
Inhibition d'EMMPRIN, inducteur naturel des métalloprotéinases matricielles, dans la cicatrisation cornéenne

Eric Huet*, Benoit Vallée*, Jean Delbé*, Eric Gabison & Suzanne Menashi***

** IUT de Créteil Vitry
Département Génie Biologique
Laboratoire CRRET
Université Paris 12, CNRS
61 avenue du général de Gaulle 94010 Créteil Cedex*

*** Institut de la vision,
UPMC, INSERM
17, rue Moreau 75012 Paris*

*huet@univ-paris12.fr ; b.vallee@univ-paris12.fr ; delbe@univ-paris12.fr ;
egabison@free.fr ; menashi@univ-paris12.fr*

**Sections de rattachement : 64
Secteur : Secondaire**

RÉSUMÉ. Les traumatismes oculaires mécaniques, physiques ou chimiques sont responsables d'un grand nombre de séquelles ayant un retentissement sur la fonction visuelle : opacification, néo-vascularisation et parfois même perforation des cornées lésées. Une famille d'enzymes, les métalloprotéinases matricielles ou MMPs, a été identifiée au niveau de la cornée comme responsable d'un certain nombre de ces complications. Nous avons récemment pu mettre en évidence une molécule inductrice de la synthèse de ces enzymes, EMMPRIN, au niveau de l'épithélium cornéen. L'objectif de cette étude est d'étudier la régulation d'EMMPRIN et son rôle lors de la cicatrisation cornéenne afin d'envisager son inhibition comme une stratégie thérapeutique chez l'Homme. Lors de lésions de l'épithélium cornéen, EMMPRIN module l'expression de la MMP-9 et, par conséquent, la vitesse de ré-épithélialisation. Egaleme nt, suite à des blessures cornéennes profondes, EMMPRIN participe activement à la différenciation des fibroblastes et donc à la survenue de fibrose. Chez les souris KO EMMPRIN après blessure de la cornée, une diminution de l'induction de MMPs et de l'opacification de la cornée a pu être mise en évidence suggérant ainsi que notre démarche thérapeutique visant à inhiber EMMPRIN puisse représenter une stratégie prometteuse pour une meilleure cicatrisation.

MOTS-CLÉS : Cicatrisation ; Cornée ; EMMPRIN ; Fibrose ; MMPs

1. Introduction

La cornée assure par sa transparence la fonction de premier dioptré oculaire. Sa localisation comme tunique antérieure de l'œil l'expose donc à de nombreux traumatismes mécaniques, physiques ou chimiques. Après la cataracte, les pathologies oculaires impliquant la cornée constituent la deuxième cause de cécité dans le monde (Whitcher et al., 2001). Les conséquences de ces traumatismes peuvent aboutir à une cicatrisation pathologique de type opacification, néo-vascularisation et parfois même perforation des cornées lésées compromettant ainsi la fonction visuelle. Ces complications sont étroitement liées à l'induction massive de métalloprotéinases matricielles ou MMPs (Sivak et al., 2002), enzymes impliquées dans de nombreux phénomènes tant physiologiques que pathologiques comme l'invasion tumorale, l'angiogénèse et la cicatrisation tissulaire.

Lors de la progression tumorale, une induction de MMPs est présente non seulement au niveau de la tumeur primitive mais également, et de manière plus importante, au niveau des fibroblastes sains entourant la lésion (Toole 2003). L'interaction entre les cellules tumorales épithéliales et les fibroblastes du tissu environnant fait intervenir un inducteur de métalloprotéinases, EMMPRIN (Extracellular Matrix MetalloPRoteinase INducer). Cette molécule, présente à la surface des cellules tumorales, induit la synthèse de MMPs par les fibroblastes environnants (Huet et al., 2008). Nous avons pu identifier pour la première fois EMMPRIN au niveau de la cornée (Gabison et al., 2005) et alors émis l'hypothèse que, lors de la cicatrisation cornéenne comme au cours de la tumorigénèse, EMMPRIN pouvait être exprimé par les cellules épithéliales et induire, par contact direct avec les fibroblastes la synthèse de MMPs.

Nous avons pu précédemment mettre en évidence EMMPRIN au niveau de cornées saines et détecter un gradient d'expression de la molécule réparti de manière croissante des cellules apicales vers les cellules basales au niveau de l'épithélium (Gabison et al., 2005). Les fibroblastes expriment également EMMPRIN mais à un moindre degré. Dans le cas de cornées perforées, nous avons détecté la présence et l'activité de certaines MMPs dans la zone sous-épithéliale au niveau des sites de perforation. De plus, nous avons pu montrer que la présence de ces MMPs était corrélée avec une augmentation de l'expression d'EMMPRIN à ce même niveau.

L'objectif de cette étude était de déterminer la régulation, le mode d'action d'EMMPRIN et son rôle dans l'induction des MMPs lors de la cicatrisation, afin d'envisager son inhibition comme une stratégie thérapeutique chez l'Homme.

2. Résultats

2.1. *Implication d'EMMPRIN dans la migration des cellules épithéliales cornéennes*

Des lésions épithéliales superficielles de grand diamètre peuvent entraîner secondairement des lyses de la membrane basale et donc un retard de cicatrisation épithéliale. Ce processus est étroitement associé à une production locale de MMPs qui, en dégradant la membrane basale, modulent la vitesse de ré-épithélialisation. L'expression d'EMMPRIN étant augmentée lors de lésions de l'épithélium cornéen, nous nous sommes intéressés à son rôle dans la production de MMPs par les cellules épithéliales cornéennes et aussi à l'effet de sa sur-expression sur la migration des cellules épithéliales cornéennes.

Pour cela, nous avons transfecté de façon stable les cellules épithéliales cornéennes avec l'ADNc du gène codant pour EMMPRIN humain, afin d'augmenter l'expression constitutive d'EMMPRIN dans ces cellules. Différents clones des cellules transfectées ont été isolés qui expriment EMMPRIN de manière bien plus importante que celles transfectées avec le vecteur vide (figure 1A). Cette augmentation de l'expression d'EMMPRIN est associée à une stimulation de l'expression de la MMP-9 dans ces mêmes clones (figure 1B), sans avoir un effet sur son inhibiteur, le TIMP-1.

Les capacités migratoires de ces différents clones ont alors été déterminées après une lésion de la monocouche cellulaire réalisée à l'aide d'une pointe de pipette et la fermeture de la blessure par migration des cellules épithéliales cornéennes est suivie au cours du temps. Après 18 heures d'incubation, la blessure initiale est totalement refermée dans les cellules « témoin » alors que dans le cas des clones de cellules épithéliales cornéennes sur-exprimant EMMPRIN, la blessure n'est toujours pas refermée (figure 1C).

La surexpression d'EMMPRIN semble donc inhiber la migration des cellules épithéliales cornéennes. Cette inhibition de la migration cellulaire, bien que surprenante, peut être due à l'augmentation de l'expression de la MMP-9 par ces cellules. En effet, des publications récentes chez les souris KO MMP-9 ont montré que la MMP-9 inhibe la migration des cellules épithéliales cornéennes.

Nos résultats montrant qu'EMMPRIN augmente la MMP-9 et inhibe la migration des cellules épithéliales cornéennes sont donc en accord avec ces autres travaux.

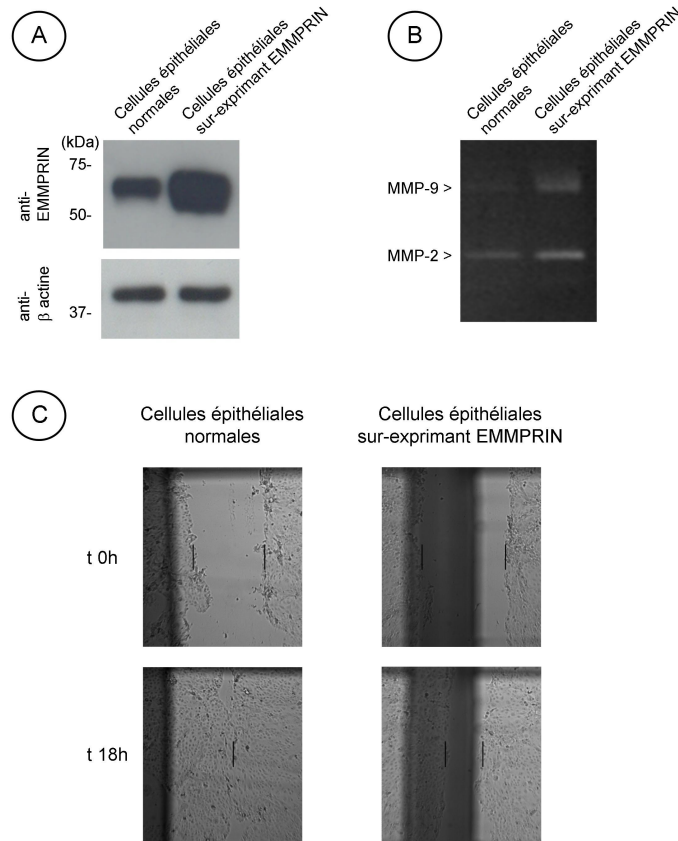


Figure 1. Effet d'EMMPRIN sur la migration des cellules épithéliales cornéennes. L'expression d'EMMPRIN (A) et des MMPs (B) a été déterminée par Western blot et par zymographie en gel de gélatine, respectivement, après culture des cellules épithéliales cornéennes. Les effets d'EMMPRIN sur les capacités migratoires des cellules épithéliales cornéennes normales ou sur-exprimant EMMPRIN sont suivis *in vitro* au cours du temps après lésion de la couche cellulaire (C).

2.2. Implication d'EMMPRIN dans l'activation des cellules stromales

Une des complications majeures après blessure profonde est l'opacification de la cornée qui résulte d'une fibrose du stroma cornéen. Elle implique la transformation des fibroblastes cornéens en myofibroblastes. Nos études en micro-array ont suggéré l'implication d'EMMPRIN dans l'apparition d'un certain nombre de marqueurs

d'activation des fibroblastes. Ceci nous a conduits à étudier les mécanismes par lesquels EMMPRIN contribue au processus de formation de la fibrose.

La fibrose se caractérise par l'activation des fibroblastes. Ils changent de phénotype et expriment l'alpha-actine des cellules musculaires lisses, α SMA, marqueur de ces cellules et, par extension, marqueur de la fibrose tissulaire (Hinz et al., 2001). Le TGF β (Transforming Growth Factor β), un facteur de croissance, est le principal inducteur de la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes.

Afin de déterminer si EMMPRIN est simplement un marqueur ou plutôt un acteur déterminant dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, nous avons étudié l'effet de sa surexpression ou au contraire de son inhibition dans ce processus en analysant des différents critères de la transformation en myofibroblastes : l'expression d' α SMA et la contraction de gel de collagène.

Les résultats obtenus (figure 2) démontrent clairement qu'EMMPRIN est bien nécessaire pour la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. En effet, la surexpression d'EMMPRIN dans les fibroblastes augmente l'expression d' α SMA (figure 2A). Une stimulation des capacités de ces cellules à contracter un gel tridimensionnel de collagène est également observée dans ces conditions. A l'inverse, l'inhibition spécifique de l'expression d'EMMPRIN par deux siARNs différents inhibe l'expression de l' α SMA et de la contraction de gel de collagène (figure 2B).

De plus, l'inhibition d'EMMPRIN inhibe également l'expression de l' α SMA induite par le TGF β et donc la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (figure 2C). Ces résultats montrent donc non seulement qu'EMMPRIN est impliqué activement dans la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes mais également suggèrent que le TGF β , cytokine considérée comme centrale dans cette différenciation, exerce au moins une partie de son effet par le biais d'EMMPRIN.

EMMPRIN apparaît donc fortement impliqué dans la transformation des fibroblastes en myofibroblastes induite par le TGF β et donc dans le processus de formation de la fibrose.

2.3. Rôle d'EMMPRIN dans la cicatrisation cornéenne : modèle expérimental chez la souris déficiente pour EMMPRIN

Grâce à une collaboration avec le Dr Kadomatsu (Nagoya, Japon), nous avons obtenu de la lignée consanguine de souris déficientes (KO) pour EMMPRIN murin. Aucune étude de l'invalidation de l'expression de ce gène dans les processus de réparation tissulaire n'ont jamais été réalisées à ce jour. Ces souris représentent un outil idéal pour évaluer le rôle d'EMMPRIN dans la cicatrisation cornéenne. Deux modèles de lésions ont été étudiés chez les souris sauvages (WT) et KO EMMPRIN : la lésion épithéliale et la photo-ablation de surface ou photokératectomie réfractive (PKR).

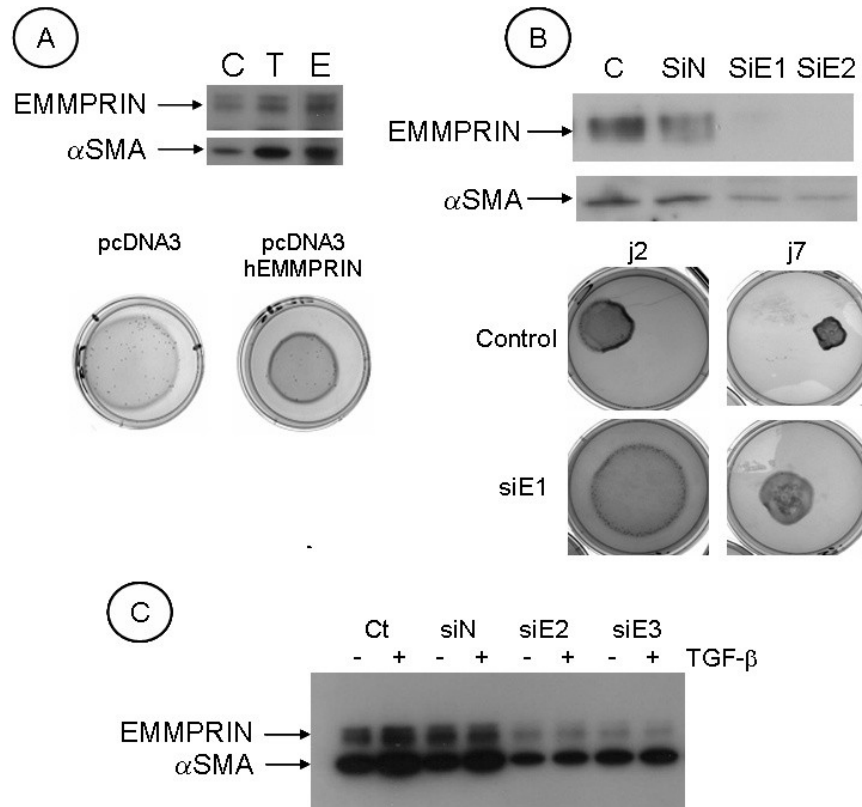


Figure 2. Analyse des différents critères de la transformation en des fibroblastes myofibroblastes : expression d' α SMA et contraction de gel de collagène. (A) Surexpression d'EMMPRIN dans les fibroblastes cornéens par transfection ou ajout de protéine recombinante. (B) Inhibition de l'expression d'EMMPRIN dans les fibroblastes cornéens par transfection de siRNAs. (C) Effet d'EMMPRIN sur la transformation des fibroblastes en myofibroblastes induite par le TGF β .

Les résultats obtenus montrent que la migration épithéliale suite à une lésion de l'épithélium est accélérée chez les souris KO EMMPRIN par rapport aux souris sauvages (WT) de la même portée (figure 3A). Cet effet est associé à une diminution de l'expression de MMP-9 dans les cornées des souris KO EMMPRIN suite à la lésion. Par ailleurs, suite à la PKR, une diminution de la fibrose et de l'apparition de cellules exprimant l' α SMA est observée chez les souris KO EMMPRIN (figure 3B). Ces résultats sont en accord avec les travaux obtenus in vitro (voir 2.1 et 2.2).

3. Conclusions

Par ces différentes approches in vivo et in vitro, nous avons été en mesure d'apporter des informations clés dans la compréhension des mécanismes et modes d'action d'EMMPRIN. Lors de lésions de l'épithélium cornéen, l'expression d'EMMPRIN module l'induction des MMPs et la vitesse de ré-épithélialisation. Egalement, suite à des blessures cornéennes profondes, EMMPRIN participe activement à la différenciation des fibroblastes et donc à la survenue de fibrose.

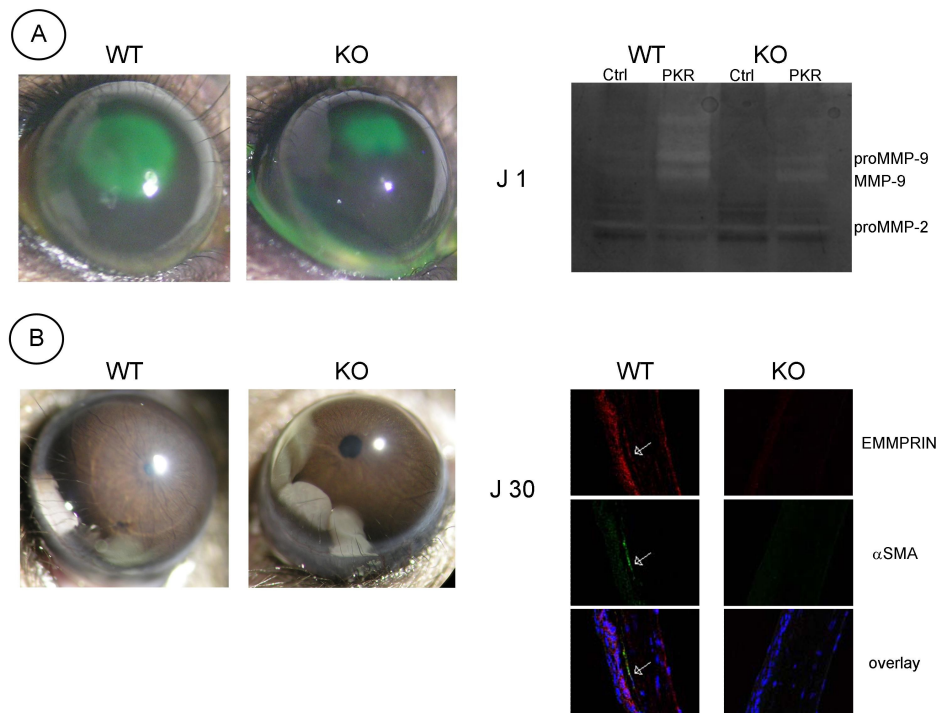


Figure 3. Rôle d'EMMPRIN chez des souris sauvages (WT) et KO EMMPRIN dans les modèles in vivo de cicatrisation cornéenne (A) après lésion épithéliale et (B) après photo-ablation de surface par PKR.

Photos (A) avec fluorescéine à $t = 18h$ et (B) en lumière blanche à J30.

L'utilisation d'inhibiteurs synthétiques ou naturels de MMPs s'est avérée efficace dans la prévention des traumatismes cornéens. Cependant, aucune de ces techniques n'a abouti à des résultats probants chez l'Homme. Nos résultats chez les souris KO EMMPRIN sont encourageants et suggèrent que notre démarche thérapeutique visant à inhiber cet inducteur de MMPs puisse représenter une stratégie prometteuse pour une meilleure cicatrisation.

EMMPRIN étant un inducteur des MMPs, son inhibition ciblera les MMPs avant même leur production au niveau de la cornée, et de plus, elle visera à inhiber non pas toutes les MMPs cornéennes mais uniquement celles induites par EMMPRIN. Les résultats de ces essais précliniques et l'ensemble de nos résultats permettent d'envisager l'utilisation clinique d'anticorps bloquant d'EMMPRIN pour diriger la cicatrisation cornéenne.

Remerciements

Les auteurs remercient la Fondation de l'Avenir (études ET5-400 et ET8-489) pour son soutien financier qui a pu rendre possible cette étude.

Bibliographie

Gabison, EE, Mourah, S, Steinfelds, E, Yan, L, Hoang-Xuan, T, Watsky, MA, De Wever, B, Calvo, F, Mauviel, A, Menashi, S, Differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in normal and ulcerated corneas: role in epithelio-stromal interactions and matrix metalloproteinase induction, *The American journal of pathology*, vol. 166, n° 1, 2005, p. 209-219.

Hinz, B, Celetta, G, Tomasek, JJ, Gabbiani, G, Chaponnier, C, Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity, *Molecular biology of the cell*, vol. 12, n° 9, 2001, p. 2730-2741.

Huet, E, Gabison, EE, Mourah, S, Menashi, S, Role of emmprin/CD147 in tissue remodeling, *Connective tissue research*, vol. 49, n° 3, 2008, p. 175-179.

Sivak, JM, Fini, ME, MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology, *Progress in retinal and eye research*, vol. 21, n° 1, 2002, p. 1-14.

Toole, BP, Emmprin (CD147), a cell surface regulator of matrix metalloproteinase production and function, *Current topics in developmental biology*, vol. 54, n° 2003, p. 371-389.

Whitcher, JP, Srinivasan, M, Upadhyay, MP, Corneal blindness: a global perspective, *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 79, n° 3, 2001, p. 214-221.