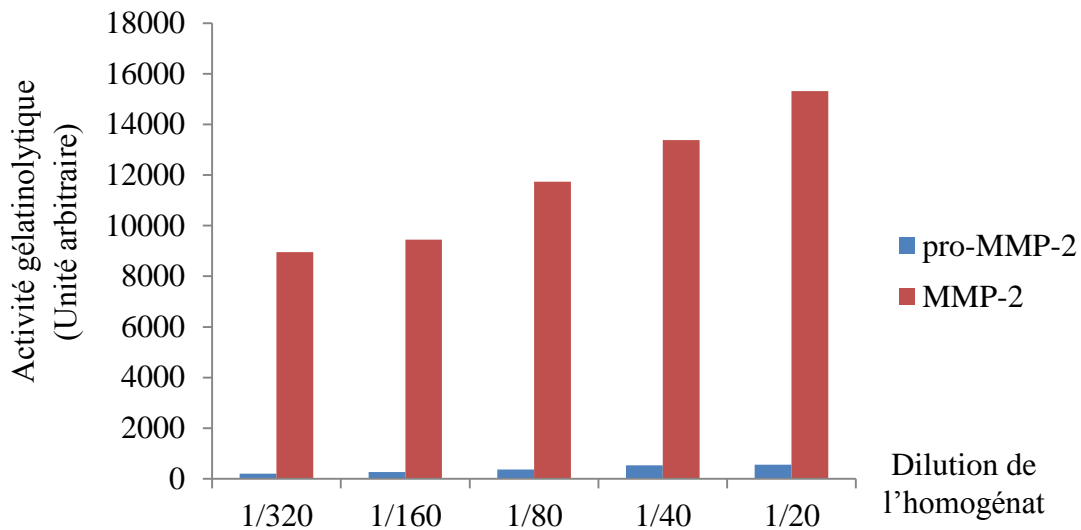


Figure 40 : L'intensité des bandes de la gélatinase A en fonction de différentes dilutions du plasma

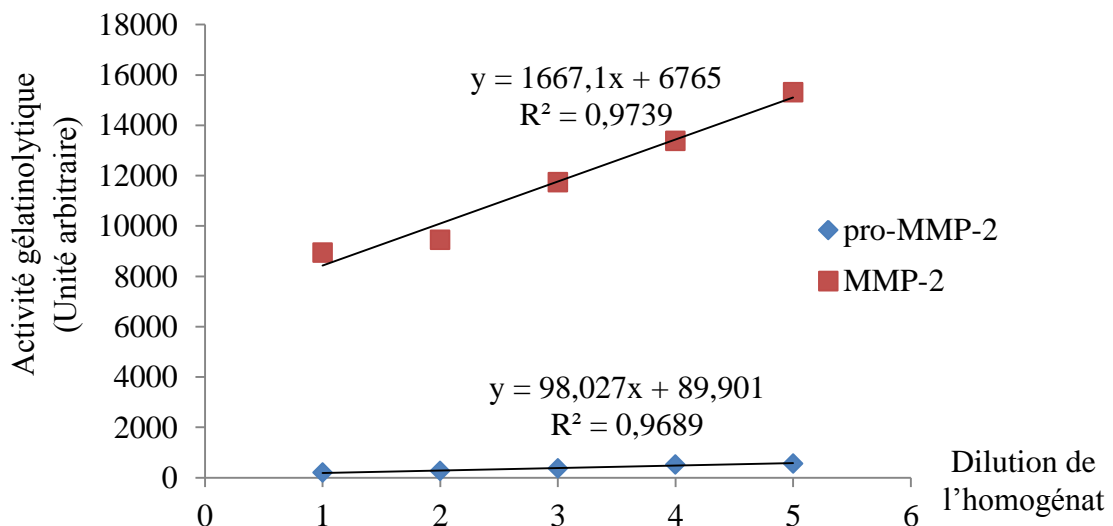


Figure 41 : Coefficient de détermination de MMP-2 et de pro-MMP-2 du plasma.

L'analyse du graphe montre une augmentation linéaire de l'intensité des bandes des 2 formes de la gélatinase A. cette activité gélatinolytique est inversement corrélé avec la dilution et donc positivement avec la concentration des MMP.

On remarque une faible expression de la pro-MMP-2 et une forte expression de la MMP-2 active. L'étude de la variation de l'intensité des bandes entre MMP-2 et Pro-MMP-2 en fonction de la dilution (figure 37) montre qu'il y a une relation, également linéaire et de proportionnalité entre ces 2 formes de la MMP-2 avec par un coefficient de détermination de 0,957 et un rapport pro-MMP-2/MMP-2 est égale à 0,032.

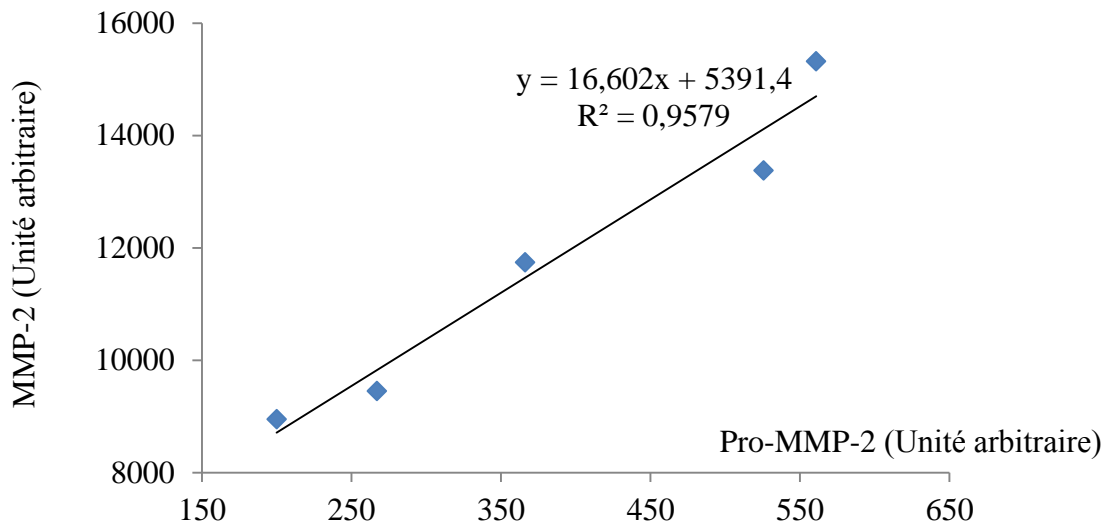


Figure 42 : Variations d’activité enzymatique de MMP-2 par apport à la pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau de plasma.

Le tableau suivant montre que la forme active de MMP-2 représente 96,8% et la forme inactive représente seulement 3,16% dans le plasma.

Tableau 08 : Taux de MMP2 et Pro-MMP2 dans le plasma

	Moyenne	Pourcentage %
Pro-MMP-9	383,9814	3,16
MMP-9	11766,1606	96,8

I.3. Comparaison des gélatinases A et B au niveau de plasma et rein :

Le tableau suivant montre le pourcentage des gélatinases A et B dans le rein et le plasma ainsi que le taux de ses formes active et inactive pour chaque type de gélatinases. Le pourcentage entre l’activité gélatinolytique de la gélatinase A et B dans chaque tissu est calculé à partir de la dilution 1/20.

Tableau 09 : Taux des gélatinases A et B dans le plasma et le rein.

Tissu	Type de gélatinase	Pourcentage%	Forme	Pourcentage%
Rein	Gélatinase B	61,09	Pro-MMP-9	33,30
			MMP-9	66,70
	Gélatinase A	38,91	Pro-MMP-2	04,80
			MMP-2	95,20
Plasma	Gélatinase B	39,54	Pro-MMP-9	25,66
			MMP-9	74,34
	Gélatinase A	60,46	Pro-MMP-2	03,53
			MMP-2	96,47

D'après ce tableau, on constate que la gélatinase B est plus exprimée au niveau du rein que la gélatinase A. Au niveau plasmatique, par contre, c'est la gélatinase A qui est la plus exprimée.

Dans ces 2 tissus de la souris, la forme active de la gélatinase A est très fortement exprimée que la forme inactive et dépasse 95%. La forme active de la gélatinase B est également plus exprimée que la forme inactive dans le rein et le plasma mais avec un taux beaucoup moins élevé que la gélatinase A.

II. Discussion

Dans cette étude, nous avons pu mettre au point la technique de zymographie pour analyser et évaluer l'activité enzymatique de la MMP-2 et de la MMP-9 dans le plasma et le rein de la souris de laboratoire.

Plusieurs études ont montré l'importance de cette technique dans la détection et l'analyse du niveau d'expression des gélatinases et de ces formes inactive dans diverses situations physiologiques et pathologiques (Othmani Mecif et al., 2017; Raaf et al., 2011). L'expression des gélatinases *in vitro* dépend de plusieurs facteurs. En effet, la quantité des échantillons utilisés, le parcours des enzymes pendant la migration, lavage, incubation, coloration et la décoloration, sont des acteurs influençant sur le comportement de nos enzymes.

Nos résultats montrent que chaque organe possède un protocole spécifique. Nous avons signalé une relation linéaire entre l'activité gélanolytique de MMP9 et 2 et les différentes dilutions de l'échantillon. Ces résultats ont été confirmés par X. Hu et Beeton en 2010 qui ont montré que la quantité d'échantillon à charger sur un gel doit être déterminée expérimentalement en fonction de l'origine et du MMP d'intérêt. Un chargement trop faible empêchera la détection tandis qu'un chargement excessif risque d'entraîner une saturation, car il n'y a que peu de substrat qu'une protéase peut digérer dans la zone de la bande (X. Hu et Beeton, 2010). Également, une étude a signalé que l'activité des gélatinases est proportionnelle avec les quantités des protéines déposées dans les puits (entre 0,25 et 30 μ g) (Raykin et al, 2017). Une autre étude sur des élastases porcines qui dégradent la caséine plutôt que la gélatine a montré l'intensité des bandes est proportionnelle avec l'activité de ces protéases (Pan et al, 2011).

Nos échantillons sont traités par un tampon contenant du SDS qui permet aux gélatinases de perdre sa structure tertiaire pour permettre aux échantillons d'imprégner au sein des pores de polyacrilamide facilitant leur migration. Selon Ricci et al en 2016, le SDS provoque la dénaturation des gélatinases, de sorte qu'ils deviennent inactifs. L'inactivation des gélatinases au cours de la zymographie implique la dissociation de Cys73 de la molécule de zinc.

Durant notre stage, nous avons essayé plusieurs durées de lavage du gel par le Triton-X100 à 2,5% afin de mieux activer les protéases pendant l'incubation. La meilleure durée de lavage constatée est 40 minutes. Frankowski et al en 2012, montrent que le Triton-

X100 dans le tampon de lavage est échangé contre le SDS. Ceci est important car le SDS doit être complètement éliminé pour permettre la renaturation des gélatinases.

Les gélatinases incubées sont totalement activées par l'intermédiaire des ions calciques et du NaN₃ présent le tampon d'incubation. Ce dernier permet d'éliminer le pro-domaine en rendant les enzymes actifs. D'autre part, La durée d'activation est un variable qui influence également sur l'activité gélatinolytique. Nos résultats obtenus sont apparentés après plusieurs essais dans lesquelles les bandes sont bien visibles après une incubation de 48 heures. Ceci confirmé par les travaux de Hu et Beeton en 2010, qui constatent que si les bandes restent peu visible, il est nécessaire de développer les gels pour une plus longue période de temps, même jusqu'à 48 heures. De plus, les recherches de Kupai et al en 2010, montrent que pendant la période d'incubation, l'enzyme digère le substrat Co-polymérisé.

Nos expériences mettent en valeur l'intérêt des étapes de coloration et de décoloration de gel dans la visualisation des bandes de l'activité gélanolytique. Les travaux de Frankowski et al en 2012, montrent que, les durées de coloration et de décoloration sont des variables qui influenceront également sur la quantification des bandes.

Les résultats issus de l'analyse de zymogramme ont révélé les différentes isoformes des gélatinases présentes dans le plasma et le rein dont, ses enzymes sont apparues sous deux formes actives et latentes. Les travaux de Toth et Fridman en 2013, montrent que les formes actives des gélatinases ne possèdent normalement pas le domaine N-terminal inhibiteur de 10 kDa. Ces domaines peuvent être utilisés, dans certains cas, comme indicateur du degré d'activation du zymogène dans l'échantillon.

Au niveau rénal et plasmatique, nous avons constaté l'existence des 2 types de gélatinases A et B avec une prédominance de gélatinase B dans le rein et A dans le plasma. Ces résultats sont en accord avec ceux de Rao et al en 2003, qui ont trouvé que la MMP-9 est plus exprimée au niveau du rein que la MMP-2. Ils ont trouvé, en opposé de nos résultats, que la fraction latente de ces 2 types de collagénases est plus importante que la fraction active. De même, une autre étude trouve que la MMP-9 est plus abondant que la MMP-2 dans le rein des rats diabétiques mais la forme active de chaque type est plus exprimée que la forme inactive (Zhang et al., 2015). Concernant le plasma, nos résultats, sont conformes avec ceux de plusieurs travaux dont les travaux de Yazdan-Ashoori et al en 2011, qui montrent que chez des sujets en bonne santé, la MMP-2 est plus exprimée que la MMP-9 au niveau plasmatique.

Conclusion

L'objectif visé par cette étude est la mise au point d'un protocole de la technique de zymographie pour déterminer et analyser l'activité enzymatique de MMP-2 et - 9 dans le plasma et le rein. Pour des raisons techniques et liées à la courte durée de notre stage, nous n'avons pu mettre en évidence l'activité gélanolytiques de MMP-2 et -9 que dans le plasma et le rein.

Après plusieurs essais de cette technique en modifiant quelques paramètres (la dilution des échantillons, les constituants de gel, la durée de migration, la durée d'incubation,.....), nous n'avons pu mettre au point de la technique que dans le plasma et le rein.

Nos résultats montrent que les gélatinases A et B sont exprimées à la fois au niveau plasmatique et au niveau rénal. Cependant, la gélatinase B est plus exprimée au niveau du rein que la gélatinase A (61 vs 39%), et au niveau plasmatique, c'est la gélatinase A qui est la plus exprimée (60 vs 40%). Dans ces 2 tissus de la souris, la forme active de la gélatinase A est très fortement exprimée que la forme inactive et dépasse 95%. La forme active de la gélatinase B est également plus exprimée que la forme inactive mais avec un taux beaucoup moins élevé que la gélatinase A (dépasse 67%). Nous avons également, constaté une relation linéaire entre les différentes fractions de MMP-2 et 9 (latentes et actives) et l'activité gélanolytique obtenue en fonction de la dilution.

En fin nous espérons que ce modeste travail soit enrichi et amélioré par les futurs promotions, afin d'entreprendre des études de simulations de l'activité enzymatiques. Quelques perspectives qui nous semblent nécessaires pour une meilleure détection de ses enzymes :

- ✓ Trouver la meilleure concentration en protéines à déposer dans les puits
- ✓ Utilisation des marqueurs de taille pour mieux identifier les bandes
- ✓ Optimiser cette technique en modifiant encore les constituants des gels, les durée d'incubation, de coloration.....
- ✓ La mise au point de cette technique dans les autres organes.

Référence bibliographique

B

- Bannikov, G.A., Karelina, T. V., Collier, I.E., Marmar, B.L., Goldberg, G.I., 2002.** Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J. Biol. Chem.* **277**, 16022–16027. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110931200>
- Bauvois, B., 2012.** *Biochimica et Biophysica Acta* New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *BBA - Rev. Cancer* **1825**, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.10.001>
- Beaudeau, J.-L., Giral, P., Bruckert, E., Foglietti, M.-J., Chapman, M.J., 2004.** Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin. Chem. Lab. Med.* **42**, 121–131. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.024>
- Benbow, U., Brinckerhoff, C.E., 1997.** The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biol.* **15**, 519–526. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(97\)90026-3](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(97)90026-3)
- Bencsik, P., Bartekova, M., Görbe, A., Kiss, K., Pálóczi, J., Radosinska, J., Ferdinandy, P., 2017.** MMP Activity Detection in Zymograms. *Methods Mol. Biol.* **1626**, 53–70. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4>
- Bergmann, U., Michaelis, J., Oberhoff, R., Knäuper, V., Beckmann, R., Tschesche, H., 1989.** Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) for the Quantitative Determination of Human Leukocyte Collagenase and Gelatinase. *Clin Chem Clin Biochem* **27**, 351–359.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A., 1993.** Matrix metalloproteinases: A review, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine.* <https://doi.org/10.1177/10454411930040020401>
- Björklund, M., Koivunen, E., 2005.** Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1755**, 37–69. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.03.001>
- Bode, W., Fernandez-catalan, C., Tschesche, H., Grams, F., Nagase, H., Maskos, K., 1999.** Structural properties of matrix metalloproteinases. *C. Cell. Mol. Life Sci* **55**, 639–652.
- Bourguet, E., Hornebeck, W., Sapi, J., Moroy, G., 2012.** Pharmacomodulation of Broad Spectrum Matrix Metalloproteinase Inhibitors Towards Regulation of Gelatinases. *Enzym. Inhib. BIOAPPLICATION* 58–84. <https://doi.org/10.5772/35412>
- Brown, P.D., Levy, A.T., Margulies, I.M.K., Liotta, L.A., Stetler-stevenson, W.G., 1990.** Independent Expression and Cellular Processing of Mr 72 , 000 Type IV Collagenase and Interstitial Collagenase in Human Tumorigenic Cell Lines Independent Expression and Cellular Processing of Mr 72 , 000 Type IV Collagenase. *CANCER Res.* **50**, 6184–6191.

C

- Cauwe, B., Martens, E., Sagaert, X., Dillen, C., Geurts, N., Li, S., Mertens, J., Thijs, G., Steen, P.E. Van den, Heremans, H., Vos, R. De, Blockmans, D., Arnold, B., Opdenakker, G., 2011.** Deficiency of gelatinase B / MMP-9 aggravates lpr -induced lymphoproliferation and lupus-like systemic autoimmune disease. *J. Autoimmun.* **36**, 239–252. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.02.002>
- Chantrain, C., DeClerck, Y.A., 2002.** Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Med sci* **18**, 565–575. <https://doi.org/10.1051/medsci/2002185565>.Les
- Cheng, X.C., Fang, H., Xu, W.F., 2008.** Advances in assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **23**, 154–167. <https://doi.org/10.1080/14756360701511292>
- Chhabra, A., Vibha, R., 2018.** Gel-Based Gelatin Zymography to Examine Matrix Metalloproteinase Activity in Cell Culture. *Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **1731**, 83–96.
- Clark, I.M., Wright, J.K., Cawston, T.E., Hazleman, B.L., 1992.** Monoclonal antibodies against human fibroblast collagenase and the design of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure total collagenase. *Matrix* **12**, 475–480. [https://doi.org/10.1016/S0934-8832\(11\)80092-2](https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80092-2)
- Crowe, D.L., Brown, T.N., 1999.** Transcriptional Inhibition of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) Activity by a c-fos/Estrogen Receptor Fusion Protein is Mediated by the Proximal AP-1 Site of the MMP-9 Promoter and Correlates with Reduced Tumor Cell Invasion. *Neoplasia* **1**, 368–372. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900041>

D

- DeClerck, Y.A., 2000.** Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur. J. Cancer* **36**, 1258–1268. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00094-0](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00094-0)
- Deryugina, E.I., Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T.I., Discipio, R., Smith, J.W., Strongin, A.Y., 2001.** MT1-MMP Initiates Activation of pro-MMP-2 and Integrin $\alpha v \beta 3$ Promotes Maturation of MMP-2 in Breast Carcinoma Cells. *Exp. Cell Res.* **263**, 209–223. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5118>
- Diaz, N., Suarez, D., 2007.** Molecular dynamics simulations of matrix metalloproteinase 2: Role of the structural metal ions. *Biochemistry* **46**, 8943–8952. <https://doi.org/10.1021/Bi700541p>
- Docherty, A.J.P., O'Connell, J., Crabbe, T., Angal, S., Murphy, G., 1992.** The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotechnol.* **10**, 200–207. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(92\)90214-G](https://doi.org/10.1016/0167-7799(92)90214-G)
- Dorman, G., Cseh, S., Hajdu, I., Barna, L., Konya, D., Kupai, K., Kovacs, L., Ferdinandy, P., 2010.** Matrix Metalloproteinase Inhibitors A Critical Appraisal of Design Principles and Proposed Therapeutic Utility. *Drugs* **70**, 949–964.

E

- Elkins, P.A., Yen, S.H., Smith, W.W., Janson, C.A., D'Alessio, K.J., McQueney, M.S., Cummings, M.D., Romanic, A.M., 2002.** Structure of the C-terminally truncated human ProMMP9, a gelatin-binding matrix metalloproteinase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1182–1192. <https://doi.org/10.1107/S0907444902007849>
- Emonard, H., Bellon, G., Diesbach, P. De, Mettlen, M., 2005.** Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an “ old friend ” **87**, 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.013>
- Engvall, E., 2010.** The ELISA , Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Chem.* **56**, 319–320. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127803>

F

- Fanjul, M., Alicia, F., Sandra, R.F., CarlosLópez-Otín, C., 2010.** Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *BBA- Mol. Cell Res.* **1803**, 3–19.
- Franco, C., Patricia, H., Timo, S., Claudia, B., Marcela, H., 2017.** Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Mol. Sci.* **18**, 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms18020440>
- Frankowski, H., Gu, Y.-H., Heo, J.H., Milner, R., Zoppo, G.J. del, 2012.** Use of Gel Zymography to Examine Matrix Metalloproteinase (Gelatinase) Expression in Brain Tissue or in Primary Glial Cultures. *Methods Protoc. Methods Mol. Biol.* **814**, 221–233. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0>
- Freise, C., Erben, U., Muche, M., Farndale, R., Zeitz, M., Somasundaram, R., Ruehl, M., 2009.** The alpha 2 chain of collagen type VI sequesters latent proforms of matrix-metalloproteinases and modulates their activation and activity. *Matrix Biol.* **28**, 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.08.001>
- Fridman, R., Toth, M., Chvyrkova, I., Meroueh, S.O., Mobashery, S., 2003.** Cell surface association of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B). *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 153–166.

G

- Galasso, O., Familiari, F., Gori, M. De, Gasparini, G., 2012.** Recent Findings on the Role of Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Osteoarthritis. *Adv. Orthop.* **2012**, 7. <https://doi.org/10.1155/2012/834208>
- Gehrmann, M.L., Douglas, J.T., Tordai, H., Llina, M., 2004.** Modular Autonomy, Ligand Specificity, and Functional Cooperativity of the Three In-tandem Fibronectin Type II Repeats from Human Matrix Metalloproteinase. *Biol. Chem.* **279**, 46921–46929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408859200>

- Gialeli, C., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K., 2011.** Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* **278**, 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x>
- Gioia, M., Monaco, S., Fasciglione, G.F., Coletti, A., Modesti, A., Marini, S., Coletta, M., 2007.** Characterization of the Mechanisms by which Gelatinase A, Neutrophil Collagenase, and Membrane-Type Metalloproteinase MMP-14 Recognize Collagen I and Enzymatically Process the Two α -Chains. *J. Mol. Biol.* **368**, 1101–1113. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.076>
- Giral, P., Bruckert, E., Chapman, M.J., 2003.** Métalloprotéases matricielles et athérosclérose. *Perspectives thérapeutiques* **61**, 147–58.
- Gomiz-Rüth, F.X., 2009.** Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J. Biol. Chem.* **284**, 15353–15357. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800069200>
- Gonçalves, F.M., Jacob-ferreira, A.L.B., Gomes, V.A., Casella-filho, A., Chagas, A.C.P., Marcaccini, A.M., Gerlach, R.F., Tanus-santos, J.E., 2009.** Increased circulating levels of matrix metalloproteinase (MMP) -8, MMP-9, and pro-inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Clin. Chim. Acta* **403**, 173–177. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.02.013>

H

- Hahn-Dantona, E., Ruiz, J.F., Bornstein, P., Strickland, D.K., 2001.** The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Levels of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) by Mediating Its Cellular Catabolism. *J. Biol. Chem.* **276**, 15498–15503. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100121200>
- Hao, J.L., Nagano, T., Nakamura, M., Kumagai, N., Mishima, H., Nishida, T., 1999.** Effect of Galardin on collagen degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp. Eye Res.* **69**, 595–601. <https://doi.org/10.1006/exer.1999.0755>
- Harrison, M., Abu-Elmagd, M., Grocott, T., Yates, C., Gavrilovic, J., Wheeler, G.N., 2004.** Matrix metalloproteinase genes in *Xenopus* development. *Dev. Dyn.* **231**, 214–220. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20113>
- Herszényi, L., Hritz, I., Lakatos, G., Varga, M.Z., Tulassay, Z., 2012.** The Behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 13240–13263. <https://doi.org/10.3390/ijms131013240>
- Hu, X., Beeton, C., 2010.** Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *J. Vis. Exp.* **45**, 1–5. <https://doi.org/10.3791/2445>
- Hujanen, E. s., Vaisanen, A., Zheng, A., Tryggvason, K., Turpeenniemi-HUJANE, T., 1994.** Modulation of Mr 72,000 and Mr 92,000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. *Int. J. Cancer* **58**, 582–586. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910580422>
- Hyun-Jeong Ra, W.C.P., 2007.** Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *matrix Biol.* **26**, 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.07.001>

J

- Jaiswal, A., Chhabra, A., Malhotra, U., Kohli, S., Rani, V., 2011.** Comparative analysis of human matrix metalloproteinases: Emerging therapeutic targets in diseases. *Bioinformatics* **6**, 23–30. <https://doi.org/10.6026/97320630006023>
- JEAN, P.L.S., ZHANG, X.C., HART, B.K., LAMLUM, H., WEBSTER, M.W., STEED, D.L., HENNEY, A.M., FERRELL, R.E., 1995.** Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene (CLG4B), localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease. *Ann. Hum. Genet.* **59**, 17–24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1995.tb01602.x>
- Johnson, J.L., Dwivedi, A., Somerville, M., George, S.J., Newby, A.C., 2011.** Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.225623>

K

- Kessenbrock, K., Plaks, V., Werb, Z., 2010.** Matrix Metalloproteinases : Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell* **141**, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015>
- Khoury, M., Giral, P., Chapman, J., Beaudoux, J., 2006.** Le système MMP/TIMP : une cible thérapeutique de l'athérosclérose ? *Sang Thromb. Vaiss.* **18**, 247–256.
- Klein, T., Bischoff, R., 2011.** Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* **41**, 271–290. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0689-x>
- Krizkova, S., Zitka, O., Adam, V., Kizek, R., Masarik, M., Stiborova, M., Eckschlager, T., Chavis, G.J., 2011.** Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **30**, 1819–1832. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.016>
- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T., Ferdinandy, P., 2010.** Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **61**, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.011>

L

- Leber, T.M., Balkwill, F.R., 1997.** Zymography : A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels **1 28**, 24–28.
- Leco, K.J., Harvey, M.B., Hogan, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Edwards, D.R., Schultz, G.A., 1997.** Matrix metalloproteinase-9 maps to the distal end of chromosome 2 in the mouse. *Dev. Genet.* **21**, 55–60. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1997\)21:1<55::AID-DVG6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1997)21:1<55::AID-DVG6>3.0.CO;2-7)
- Lindsey, M.L., Goshorn, D.K., Squires, C.E., Escobar, G.P., Hendrick, J.W., Mingoia, J.T., Sweterlitsch, S.E., Spinale, F.G., 2005.** Age-dependent changes in myocardial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase profiles and fibroblast function. *Cardiovasc. Res.* **66**, 410–419.

<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.029>

Liu, Y., Liu, Q., Hu, Z., Shen, Q., Liang, H., Jiang, X., 2014. Resveratrol attenuated homocysteine-induced apoptosis of rat ventricular myocytes. *Int. J. Cardiol.* **177**, 298–300. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.09.033>

Lombard, C., Saulnier, J., Wallach, J., 2005. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: A review. *Biochimie* **87**, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.01.007>

M

Maeda, H., Okamoto, T., Akaike, T., 1998. Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol. Chem.* **379**, 193–200. <https://doi.org/10.1515/bchm.1998.379.2.193>

Malla, N., Sjøli, S., Winberg, J.O., Hadler-Olsen, E., Uhlin-Hansen, L., 2008. Biological and pathobiological functions of gelatinase dimers and complexes. *Connect. Tissue Res.* **49**, 180–184. <https://doi.org/10.1080/03008200802151755>

Mannello, F., Medda, V., 2012. Nuclear localization of Matrix metalloproteinases. *Prog. Histochem. Cytochem.* **47**, 27–58. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2011.12.002>

MARTÍNEZ, A., OH, H.-R., UNSWORTH, E.J., BREGONZIO, C., SAAVEDRA, J.M., STETLER-STEVENSON, W.G., CUTTITTA, F., 2004. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem. J.* **383**, 413–418. <https://doi.org/10.1042/BJ20040920>

Mccarty, S.M., Cochrane, C.A., Clegg, P.D., Percival, S.L., 2012. The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds : A focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound Rep Reg* **20**, 125–136. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00763.x>

Mcquibban, G.A., Gong, J.-H., Wong, J.P., Wallace, J.L., Clark-Lewis, I., Overall, C.M., 2002. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood* **100**, 1160–1167. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1810>

Miriam, F., Fernández, A., R.Folgueras, Sandra, C., CarloS, L., Otín, 2010. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1803**, 3–19.

Mittal, B., Mishra, A., Srivastava, A., Kumar, S., Garg, N., 2014. Matrix Metalloproteinases in Coronary Artery Disease, 1st ed, *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800263-6.00001-X>

Monferran, S., Paupert, J., Dauvillier, S., Salles, B., Muller, C., 2004. The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J.* **23**, 3758–3768. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600403>

Murphy, G., Nagase, H., 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* **29**, 290–308. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>

N

- Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., 2006.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* **69**, 562–573.
- Nelissen, I., Vandebroek, K., Fiten, P., Hillert, J., Olsson, T., Marrosu, M.G., Opdenakker, G., 2000.** Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not a susceptibility factor for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **105**, 58–63.
- Newby, A.C., 2005.** Dual Role of Matrix Metalloproteinases (Matrixins) in Intimal Thickening and Atherosclerotic Plaque Rupture. *Physiol Rev* **85**, 1–31. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2003>.
- Nguyen, M., 2000.** Activated Protein C Directly Activates Human Endothelial Gelatinase A. *J. Biol. Chem.* **275**, 9095–9098. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9095>

O

- Othmani Mecif, K., Aouichat Bouguerra, S., Benazzoug, Y., 2017.** Plasma and Aorta Biochemistry and MMPs Activities in Female Rabbit Fed Methionine Enriched Diet and Their Offspring. *J. Nutr. Metab.* 2017, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2017/2785142>
- Overall, C.M., 2002.** Molecular Determinants of Metalloproteinase Substrate Specificity: Matrix Metalloproteinase Substrate Binding Domains, Modules, and Exosites. *Mol. Biotechnol.* **22**, 051–086. <https://doi.org/10.1385/MB:22:1:051>

P

- Pittayapruek, P., Meephanan, J., Prapapan, O., Komine, M., Ohtsuki, M., 2016.** Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci* **17**, 868.
- Plumpton, T.A., Clark, I.M., Plumpton, C., Calvin, J., Cawston, T.E., 1995.** Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure total TIMP-1 (Free TIMP-1 and TIMP-1 in combination with matrix-metalloproteinases) and measurement of TIMP 1 and CRP in serum. *Clin. Chim. Acta* **240**, 137–154. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(95\)06137-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(95)06137-7)
- Price, S.J., Greaves, D.R., Price, S.J., Greaves, D.R., Watkins, H., 2001.** Identification of Novel , Functional Genetic Variants in the Human Matrix Metalloproteinase-2 Gene : ROLE OF Sp1 TRANSCRIPTIONAL REGULATION . *Biol. Chem.* **276**, 7549–7558. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010242200>

Q

Qin, H., Sun, Y., Benveniste, E.N., 1999. The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 29130–29137. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29130>

R

Raaf, L., Noll, C., Cherifi, M.E.H., Claude, J.S., Delabar, D.J., Benazzoug, Y., Janel, N., 2011. Myocardial fibrosis and TGFB expression in hyperhomocysteinemic rats. *Mol cell Biochem* **347**, 63–70. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0612-5>

Rangaswami, H., Bulbule, A., Kundu, G.C., 2004. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/I κ B Kinase-dependent Kinase-dependent nuclear factor κ B-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J. Biol. Chem.* **279**, 38921–38935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404674200>

Rannou, F., François, M., Corvol, M.T., Berenbaum, F., 2005. Dégradation du cartilage et polyarthrite rhumatoïde. *Rev. du Rhum. (Edition Fr.)* **72**, 322–330. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2004.12.021>

Rao, V.H., Lees, G.E., Kashtan, C.E., Nemori, R., Singh, R.K., Meehan, D.T., Rodgers, K., Berridge, B.R., Bhattacharya, G., Cosgrove, D., 2003. Increased expression of MMP-2, MMP-9 (type IV collagenases/gelatinases), and MT1-MMP in canine X-linked Alport syndrome (XLAS). *Kidney Int.* **63**, 1736–1748. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00939.x>

Ribeiro-fleury, T., 2010. Évaluation in Vitro De La Fonction Hématopoïétique Des Cellules Souches Mésoenchymateuses Médullaires Au Cours De Leur Différenciation.

Ricci, S., D'Esposito, V., Oriente, F., Formisano, P., Carlo, A. Di, 2016. Substrate-zymography: A still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. *Clin. Chem. Lab. Med.* **54**, 1281–1290. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0668>

Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis.

Romi, F., Helgeland, G., Gilhus, N.E., 2012. Serum Levels of Matrix Metalloproteinases: Implications in Clinical Neurology. *Eur Neurol* **67**, 121–128. <https://doi.org/10.1159/000334862>

S

Sato, H., Seiki, M., 1993. Regulatory mechanisms of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness in tumor cells. *Oncogene* **8**, 395–405.

Shapiro, S., Khodalev, O., Bitterman, H., Auslender, R., Lahat, N., 2010. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C942–51. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00305.2009>

Singh, R.K., Gutman, M., Reich, R., Bar-eli, M., 1995. Ultraviolet B Irradiation Promotes Tumorigenic and Metastatic Properties in Primary Cutaneous Melanoma via Induction of Interleukin 8 Ultraviolet B Irradiation Promotes Tumorigenic and Metastatic Properties in Primary Cutaneous Melanoma via Induction of I. *Cancer Res.* **55**, 3669–3674.

T

Tallant, C., Marrero, A., Gomis-rüth, F.X., 2010. Matrix metalloproteinases : Fold and function of their catalytic domains. *BBA - Mol. Cell Res.* **1803**, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.04.003>

Talvensaari-mattila, A., Santala, M., Soini, Y., Turpeenniemi-Hujanen, T., 2005. Prognostic Value of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Expression in Endometrial Endometrioid Adenocarcinoma. *Anticancer Res.* **25**, 4101–4105.

Tatsuguchi, A., Fukuda, Y., Ishizaki, M., Yamanaka, N., 1999. Localization of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 in Normal Human and Rabbit Stomachs. *Digestion* **0022**, 246–254.

Tocchi, A., Parks, W.C., 2013. Functional interactions between matrix metalloproteinases and glycosaminoglycans. *FEBS* **280**, 2332–2341. <https://doi.org/10.1111/febs.12198>

Toth, M., Fridman, R., 2013. assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. *methods mol biol* **57**, 1–10. <https://doi.org/10.1385/1-59259-136-1>

Turner, N.A., Porter, K.E., 2012. Regulation of Myocardial Matrix Metalloproteinase Expression and Activity by Cardiac Fibroblasts. *IUBMB Life* **64**, 143–150. <https://doi.org/10.1002/iub.594>

V

Van Den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G., 2002. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* <https://doi.org/10.1080/10409230290771546>

Van den Steen, P.E., Opdenakker, G., Wormald, M.R., Dwek, R.A., Rudd, P.M., 2001. Matrix remodelling enzymes, the protease cascade and glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta- Gen. Subj.* **1528**, 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00190-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00190-8)

Van Den Steen, P.E., Van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S.K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M.R., Wallis, R., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G., 2006. The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J. Biol. Chem.* **281**, 18626–18637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512308200>

Vandooren, J., Van Den Steen, P.E., Opdenakker, G., 2013. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 222–272. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.770819>

- Vihinen, P., Ala-aho, R., Kahari, V.M., 2005.** Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* **5**, 203–220. <https://doi.org/10.1002/art.497>
- Visse, R., Nagase, H., 2003.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827–839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>

Y

- Yabluchanskiy, A., Ma, Y., Iyer, R.P., Hall, M.E., Lindsey, M.L., 2013.** Matrix Metalloproteinase-9 : Many Shades of Function in Cardiovascular Disease REVIEWS Matrix Metalloproteinase-9 : Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *PHYSIOLOGY* **28**, 391–403. <https://doi.org/10.1152/physiol.00029.2013>
- Yan, C., Boyd, D.D., 2006.** Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression. *Cell. Physiol.* 19–26. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Yang, Z., Strickland, D.K., Bornstein, P., 2001.** Extracellular Matrix Metalloproteinase 2 Levels Are Regulated by the Low Density Lipoprotein-related Scavenger Receptor and Thrombospondin 2 *. *J. Biol. Chem.* **276**, 8403–8408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008925200>
- Yazdan-Ashoori, P., Liaw, P., Toltl, L., Webb, B., Kilmer, G., Carter, D.E., Fraser, D.D., 2011.** Elevated plasma matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with severe sepsis. *J. Crit. Care* **26**, 556–565. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.01.008>
- Yoshioka, H., Oyamada, I., Usuku, G., 1987.** An assay of collagenase activity using enzyme-linked immunosorbent assay for mammalian collagenase. *Anal. Biochem.* **166**, 172–177. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90559-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90559-8)
- Yu, M., Sato, H., Seiki, M., 1995.** Complex Regulation of Membrane-Type Matrix Metalloproteinase Expression and Matrix Metalloproteinase-2 Activation by Concanavalin A in MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells. *CANCER Res.* **55**, 3272–3277.
- Yu, Q., Stamenkovic, I., 2000.** Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* **14**, 163–176.

Z

- Zhang, B., Ye, S., Herrmann, S., Eriksson, P., Maat, M. De, Evans, A., Arveiler, D., Hamsten, A., Watkins, H., Henney, A.M., 1999.** Functional Polymorphism in the Regulatory Region of Gelatinase B Gene in Relation to Severity of Coronary Atherosclerosis. *Calif. DIG LIB* 1788–1795.
- Zhang, Y., Chen, Q., 2017.** Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer **50**, 6–13. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176104>

Zhang, Y., George, J., Li, Y., Olufade, R., Zhao, X., 2015. Matrix metalloproteinase-9 expression is enhanced in renal parietal epithelial cells of Zucker diabetic fatty rats and is induced by albumin in in vitro primary parietal cell culture. *PLoS One* **10**, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123276>

Zinzindohoué, F., Lecomte, T., Laurent-Puig, P., 2005. Matrix metalloproteinases and gastrointestinal tract cancers. *Gastroentérologie Clin. Biol.* **29**, 1–8.

Index

Index des figures

Figure 01 : Classification des MMPs	03
Figure 02 : Différents fonctions des gélatinases	05
Figure 03 : Structure des gélatinases	06
Figure 04 : Structure de fibronectine de type II de MMP-2	07
Figure 05 : Structure de domaine catalytique de MMP-2	08
Figure 06 : facteurs de transcription localisés au sein de promoteur de gène de MMP-2	10
Figure 07 : Mode d'activation de MMP-2 par la MT-MMP de type I et de TIMP-2	11
Figure 08 : facteur de transcription localisé au sien de promoteur de gène de MMP-9	12
Figure 09 : Régulation d'expression de MMP-9	13
Figure 10 : Mécanismes d'activation des MMP conduisant à la protéolyse de la matrice extracellulaire,	14
Figure 11 : Rôle des MMPs dans l'invasion tumorale	15
Figure 12 : Principe d'électrophorèse d'après	16
Figure 13 : Modèle des souris NMRI	19
Figure 14 : Prise du sang	21
Figure 15 : Sacrifice de l'animale et prélèvent des organes	22
Figure 16 : Les étapes d'échantillonnage	22
Figure 17 : Dilution des échantillons par cascade	23
Figure 18 : Coulage des plaques	23
Figure 19 : Coulage de gel.	25
Figure 20 : Migration électrophoritique	25
Figure 21 : Lavage et renaturation de gel	26
Figure 22 : Incubation de gel dans un bain marrie	26
Figure 23 : Coloration et décoloration de gel	27
Figure 24 : Analyse et quantification de gel	27
Figure 25 : Zymogramme des gélatinases au niveau du rein	29
Figure 26 : Zymogramme de la gélatinase B du rein	30
Figure 27 : L'intensité des bandes de gélatinase B en fonction de la dilution dans l'homogénat rénal	31

Figure 28 : Coefficient de détermination pour la MMP-9 et la pro-MMP-9 au niveau du rein.	31
Figure 29 : Variation de l'intensité des bandes entre MMP-9 et Pro-MMP-9 en fonction de la dilution	32
Figure 30 : zymogramme de la gélatinase A au niveau du rein	32
Figure 31 : L'intensité des bandes de la gélatinase A en fonction de la dilution dans l'homogénat rénal	33
Figure 32 : Coefficient de détermination de MMP-2 et pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau du rein	33
Figure 33 : Variations d'activité enzymatique de MMP-2 par apport à la pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau du rein	34
Figure 34 : Zymogramme des gélatinases A et B au niveau de plasma	35
Figure 35 : Zymogramme de gélatinase B au niveau de plasma	35
Figure 36 : L'intensité des bandes de la gélatinase A en fonction de différentes dilutions du plasma	36
Figure 37 : Coefficient de détermination de MMP-2 et pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau du plasma.	37
Figure 38 : Variations d'activité enzymatique de MMP-9 par apport à la pro-MMP-9 en fonction de la dilution au niveau de plasma.	37
Figure 39 : Zymogramme de gélatinase A au niveau de plasma	38
Figure 40 : L'intensité des bandes de la gélatinase A en fonction de différentes dilutions du plasma	39
Figure 41 : Coefficient de détermination de MMP-2 et de pro-MMP-2 du plasma	39
Figure 42 : Variations d'activité enzymatique de MMP-2 par apport à la pro-MMP-2 en fonction de la dilution au niveau de plasma	40

Index des tableaux

Tableau 01 : Intensité des bandes de la gélatinase B au niveau rénal mesuré par l'imag-j	30
Tableau 02 : Taux de MMP9 et Pro-MMP9 dans le rein	32
Tableau 03 : Intensité des bandes de gélatinase A mesuré par l'imag-j	33
Tableau 04 : Taux de MMP2 et Pro-MMP2 dans le rein	34
Tableau 05 : Intensité des bandes de gélatinase B au niveau plasmatique mesurée par l'imag-j	36
Tableau 06 : Taux de MMP9 et Pro-MMP9 dans le plasma	38
Tableau 07 : Intensité des bandes de gélatinase A au niveau plasmatique mesurée par l'imag-j	38
Tableau 08 : Taux de MMP2 et Pro-MMP2 dans le plasma	40
Tableau 09 : Taux des gélatinases A et B dans le plasma et le rein.	40

Annexe

Fiches techniques

1. Réactifs :

1.1. Tampon Tris 1.5 M pH = 8.8 pour gel de séparation (100 mL) :

Réactif	Masse Moléculaire (g.mol ⁻¹)	Masse/Volume	Concentration finale
Tris	121.14	18.21 g	1.5 M
Eau distillée	-	80 mL	-

- ✓ Dissoudre, ajuster le pH à 8.8 avec de l'HCl fumant puis compléter le volume avec l'eau distillée jusqu'à 100 mL.
- ✓ Conserver dans le frigo.

1.2. Tampon Tris 0.5 M pH = 6.8 pour le gel de concentration (100 mL) :

Réactif	Masse Moléculaire (g.mol ⁻¹)	Masse/Volume	Concentration finale
Tris	121.14	6 g	0.5 M
Eau distillée	-	80 mL	-

- ✓ Dissoudre, ajuster le pH à 6.8 avec de l'HCl fumant puis compléter le volume avec l'eau distillé jusqu'à 100 mL.
- ✓ Conserver dans le frigo.

1.3. Acrylamide 30% / bisacrylamide 0,8% :

- ✓ Dissoudre 30g d'acrylamide et 0,8 g de bisacrylamide dans 100 ml d'eau distillé.
- ✓ Conserver dans le frigo.

1.4. Tampon d'électrophorèse (5X) pH = 8.3 (1L) :

Réactifs	Masse Moléculaire (g.mol ⁻¹)	Masse/Volume	Concentration finale
Tris	121.14	15.15 g	125 mM
Glycine	75.07	72 g	960 mM
SDS	288.38	5 g	0.5 %
Eau distillée	-	800 mL	-

- ✓ Dissoudre, ajuster le pH à 8.3 avec de l'HCl fumant puis compléter le volume avec l'eau distillée jusqu'à 1L
- ✓ Conserver dans le frigo.
- ✓ Pour préparer le tampon d'électrophorèse 1X (140 mL de tampon 5X + 560 mL d'H₂O distillée).

1.5. Persulfate d'ammonium à 10% :

10mg de persulfate d'ammonium + 1ml d'eau distillée

Préparation fraîche

1.6. Solution de gélatine :

100mg gélatine + 4,5mL d'eau distillée (chauffage jusqu'à dissolution totale)

Ajouter 0,5 mL de persulfate d'ammonium à 10%.

1.7. Tampon d'échantillon :

Réactifs	Concentration finale	Masse (g)	Volume (mL)
Tris 0,5 M pH 6,8	0,0625 M	-	1,25 mL
SDS	4 %	0,4 g	-
Glycérol	25 %	-	2,5 mL
Bleu de bromophénol	0,01%	0,001g	-
Eau distillée	-	-	Qsp 10 mL

1.8. Triton X-100 à 2,5% :

- 25 mL de Triton X-100
- 1000 mL d'eau distillée

1.9. Tampon d'incubation :

- 8,766 g NaCl
- 1,47g CaCl₂*2H₂O
- 6,057 g Tris base
- 0,5 g NaN₃
- 1000 mL d'eau distillée

Ajuster le pH 7,8 - 8.0 par HCl.

1.10. Solution de coloration (Blue de Coomassie Brilliant à 0,05%) :

- 250 mg Blue de Coomassie Brilliant G-250
- 125 mL méthanol
- 50 mL acide acétique glacial
- 325 mL d'eau distillée

1.11. Solution de décoloration :



- 40 mL méthanol
- 80 mL acide acétique
- 880 mL d'eau distillée

1.12. Tampon d'homogénéisation :

- 0,335 g Tris base
- 1 mL Triton
- 500 mL d'eau distillée

Ajuster le pH à 7.4 par 1 M HCl.

2. Produits :


Produits	Informations commerciales	Image
Acide acétique	<ul style="list-style-type: none"> • Code: 2005807 • Compagnie: FLUKA • Lieu de fabrication: Germany 	
Acide acétique glaciale	<ul style="list-style-type: none"> • Code: 101122500 • Compagnie: Biochem chemopharma • Lieu de fabrication: 	

	France	
Acrylamide	<ul style="list-style-type: none">• Code: 501050500• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: Montreal Quelaec	
Azoture de sodiume	<ul style="list-style-type: none">• Cod: 26628-22-8• Compagnie: CNESST• Lieu de fabrication: EC	
Bisacrylamide	<ul style="list-style-type: none">• Code: 101309735• Compagnie: SUGMA- ALDRICH• Lieu de fabrication: USA	

Blue de coomassie	<ul style="list-style-type: none">• Code: 403110025• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: France	
CaCl ₂	<ul style="list-style-type: none">• Code: 110.99• Campagne: MERCK• Lieu de fabrication: GERMANY	
Chlorophorme	<ul style="list-style-type: none">• Code: 220222500• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: France	
HCl	<ul style="list-style-type: none">• Code: 125002500• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: France	

Gélatine	<ul style="list-style-type: none">• Code: 24350.2662• Compagnie: VWR PROLABO• Lieu de fabrication: EC	
Glycerol	<ul style="list-style-type: none">• Code: 201061000• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: Tortola-bvi-unuted Kingdon	
Glycine	<ul style="list-style-type: none">• Code: 500460100• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: Montereal Quelac	
Méthanol	<ul style="list-style-type: none">• Code: 20837320• Compagnie: VWR PROLABO• Lieu de fabrication: EC	

SDS	<ul style="list-style-type: none">• Code: 04640145• Compagnie: SIGMA-ALDRICH• Lieu de fabrication: China	
Sodium chloride	<ul style="list-style-type: none">• Code: 319120500• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: France	
TEMED	<ul style="list-style-type: none">• Cod: 147959300• Compagnie: BIO- RAD• Lieu de fabrication: France	
Triton X100	<ul style="list-style-type: none">• Code: 318550500• Compagnie: Biochem chemopharma• Lie de fabrication: France	

<p>Tris</p>	<ul style="list-style-type: none">• Code: 520000100• Compagnie: Biochem chemopharma• Lieu de fabrication: Gergia-USA	
-------------	--	---