

# Construction des réseaux d'interactions extracellulaires : les réseaux de l'endostatine

Romain Salza

► **To cite this version:**

Romain Salza. Construction des réseaux d'interactions extracellulaires : les réseaux de l'endostatine. Biologie cellulaire. 2011. <hal-01482303>

**HAL Id: hal-01482303**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01482303>**

Submitted on 3 Mar 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE**

**ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

Sciences de la Vie et de la Terre

**MÉMOIRE**

Présenté par

**Romain SALZA**

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Construction des réseaux d'interactions extracellulaires :  
les réseaux de l'endostatine**

Soutenu le 2 septembre 2011 devant le jury suivant :

<b>Dr Marie-Madeleine Giraud-Guille</b>	<b>Président</b>
<b>Dr Jean-Claude Monboisse</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr Emmanuel Belamie</b>	<b>Examineur</b>
<b>Prof. Sylvie Ricard-Blum</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr Nicole Thielens</b>	<b>Examineur</b>

Mémoire préparé sous la direction  
du *Professeur Sylvie Ricard-Blum* Equipe Interactions Hôte Pathogène à  
l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Bases Moléculaires et  
Structurales des Systèmes Infectieux, UMR 5086 CNRS - Université Lyon 1  
Directeur : G. Deléage.

@mail : s.ricard-blum@ibcp.fr  
et du

*Dr Emmanuel Belamie*

Laboratoire "Matériaux du Vivant et Vectorisation" de l'École Pratique des  
Hautes Etudes UMR 7574. Directrice : Marie-Madeleine Giraud-Guille.

@mail : Emmanuel.belamie@enscm.fr

# ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

## Construction des réseaux d'interactions extracellulaires : les réseaux de l'endostatine *Romain Salza*

### RÉSUMÉ

Des réseaux d'interactions ont été établis à grande échelle dans des organismes modèles et des micro-organismes afin d'étudier leur comportement global. Dans la majorité des cas, les méthodes mises en œuvre détectent les interactions impliquant des protéines intracellulaires ou membranaires. La matrice extracellulaire possède une architecture impliquant des protéines et des glycosaminoglycanes qui jouent un rôle important dans son organisation structurale et fonctionnelle. L'équipe a mis au point des outils pour étudier les interactions protéine-protéine et protéine- glycosaminoglycane, notamment des puces à protéines et glycosaminoglycanes ainsi qu'une base de données (MatrixDB : <http://matrixdb.ibcp.fr>) permettant de stocker les interactions établies par les molécules extracellulaires et de construire des interactomes (Chautard *et al.*, 2009 et 2011).

L'endostatine, sur laquelle a porté l'essentiel de ce travail, est le fragment C-terminal du collagène XVIII. Cette matricryptine exprimée par les neurones a été mise en évidence dans les dépôts amyloïdes de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Deininger *et al.*, 2002). Nous avons montré qu'elle interagit avec plusieurs protéines extracellulaires impliquées dans des pathologies neuro-dégénératives comme la transglutaminase-2, le collagène VI et le peptide  $\beta$ -amyloïde (Faye *et al.*, 2009a). Nous avons recherché au cours de ce travail à identifier des partenaires de l'endostatine exprimés dans le cerveau tels que les collagènes transmembranaires XIII, XVII, XXIII, XXV, les collagènes VI et VIII, les neuropilines 1 et 2 ainsi que la lysyl oxydase. Nous avons construit les vecteurs d'expression de ces protéines (à l'exception de celui du collagène XVII) et/ou de certains de leurs domaines. Ces protéines ont ensuite été exprimées en système eucaryote puis purifiées par chromatographie d'affinité et par filtration sur gel dans certains cas.

Ces protéines ainsi que d'autres protéines et glycosaminoglycanes commercialement disponibles ont été déposés sur des puces d'or utilisées pour identifier les interactions par résonance plasmonique de surface en mode imagerie (SPRi). Nous avons identifié plus d'une centaine d'interactions établies par l'endostatine et certains de ses partenaires qui contribueront à augmenter la taille de l'interactome extracellulaire. Le but ultime de notre travail est en effet d'établir l'interactome quantitatif (comprenant des données cinétiques et d'affinité) de la matrice extracellulaire.

Nous nous sommes focalisés sur les partenaires communs à l'endostatine et au collagène XVII et nous étudions actuellement la fonction de ces interactions au niveau cutané, dans la jonction dermo-épidermique, dans les interactions hôte-pathogènes établies au niveau du derme lors des stades précoces de l'infection par des pathogènes tels que les *Leishmania*. La mise en évidence d'interactions supplémentaires de l'endostatine avec des protéines exprimées dans le cerveau, et pour certaines d'entre elles impliquées dans les pathologies neuro-dégénératives, nous ont conduit à rechercher la présence de l'endostatine dans le liquide céphalo-rachidien. Nous avons détecté l'endostatine dans le liquide céphalo-rachidien et observé une augmentation du rapport endostatine/peptide amyloïde- $\beta$  (67%,  $p < 0,05$ ) et une diminution du rapport endostatine/protéine tau (68%,  $p < 0,01$ ) chez les patients

atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux contrôles. Ces rapports pourraient constituer des marqueurs de diagnostic intéressants de cette maladie neuro-dégénérative.

**MOTS-CLÉS :** Réseaux d'interactions - Matrice extracellulaire - Résonance plasmonique de surface - Puces à protéines et à glycosaminoglycanes.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>3</b>
<b>1. La matrice extracellulaire</b>	<b>3</b>
<b>2. Les matricryptines et les matrikines</b>	<b>4</b>
<b>3. L'endostatine, une matricryptine du collagène XVIII</b>	<b>5</b>
<b>4. Le collagène XVII, un collagène transmembranaire</b>	<b>6</b>
<b>5. Les réseaux d'interactions extracellulaires</b>	<b>6</b>
5.1. L'interactome des fibres élastiques	6
5.2. L'interactome extracellulaire	6
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>8</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

A. /Bis A.	Acrylamide/Bis Acrylamide
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
APS	Ammonium persulfate
BCA	Bicinchoninic Acid
BM40	Basement Membrane 40
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	Charge Coupled Device
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CRL	Cytokine Receptor-Like
CS	Chondroïtine Sulfate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimide
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ES	Endostatine
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
GAG	Glycosaminoglycane
HBS	Hepes Buffered Saline
HEK	Human Embryonic Kidney
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HRP	HorseRadish Peroxidase
IBCP	Institut de Biologie et de Chimie des Protéines
Ig	Immunoglobuline
K <sub>D</sub>	Constante d'équilibre de dissociation
kDa	kiloDalton
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LOX	Lysyl Oxydase
LOXL2	Lysyl Oxydase Like-2
LRIG1 domains protein 1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like
NC1	Non Collagénique 1
NHS	N-HydroxySuccinimide
NTA	NitriloTriacetic Acid
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
p/v	poids/volume
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
ROI	Region of Interest
RU	Resonance Unit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

<b>SPARC</b> <b>(Osteonectin)</b>	<b>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</b>
<b>SPR</b>	<b>Surface Plasmon Resonance</b>
<b>SPRi</b>	<b>Surface Plasmon Resonance imaging</b>
<b>SVF</b>	<b>Sérum de Veau Fœtal</b>
<b>TBS</b>	<b>Tris Buffered Saline</b>
<b>TEM8</b>	<b>Tumor Endothelial Marker 8 (Anthrax toxin receptor)</b>
<b>TEMED</b>	<b>Tetramethylethylenediamine</b>
<b>Tris</b>	<b>Tris(hydroxyméthyl)aminométhane</b>
<b>UCBL</b>	<b>Université Claude Bernard Lyon 1</b>
<b>UMR</b>	<b>Unité Mixte de Recherche</b>
<b>VEGF</b>	<b>Vascular Endothelial Growth Factor</b>
<b>VEGF-R</b>	<b>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</b>
<b>v/v</b>	<b>Volume/volume</b>
<b>vWF</b>	<b>Von Willebrand Factor</b>
<b>wt</b>	<b>Wild Type</b>

## INTRODUCTION

Des réseaux d'interactions ont déjà été établis à grande échelle dans des organismes modèles et des micro-organismes afin d'étudier leur comportement global. Dans la majorité des cas, les méthodes de détection des interactions ont été développées pour les interactions protéine-protéine et pour des protéines membranaires ou intracellulaires. La matrice extracellulaire possède une architecture impliquant des protéines et des glycosaminoglycanes (GAG) et ces derniers jouent un rôle important dans son organisation structurale et fonctionnelle.

Notre équipe a mis au point des outils permettant d'étudier les interactions protéine-protéine et protéine-GAG au sein de la matrice extracellulaire et notamment des puces à protéines et GAG analysées par résonance plasmonique de surface en mode imagerie (SPRi). Nous avons également optimisé cette technique pour étudier de la même manière les interactions protéine-pathogènes et GAG-pathogènes.

L'équipe a créé une base de données (MatrixDB : <http://matrixdb.ibcp.fr>) permettant de stocker les interactions établies par les molécules extracellulaires et de construire des interactomes (Chautard *et al.*, 2009a et 2011). Le but ultime de notre travail est d'établir l'interactome quantitatif (comprenant donc les données cinétiques et d'affinité) de la matrice extracellulaire.

L'endostatine, qui est une matricryptine du collagène XVIII connue notamment pour ses propriétés anti-angiogénique (Folkman 2006 - Ricard-Blum, Ballut 2011), est l'une des molécules que nous étudions au laboratoire.

Nos travaux se sont majoritairement concentrés sur cette matricryptine, dont une première version de l'interactome a été publiée par l'équipe en 2009 (Faye *et al.* 2009a), pour explorer les pistes suggérées par ces premiers résultats.

Les fragments C-terminaux issus des chaînes des collagènes IV et VIII possèdent une activité anti-angiogénique et il est intéressant de déterminer s'ils sont capables d'interagir avec l'endostatine pour réguler de façon concertée le processus de l'angiogenèse. L'endostatine interagit en effet avec d'autres régulateurs de l'angiogenèse comme le récepteur 2 du VEGF (Vascular endothelial growth factor, Kim *et al.*, 2002) et l'endorépelline, une matricryptine du perlecan, un protéoglycane à héparane sulfate (Mongiat *et al.*, 2003). Il est donc intéressant d'étudier l'interaction de l'endostatine avec

d'autres molécules régulant l'angiogenèse telles que les neuropilines 1 et 2 ou le hyaluronane.

On sait que l'endostatine est associée aux fibres élastiques (Miosge *et al.*, 1999) mais il reste à déterminer si elle interagit directement avec des constituants des fibres élastiques tels que la lysyl oxydase ou la tropoélastine présentes dans la paroi des vaisseaux sanguins. Le propeptide de la lysyl oxydase possède des activités biologiques antiprolifératives (inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires) et anti-tumorales (inhibition du caractère invasif des cellules cancéreuses). Nous avons donc cherché à déterminer si l'endostatine était capable d'interagir avec la lysyl oxydase et également avec l'élastine, un composant majeur des fibres élastiques.

L'endostatine est exprimée par les neurones et a été mise en évidence dans les dépôts amyloïdes des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Deininger *et al.*, 2002). Nous avons montré qu'elle interagit avec plusieurs protéines extracellulaires impliquées dans des pathologies neuro-dégénératives comme la transglutaminase-2, le collagène VI et le peptide  $\beta$ -amyloïde (Faye *et al.*, 2009a). Nous avons donc recherché des partenaires de l'endostatine exprimés dans le cerveau (collagènes transmembranaires XIII, XVII, XXIII, XXV, neuropilines).

La mise en évidence d'interactions supplémentaires de l'endostatine avec des protéines exprimées dans le cerveau, et pour certaines d'entre elles impliquées dans les pathologies neuro-dégénératives, nous a conduit à déterminer si l'endostatine est détectable dans le liquide céphalorachidien et si son taux varie dans des pathologies neuro-dégénératives.

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### 1. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire comprend par définition tout ce qui est situé à l'extérieur des cellules dans un tissu. Elle est constituée d'un ensemble de macromolécules modulaires interagissant entre elles et avec les cellules pour conférer leur architecture, leurs propriétés mécaniques et leurs fonctions biologiques aux tissus (Frantz *et al.*, 2010). La matrice extracellulaire est une structure dynamique capable de moduler le comportement des cellules, notamment leur prolifération, leur migration, leur différenciation et leur adhésion.

Les protéines extracellulaires les plus abondantes sont les collagènes qui constituent une famille de 28 membres numérotés par des chiffres romains dans l'ordre de leur découverte (Ricard-Blum *et al.*, 2005, Ricard-Blum, 2011). Ils constituent environ 30% des protéines totales de l'organisme et contiennent tous au moins un domaine en triple hélice. Les molécules de collagène sont en effet constituées de trois chaînes polypeptidiques appelées chaînes  $\alpha$ . Les séquences formant une triple hélice consistent en la répétition du triplet Gly-X-Y, X étant fréquemment un résidu de proline et Y un résidu d'hydroxyproline. Les collagènes sont classés en plusieurs sous-groupes en fonction des assemblages supramoléculaires qu'ils forment

Les collagènes I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII s'assemblent en fibrilles. Les collagènes IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII ne forment pas de fibrilles par eux-mêmes mais s'associent à la surface des fibrilles de collagène. Ils sont désignés sous le nom de FACITs (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices) et contiennent plusieurs domaines en triple hélice, dits collagéniques, séparés par des domaines appelés non collagéniques. Le collagène XV s'associe également à la surface des fibrilles de collagène et possède la capacité de relier certaines fibrilles entre elles. Il est constitué de nombreux domaines en triple hélice séparés par des domaines non collagéniques et forme avec le collagène XVIII le sous-groupe de multiplexines. Le collagène VII forme des fibrilles d'ancrage qui contribuent à la cohésion du derme et de l'épiderme (Tzu et Marinkovich 2008). Le collagène VI, ubiquitaire, forme des filaments perlés tandis que le collagène IV est un constituant majeur des membranes basales au sein desquelles il forme un réseau tridimensionnel.

Les collagènes VIII et X sont organisés en réseaux hexagonaux. Quatre types de collagène sont membranaires, les collagènes XIII, XVII, XXIII et XXV. Le collagène XIII est situé dans les jonctions adhérentes et le collagène XVII

participe à la constitution des hémidesmosomes. Les ectodomains de ces collagènes, qui contiennent plusieurs domaines en triple hélice, sont libérés sous forme soluble par le processus de shedding (Franzke *et al.*, 2005).

Outre les collagènes la matrice extracellulaire est constituée d'élastine qui s'associe à des microfibrilles constituées de fibrillines et autres glycoprotéines pour former des fibres élastiques (Wagenseil et Mecham, 2007), des laminines, de fibronectine, des ténascines, des fibulines, des nidogènes et des protéoglycanes. Ces derniers sont constitués d'une protéine sur laquelle sont greffées de façon covalente une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes sulfatés (héparane, dermatane, kératane et chondroïtine sulfate) (Heinegard, 2009). Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides complexes linéaires composés de la répétition de disaccharides comportant une hexosamine et un acide uronique. Ils présentent une importante diversité structurale due à leur longueur variable et à leurs modifications. L'héparine est le glycosaminoglycane le plus sulfaté.

Les protéoglycanes peuvent être classés en trois catégories, les protéoglycanes membranaires (les syndécans, le neuroglycan, le bétaglycan, la neuropiline-1, le NG2, CD44) ou ancrés dans le feuillet externe de la membrane plasmique (glypicans), les protéoglycanes sécrétés (perlecan, agrécan, neurocan, les petits protéoglycanes riches en leucine, Schaefer et Iozzo, 2008) et les protéoglycanes intracellulaires comme la serglycine.

Les protéoglycanes participent à l'organisation de la matrice extracellulaire et régulent le comportement cellulaire. Ils servent également de réservoirs de facteurs de croissance et de cytokines (Rodgers *et al.*, 2008, Bishop *et al.*, 2007) et participent aux interactions hôte-pathogènes (Bartlett et Park, 2010).

Les collagènes et l'élastine sont réticulés par des pontages covalents dont la formation est initiée par une enzyme, la lysyl oxydase (Mäki, 2009). Cette enzyme est synthétisée sous forme d'un précurseur dont le propeptide est clivé lors du processus de maturation.

## **2. Les matricryptines et les matrikines**

Certaines protéines extracellulaires sont clivées par des protéases pour donner des fragments, appelés matricryptines, qui possèdent des activités biologiques qui leur sont propres (Ricard-Blum et Ballut, 2011). C'est

le cas du collagène XVIII, un composant des membranes basales, dont le clivage protéolytique libère un fragment C-terminal nommé endostatine (Folkman, 2006) qui a fait l'objet de notre étude.

Les domaines C-terminaux de plusieurs chaînes de collagène IV exercent également des activités anti-angiogéniques et/ou anti-tumorales. Les domaines des chaînes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  donnent naissance à des fragments appelés respectivement arrestène, canstatine et tumstatine (Pasco *et al.*, 2005, Ricard-Blum et Ballut, 2011). Le domaine C-terminal du collagène XIX inhibe la croissance des mélanomes *in vivo* (Ramont *et al.*, 2007). Le domaine C-terminal de la chaîne  $\alpha 1$  du collagène VIII (la vastatine) possède une activité anti-angiogénique de même que le domaine C-terminal (la restine) de la chaîne  $\alpha 1$  du collagène XV.

Il est intéressant de déterminer si ces fragments sont capables d'interagir avec l'endostatine pour réguler de façon concertée le processus de l'angiogenèse ainsi que la croissance tumorale. L'endostatine interagit en effet avec d'autres régulateurs de l'angiogenèse comme le récepteur 2 du VEGF (Kim *et al.*, 2002) et l'endorépelline, une matricryptine du perlecan (Mongiat *et al.*, 2003).

### **3. L'endostatine, une matricryptine du collagène XVIII**

L'endostatine est une matricryptine de 20 kDa issue du collagène XVIII qui possède 183 acides aminés (Folkman, 2006). Elle est capable de fixer un atome de zinc coordonné par trois résidus d'histidine (His<sup>1</sup>, His<sup>3</sup> et His<sup>11</sup>) et un résidu d'acide aspartique (Asp<sup>76</sup>). Elle est localisée dans les membranes basales vasculaires et est également présente dans le sérum. L'endostatine se fixe à des glycosaminoglycanes et à de nombreuses protéines (Ricard-Blum *et al.*, 2004, Faye *et al.*, 2009a, Faye *et al.*, 2009b).

L'endostatine inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale (O'Reilly *et al.*, 1997) et est présente dans les dépôts amyloïdes existant dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (van Horssen *et al.*, 2002). Elle est fréquemment co-localisée avec le peptide  $\beta$ -amyloïde (1-40) et la protéine tau chez ces patients (Deininger *et al.*, 2002). De plus l'équipe a montré que l'endostatine interagit *in vitro* avec le peptide  $\beta$ -amyloïde et avec plusieurs protéines telles que la transglutaminase-2 et les collagènes IV et VI qui sont présentes dans le cerveau de patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Faye *et al.* 2009a).

#### **4. Le collagène XVII, un collagène transmembranaire**

Le collagène XVII aussi appelé Bullous Pemphigoid 180 (BP180) ou 180 kDa bullous pemphigoid antigen 2 (BPAG2) est un homotrimère composé de trois chaînes  $\alpha 1$ . Ce collagène présent dans la membrane plasmique des kératinocytes participe à la formation des hémidesmosomes en association avec l'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  (Has et Kern, 2010). Le collagène XVII existe sous une forme membranaire et sous la forme d'un ectodomaine soluble (120 kDa) libéré par le processus de shedding dû aux enzymes ADAM 9 et ADAM 10 (Franzke *et al.*, 2009). Un des domaines en triple hélice de l'ectodomaine du collagène XVII est impliqué dans l'adhésion des cellules épithéliales et des fibroblastes. Les mutations du gène codant pour le collagène XVII (COL17A1) sont responsables des épidermolyses bulleuses jonctionnelles.

#### **5. Les réseaux d'interactions extracellulaires**

##### **5.1. L'interactome des fibres élastiques**

Cain *et al.* (2009) ont développé une méthode de purification par affinité de complexes extracellulaires multimoléculaires qui ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse pour identifier leurs constituants. Ils ont établi les réseaux d'interactions primaire et secondaire des fibres élastiques en utilisant la fibrilline-1, la MAGP-1 (microfibril-associated glycoprotein-1), la fibuline-5, la lysyl oxydase et le domaine extracellulaire de la calsynténine-1 comme protéines appâts.

La fibrilline-1, la lysyl oxydase et la MAGP-1 se lient à la stanniocalcine-2, une hormone homodimérique qui serait impliquée dans la carcinogenèse et influencerait sur l'apoptose. La fibrilline-1, MAGP-1, la lysyl oxydase et la fibuline-5 interagissent avec l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène, une glycoprotéine de 47 kDa, ces interactions pourraient contribuer à la régulation du système fibrinolytique. Les microfibrilles élastiques pourraient donc contrôler la biodisponibilité de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène et la coagulation (Cain *et al.*, 2009).

##### **5.2. L'interactome extracellulaire**

Nous avons construit la première version du réseau d'interactions extracellulaires (Chautard *et al.*, 2009b) en utilisant les données stockées dans la base d'interactions MatrixDB développée au laboratoire (Chautard *et al.*, 2009a, Chautard *et al.*, 2011, Aranda *et al.*, 2011) Nous avons inclus dans le réseau les interactions qui impliquent au moins un partenaire

extracellulaire. Les interactions des biomolécules extracellulaires avec les récepteurs situés à la surface figurent par conséquent dans le réseau. Certaines protéines extracellulaires sont internalisées soit sous forme entière, soit après clivage et établissent des interactions avec des molécules intracellulaires ou intranucléaires. C'est le cas de l'endostatine, le fragment C-terminal du collagène XVIII qui est internalisée par les cellules endothéliales (Dixelius *et al.*, 2000). Nous avons donc inclus les interactions établies par les molécules extracellulaires avec des partenaires intracellulaires et nucléaires.

Contrairement à la majorité des réseaux d'interactions publiés, nous avons inclus non seulement les interactions protéine-protéine mais également les interactions protéine-glycosaminoglycane, protéine-lipide et protéine-calcium. Les ions calcium et zinc notamment sont très importants pour les propriétés structurales et biologiques de certaines protéines extracellulaires. De plus le calcium est nécessaire à la formation de plusieurs assemblages supramoléculaires au sein de la matrice extracellulaire comme ceux des fibrillines.

Plusieurs familles de protéines extracellulaires sont multimériques. C'est le cas des collagènes (trimériques), des laminines (trimériques) et des thrombospondines qui sont soit des trimères, soit des pentamères. Certains petits protéoglycanes riches en leucine ont également la capacité de se dimériser. Nous avons donc distingué les interactions établies par les protéines multimériques telles qu'elles existent *in vivo* et celles établies par les chaînes polypeptidiques individuelles. En effet la multimérisation induit une modification des propriétés de reconnaissance moléculaire.

Le réseau publié en 2009 contient 1099 molécules dont 273 molécules extracellulaires qui sont reliées par 2174 interactions impliquant au moins un interactant extracellulaire. Le réseau comporte 1836 interactions protéine-protéine, 119 interactions protéine-glycosaminoglycane.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aranda B, Blankenburg H, Kerrien S, Brinkman FSL, Ceol A, Chautard E, Dana JM, De Las Rivas J, Dumousseau M, Galeota E, Gaulton A, Goll J, Hancock REW, Isserlin R, Jimenez RC, Kerssemakers J, Khadake J, Lynn DJ, Michaut M, O'Kelly G, Ono K, Orchard S, Prieto C, Razick S, Rigina O, Salwinski L, Simonovic M, Velankar S, Winter A, Wu G, Bader GD, Cesareni G, Donaldson IM, Eisenberg D, Kleywegt GJ, Overington J, Ricard-Blum S, Tyers M, Albrecht M, Hermjakob H .PSICQUIC and PSISCORE - Accessing and scoring molecular interactions. *Nat Methods* 2011 8:528-529.

Bartlett AH, Park PW. Proteoglycans in host-pathogen interactions: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 2010 12:e5.

Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 2007 446:1030-1037.

Bülow HE, Hobert O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2006 22:375–407.

Cain SA, McGovern A, Small E, Ward LJ, Baldock C, Shuttleworth A, Kiely CM. Defining elastic fiber interactions by molecular fishing: an affinity purification and mass spectrometry approach. *Mol Cell Proteomics* 2009 8:2715-2732.

Chautard E, Ballut L, Thierry-Mieg N, Ricard-Blum S. MatrixDB, a database focused on extracellular protein-protein and protein-carbohydrate interactions. *Bioinformatics* 2009a 25:690-691.

Chautard E, Thierry-Mieg N, Ricard-Blum S. Interaction networks: from protein functions to drug discovery. A review. *Pathol Biol* 2009b 57:324-333.

Chautard E, Fatoux-Ardore M, Ballut L, Thierry-Mieg N, Ricard-Blum S. MatrixDB, the extracellular matrix interaction database. *Nucleic Acids Res* 2011 39:D235-240.

Cheng JS, Dubal DB, Kim DH, Legleiter J, Cheng IH, Yu GQ, Tesseur I, Wyss-Coray T, Bonaldo P, Mucke L. Collagen VI protects neurons against Abeta toxicity. *Nat Neurosci* 2009 12:119-121.

Cooper MA. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002 1:515-528.

Couchman JR Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010 26:89-114.

Chu TJ, Peters DG. Serial analysis of the vascular endothelial transcriptome under static and shear stress conditions. *Physiol Genomics*. 2008 34:185-92.

Deininger MH, Fimmen BA, Thal DR, Schluesener HJ, Meyermann R. Aberrant neuronal and paracellular deposition of endostatin in brains of patients with

Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002 22:10621-10626. Erratum in *J Neurosci* 2003 23:725.

Ding YH, Javaherian K, Lo KM, Chopra R, Boehm T, Lanciotti J, Harris BA, Li Y, Shapiro R, Hohenester E, Timpl R, Folkman J, Wiley DC. Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 95:10443-10448.

Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engström A, Timpl R, Welsh M, Claesson-Welsh L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis *Blood* 2000 95:3403-3411.

Faye C, Chautard E, Olsen BR, Ricard-Blum S. The first draft of the endostatin interaction network. *J Biol Chem* 2009a 284:22041-22047.

Faye C, Moreau C, Chautard E, Jetne R, Fukai N, Ruggiero F, Humphries MJ, Olsen BR, Ricard-Blum S. Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. *J Biol Chem* 2009b 284:22029-22040.

Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 2006 312:594-607.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010 123:4195-4200.

Franzke CW, Bruckner P, Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J Biol Chem* 2005 280:4005-4008.

Franzke CW, Bruckner-Tuderman L, Blobel CP. Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9. *J Biol Chem* 2009 284:23386-23396.

Groulx JF, Gagné D, Benoit YD, Martel D, Basora N, Beaulieu JF. Collagen VI is a basement membrane component that regulates epithelial cell-fibronectin interactions. *Matrix Biol* 2011 30:195-206.

Has C, Kern JS. Collagen XVII. *Dermatol Clin* 2010 28:61-66.

Heinegård D. Proteoglycans and more from molecules to biology. *Int J Exp Pathol* 2009 90:575-586.

Huszthy PC, Brekken C, Pedersen TB, Thorsen F, Sakariassen PO, Skafnesmo KO, Haraldseth O, Lønning PE, Bjerkvig R, Enger PO. Antitumor efficacy improved by local delivery of species-specific endostatin. *J Neurosurg* 2006 104:118-128.

Javaherian K, Park SY, Pickl WF, LaMontagne KR, Sjin RT, Gillies S, Lo KM. Laminin modulates morphogenic properties of the collagen XVIII endostatin domain. *J Biol Chem*. 2002 277:45211-45218.

Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG. Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling *via* direct interaction with KDR/Flk-1. *J Biol Chem* 2002 277:27872-27879.

Kuo HJ, Maslen CL, Keene DR, Glanville RW. Type VI collagen anchors endothelial basement membranes by interacting with type IV collagen. *J Biol Chem*. 1997 272:26522-26529.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:680-685.

Mäki JM. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol Histopathol* 2009 24:651-660.

Marneros AG, Olsen BR. Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J* 2005 19, 716–728.

Mattsson N. CSF biomarkers in neurodegenerative diseases. *Clin Chem Lab Med* 2011 49:345-352.

Nanda A, St Croix B. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol* 2004 16:44-49.

Pasco S, Brassart B, Ramont L, Maquart FX, Monboisse JC. Control of melanoma cell invasion by type IV collagen. *Cancer Detect Prev* 2005 29:260-266.

Ramont L, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Deshorgue A, Venteo L, Laronze JY, Pluot M, Monboisse JC, Maquart FX. The NC1 domain of type XIX collagen inhibits *in vivo* melanoma growth. *Mol Cancer Ther* 2007 6:506-514.

Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, Enger PO, Timpl R, Olsen BR, Hjelstuen MH, Haraldseth O, Bjerkvig R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 2001 19:29-34.

Ricard-Blum S, Féraud O, Lortat-Jacob H, Rencurosi A, Fukai N, Dkhissi F, Vittet D, Imberty A,

Olsen BR, van der Rest M. Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations. *J Biol Chem* 2004 279:2927-2936.

Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011 3:a004978.

doi: 10.1101/cshperspect.a004978.

Ricard-Blum S, Ballut L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci* 2011 16:674-697.

Rich RL, Myszka DG. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis.

*Anal Biochem* 2007 361:1-6.

Rodgers KD, San Antonio JD, Jacenko O. Heparan sulfate proteoglycans: a GAGgle of skeletal-hematopoietic regulators 2008 *Dev Dyn* 237:2622-2642.

Schaefer L, Iozzo RV. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* 2008 283:21305-21309.

Seppänen A, Suuronen T, Hofmann SC, Majamaa K, Alafuzoff I. Distribution of collagen XVII in the human brain. *Brain Res* 2007 1158:50-56.

Seppänen A, Pikkarainen M, Hartikainen P, Hofmann SC, Majamaa K, Alafuzoff I. Expression of collagen XVII and ubiquitin-binding protein p62 in motor neuron disease. *Brain Res* 2009 1247:171-177.

Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003 13:2498-504.

Tzu J, Marinkovich MP. Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 2008 40:199-214.

van Horssen J, Wilhelmus MM, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Wesseling P, de Waal RM, Verbeek MM. Collagen XVIII: a novel heparan sulfate proteoglycan associated with vascular amyloid depositions and senile plaques in Alzheimer's disease brains. *Brain Pathol* 2002 12:456-462.

Wagenseil JE, Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Research (Part C)* 2007 81:229-240.

Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV. Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry* 2008 47:11174-11183.