

Université de Reims-Champagne Ardenne

UFR Médecine

2004

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

**DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DE REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE**

Spécialité : Biochimie et Biologie moléculaire

Par

Boris VUILLERMOZ

Né le 29 juin 1976 à Villers Semeuse (08)

Rôle du lumicanne dans le vieillissement cutané et le contrôle de l'invasion du mélanome

Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire

CNRS UMR 6198, IFR53 Biomolécules

UFR Médecine de Reims

Présenté et soutenu publiquement le 19 octobre 2004

Membres du Jury

Rapporteurs : Monsieur le Docteur Daniel HERBAGE (DR1 CNRS) (Lyon)
 Monsieur le Docteur Marek HAFTEK (DR2 CNRS) (Lyon)

Examineurs : Monsieur le Docteur Jean-Luc CONTET-AUDONNEAU
 (Nancy, Cognis France)
 Monsieur le Professeur François-Xavier MAQUART (Reims)

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Yanusz WEGROWSKI (Reims)

A mes parents

A ma famille

A Peggy

REMERCIEMENTS

Je voudrais avant tout, remercier Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Biochimie CNRS UMR 6198, et permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Je témoigne toute ma gratitude à Monsieur le Docteur Yanusz Wegrowski qui a bien voulu superviser la direction de cette thèse, pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences et de ses connaissances.

Je remercie Monsieur le Docteur Daniel Herbage, Monsieur le Docteur Marek Haftek et Monsieur le Docteur Contet-Audenneau pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie également, le Professeur Philippe Gillery, le Professeur Alain Randoux, Mesdames et Messieurs les Docteurs Sylvie Brassart-Pasco, William Hornebeck, Jean Claude Monboisse, Roselyne Garnotel, Georges Bellon, Josiane Cornillet, Franck Antonicelli, Hervé Emonart pour les multiples conseils et remarques au cours des réunions ou discussions au sein du laboratoire.

Je remercie également Monsieur le Docteur Laurent Ramont pour son aide précieuse apportée au cours de l'étude *in vivo*.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux Laboratoires Sérobiologiques R&D, division Cognis France en la personne de son Directeur, Monsieur le Docteur Gilles Pauly et de l'un de ses proches collaborateurs Monsieur le Docteur Louis Danoux, qui ont su nous faire confiance et nous ont permis par leur soutien financier de mener à terme ce travail dans un climat relationnel convivial et serein.

Je remercie tous mes collègues membres de la « lumicanne Team » pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la réalisation de ce travail (Marie-France, Sakina et Tonia) et tout particulièrement Coco pour son soutien au cours de ces 6 années de « bonheur ».

Merci à tous les membres du laboratoire (JH, Arnaud, Fatou, Nadia, Alexandra, Céline, Emilie, Abdel, Elisa, Romain, les stéphanes (Jaisson, Poitevin et Le Gratiet), Carole, Laure, Eric, Bertrand, Alix, Alain, David et enfin Mon Simplet).

Je remercie les membres du personnel du laboratoire de biochimie pour leurs gentilleses et leur aide technique très précieuses (Martine, Aurélie, Colette, Monique et Michèle).

Je tiens tout particulièrement à remercier Lydie Venteo pour son aide précieuse et tout le travail d'histologie qui fait partie de ce manuscrit et Monsieur Yves pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Je n'oublie pas de remercier les membres « actifs » de l'ADOCA qui m'ont fait passé des jeudis soir et des barbecue inoubliables, et les membres de la « BEER Hour » pour ses dégustations hebdomadaires.

Ce travail a été réalisé grâce aux financements de :

Les Laboratoires Sérobiologiques division de Cognis France (Nancy)

L'Association Régionale pour l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique
et Technologique en Champagne-Ardenne (ARERS)

L'Association de la Recherche sur le Cancer (ARC)

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	14
INTRODUCTION	16
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	19
<u>I Organisation générale de la peau</u>	19
1) Généralités	19
2) L'épiderme	19
2-1) Les kératinocytes	21
2-2) Les mélanocytes	22
2-3) Les cellules de Langerhans	22
2-4) Les cellules de Merkel	22
2-5) Les annexes épidermiques	22
3) La jonction dermo-épidermique	22
4) Le derme	23
5) L'hypoderme	24
<u>II La matrice extracellulaire dermique</u>	24
1) Les collagènes	24
2) Les glycoprotéines matricielles	28
3) L'élastine	30
4) Les protéoglycannes	31
4-1) Structure des glycosaminoglycannes et des protéoglycannes	31
4-2) Les glycosaminoglycannes	32
4-2-a) Les chondroïtines-sulfates et dermatannes-sulfates	32
4-2-b) Les kératannes-sulfates	35
4-2-c) Les héparannes-sulfates	35
4-2-d) L'acide hyaluronique	37
4-3) La chaîne protéique	37
4-4) Les protéoglycannes de la peau	37
4-5) Les petits protéoglycannes riches en leucine (SLRPs)	40
4-5-a) Famille des protéoglycannes de la classe I	42
4-5-b) Famille des protéoglycannes de la classe II	45
4-5-c) Famille des protéoglycannes de la classe III	47
4-5-d) Famille des protéoglycannes de la classe IV	48
4.5.e) Famille des protéoglycannes de la classe V	48
5) Le lumicanne	49
5-1) Structure	49
5.1.a) Structure primaire	49
5.1.b) Structure secondaire	51
5-2) Le gène du lumicanne	51

5-3) Régulation du lumicanne	53
5-4) Activités biologiques	54
5.4.a) Interaction avec le collagène et les fibrilles de collagène	54
5.4.b) Rôle dans la minéralisation	55
5.4.c) Le lumicanne dans le contrôle de la prolifération et l'adhésion cellulaire	55
5-5) Rôle du lumicanne dans les tissus	56
5.5.a) Fonction dans la cornée	56
5.5.b) Rôle dans la peau	57
5-6) Lumicanne et cancer	57
<u>III Vieillessement cutané</u>	58
1) Vieillessement chronologique	58
1.1) Généralités	58
1.2) Les effets de l'âge sur la synthèse des glycosaminoglycannes et protéoglycannes	59
2) Vieillessement photo-induit	61
2.1) Généralités	61
2.2) Caractéristiques des rayonnements ultraviolets	61
3) Effets à court terme des UV	63
3.1) Effets inflammatoires	63
3.2) Altérations histologiques	63
3.3) Photosensibilité	63
3.4) Altérations immunologiques	64
4) Effets à long terme des UV	64
4.1) Photocarcinogénèse	64
4.2) Vieillessement cutané photo-induit	64
5) Effet des UV sur la synthèse des glycosaminoglycannes et des Protéoglycannes	65
<u>IV Mélanome</u>	66
1) Définition	66
2) Facteurs de risque	66
2.1) Facteurs constitutionnels	66
2.2) Facteurs liés à l'environnement	66
3) Diagnostic de la tumeur primitive	67
3-1) Mesure de l'épaisseur selon la méthode de Breslow	67
3-2) Evolution	69
3-3) Détermination du type histogénique et anatomoclinique de mélanome	69
3-3-a) Mélanome à extension superficielle ou Superficial Spreading Melanoma (SSM)	69
3-3-b) Mélanome acro-lentigineux (ALM)	69
3-3-c) Mélanome sur mélanose de Dubreuilh ou lentigo maligna melanoma (LMM) ou Hutchinson melanotic freckle-melanoma.	70
3-3-d) Mélanome Nodulaire (NM)	70
4) Le mélanome et les protéoglycannes	70
5) Le mélanome et apoptose	71
5.1) Généralités	71
5.2) Les différentes voies connues de l'apoptose	72
5.2.a) La voie mitochondriale	72
5.2.b) La voie des récepteurs de mort	74
5.3) Apoptose et SLRP	74
6) Le mélanome et les métalloprotéinases matricielles (MMPs)	75
6.1) Généralités sur les MMPs	75
6.2) Classification et caractéristiques	76
6.3) Contrôle de l'invasion tumorale du mélanome par les protéinases	78

6.3.a) Métalloprotéinases matricielles et mélanome	78
6.3.a.a) La voie MMP-2/MT1-MMP/TIMP2	78
6.3.a.b) La voie MMP9	79
6.3.a.c) La voie MMP1	79
6.3.a.d) Les autres MMPs	80
6.4) Le système plasminogène/plasmine dans le mélanome	80
6.5) Régulation de l'expression des MMPs par les membres de la famille des SLRPs	80

MATERIELS ET METHODES 82

I Matériels 83

1) Matériels spécifiques pour la biologie moléculaire	83
2) Fournisseurs réactifs	83
3) Fournisseurs matériels	85
3.1) Matériel spécifique à la culture cellulaire	85
3.2) Souches cellulaires	86

II Méthodes 87

1) Hygiène et sécurité	87
2) Culture cellulaire	87
2.1) Technique de culture cellulaire	87
2.2) Explants de fibroblastes dermiques	88
2.3) Traitement anti-mycoplasmique des cellules	88
2.4) Les stimulations cellulaires	89
2.4.a) Etape de pré-incubation	89
2.4.b) Stimulation par l'IGF-1	89
2.4.c) Irradiation des cellules	89
2.5) Dosage de la production de mélanine	90
2.6) Etude de la viabilité cellulaire	90
2.7) Détermination de la prolifération cellulaire : Méthode du cristal violet	90
2.8) Coloration au May-Grunwald Giemsa	91
2.9) Mesure de l'adhésion et de l'étalement cellulaire des cellules B16F1	91
2.10) Migration	92
2.11) Invasion	93
2.12) Croissance en agar mou	93
2.13) Coloration cytochimique au Hoechst-33342	94
3) Extraction des ARN totaux	94
3.1) Principe	94
3.2) Analyse qualitative et quantitative de l'ARN extrait	95
4) Technique du Northern-blot	95
4.1) Electrophorèse	95
4.2) Détection d'un ARNm cible par hybridation avec une sonde radiomarquée	96
5) Précipitation des protéines	98
6) Extraction des protéines nucléaires	98
7) Extraction des protéines totales	99
8) digestion par l'enzyme N-glycosidase F et à la kératanase II	99
9) Dosage des protéines	99
9.1) Dosage des protéines par la méthode de Lowry	99
9.2) Dosage des protéines par la méthode de Bradford	100
10) Protocole pour Dot-Blot	100
11) Western-blot	101
11.1) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS	101
11.2) Electrotransfert et immuno-révélation des protéines	101
12) Dosage des métalloprotéinases (MMPs)	102
12.1) Préparation des échantillons	102

12.2) Zymographie en gel gélatine	103
12.3) Zymographie caséine- plasminogène	103
12.4) Zymographie inverse	103
12.5) Dosage d'activité plasmine générée	104
13) Dosage des glycosaminoglycannes	104
13.1) Protocole d'incorporation de sulfure ³⁵ S et de glucosamine tritiée	104
13.2) Mesure de l'incorporation par la technique de CPC	105
14) Production et purification de plasmide	105
14.1) Transformation des bactéries αDH5 et sélection sur agar	105
14.2) Extraction des plasmides	106
14.3) Vérification des plasmides extraits	106
15) Sous clonage, expression et purification du lumicanne recombinant	107
15.1) Digestion enzymatique des plasmides pCR [®] 2.1-TOPO et pQE30	107
15.2) Extraction des fragments de restriction (Kit GENECLEAN [®])	108
15.3) Ligation et transformation des bactéries par le plasmide d'expression pQE30-HLum	108
16) Production du lumicanne recombinant	108
16.1) Culture bactérienne	108
16.2) Extraction du lumicanne recombinant des corps d'inclusion	109
16.3) Purification par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA superflow	109
17) Transfection de l'ADNc codant le lumicanne humain	109
17.1) Construction du plasmide	109
17.2) Transfection stable de cellules B16F1 et sélection des clones positifs	110
18) Modèle d'étude <i>in vivo</i>	110
18.1) Modèle animal	110
18.2) Modèle expérimental de tumeur sous cutanée	111
18.3) Méthode de mesure	111
18.4) Modèle expérimental de formation de métastases pulmonaires	111
19) Histologie	111
19.1) Fixation des tissus	111
19.2) Le paraffinage	112
19.3) L'inclusion	112
19.4) Microtomisation	112
19.5) Coloration	113
20) Technique d'immunohistochimie	113
20.1) Principe	113
20.2) Protocole	113
21) Etudes Statistiques	114

RESULTATS 115

I Lumicanne et vieillissement cutané 116

1) Souches cellulaires	116
2) Analyse des ARNm par Northern-blot	116
2.1) Décorine	116
2.2) Biglycane	122
2.3) Lumicanne	122
3) Effet des rayonnements UVA	129
3.1) Effet des UVA sur l'expression du taux d'ARNm de lumicanne	129
3.2) Effet des UVA sur l'expression du taux de protéine de lumicanne	129
4) Régulation du lumicanne par différents effecteurs	129
5) Effet de l'IGF-I	133
5.1) Effet dose de l'IGF-I sur l'expression du taux d'ARNm de lumicanne	133
5.2) Effet dose de l'IGF-I sur l'expression protéique du lumicanne	133

<u>II Lumicanne et mélanome</u>	136
1) Etude de l'expression du taux d'ARNm du lumicanne au sein des lignées cancéreuses et non cancéreuses.	136
2) Transfection de l'ADNc du lumicanne dans des cellules B16F1	136
2.1) Sélection des clones transfectés par le lumicanne	139
2.1.a) Analyse par Dot Blot des clones transfectés	139
2.1.b) Analyse par Northern-blot des clones transfectés	139
2.1.c) Analyse par Western-blot des clones transfectés	139
2.1.d) Analyse de la synthèse des glycosaminoglycannes par dialyse CPC	142
2.1.e) Dosage de la mélanine	142
2.1.f) Digestion par la N-glycosidase-F et la kératanase II des clones transfectés	142
2.2) Prolifération cellulaire en monocouche des cellules B16F1	147
2.3) Culture en agar mou des cellules B16F1	147
2.4) Adhésion et étalement cellulaire des cellules B16F1	150
2.5) Migration des cellules B16F1	150
2.6) Invasion du Matrigel® par les cellules B16F1	153
3) Production de lumicanne recombinant	153
4) Etude <i>In vivo</i>	156
4.1) Formation de tumeur sous cutanée	156
4.2) Formation de métastases pulmonaires	156
5) Immunohistochimie des tumeurs	159
5.1) Expression du lumicanne au sein de la tumeur	159
5.1) Expression de la cycline D1 au sein de la tumeur	159
6) Induction de l'apoptose par le lumicanne	162
6.1) Coloration au Hoechst-33342	162
6.2) Analyse par Western-blot des facteurs pro- ou anti-apoptotiques	165
6.2.a) <i>In vivo</i> (p53, Bax, caspase 9, 3 et PARP)	165
6.2.b) <i>In vitro</i> (p53, Bax, caspase 9, 3 et PARP)	165
7) Effet du lumicanne sur l'expression des MMPs	168
7.1) Activité MMPs des cellules B16F1 sauvages et B16F1 transfectées	168
7.1.a) Zymographie en gel de gélatine	168
7.1.b) Zymographie en gel gélatine-plasminogène	168
7.1.c) Zymographie inversée	170
7.1.d) Dosage de l'activité plasmine et de l'activité uPA	170
7.2) Activité des MMPs présentes dans les tumeurs B16F1	170
DISCUSSION	173
Lumicanne et vieillissement cutané chronologique et photo-induit	174
Lumicanne et développement tumoral	180
CONCLUSION	191
BIBLIOGRAPHIE	195
ANNEXES	224

PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS

Publications:

-Specific protein-1 is a universal regulator of UDP-glucose dehydrogenase expression: its positive involvement in transforming growth factor-beta signaling and inhibition in hypoxia.

Bontemps Y, Vuillermoz B, Antonicelli F, Perreau C, Danan JL, Maquart FX, Wegrowski Y.

J. Biol. Chem. 2003 Jun 13;278(24):21566-75.

-The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression

B. Vuillermoz, A. Khoruzhenko, M.F. D'Onofrio, L. Ramont, L. Venteo, C. Perreau, F.X. Maquart and Y. Wegrowski

Exp Cell Research 2004 Jun 10;296(2):294-306

-Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts: decreased lumican production in aging skin

B. Vuillermoz, Y. Wegrowski, J-L. Contet-Audonneau, L. Danoux, G. Pauly, F-X. Maquart
soumis pour publication

Communications orales :

-L'expression de lumicanne par des cellules de mélanome murin inhibe la croissance tumorale
B. Vuillermoz, A. Khoruzhenko, M.F. D'Onofrio, L. Ramont, C. Perreau,, F.X. Maquart and Y. Wegrowski

Journée des jeunes chercheurs de l'IFR- 53, 2003, Reims

-Lumican expression decreases tumour growth of mouse melanoma cells.

B. Vuillermoz, A. Khoruzhenko, M.F. D'Onofrio, L. Ramont, C. Perreau,, F.X. Maquart and Y. Wegrowski

Pathobiology of proteoglycans 3rd international conference on proteoglycans, 2003, Parma

-Le lumicanne, un petit protéoglycane riche en leucine, inhibe la croissance tumorale par induction de l'apoptose.

B. Vuillermoz, A. Khoruzhenko, M.F. D'Onofrio, L. Ramont, C. Perreau,, F.X. Maquart and Y. Wegrowski Congrès de la Société Française du Tissu Conjonctif, 2004, Arcachon

Communications par affiches :

-Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucin-rich proteoglycans production by skin fibroblasts: decreased lumican production in aging skin

B. Vuillermoz, Y. Wegrowski, J-L. Contet-Audonneau, L. Danoux, G. Pauly, F-X. Maquart XIX^{ème} FECTS meeting, 2004, Taormina

-L'expression de lumicanne par des cellules de mélanome murin inhibe la croissance tumorale
B. Vuillermoz, T. Khoruzhenko, M-F. D'Onofrio, C. Perreau, L. Ramont, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

Congrès de la Société Française du Tissu Conjonctif, 2003, Paris

- Le lumicanne inhibe la croissance du mélanome murin.

B. Vuillermoz, T. Khoruzhenko, M-F. D'Onofrio, C. Perreau, L. Ramont, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

CARD, juin 2003, Rouen

-L'expression de lumicanne par des cellules de mélanome murin inhibe la croissance tumorale

B. Vuillermoz, T. Khoruzhenko, M-F. D 'Onofrio, C. Perreau, L. Ramont, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

Congrès de la Société Française du Tissu Conjonctif, 2003, Paris

-Mechanisme of regulation of UDP-glucose dehydrogenase (UGDH) expression by SP1

Y. Bontemps, B. Vuillermoz, C. Perreau, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

Congrès international collagène et peau, Reims, 2002

-Uridine diphosphoglucose deshydrogenase (UGDH) transcriptional analysis of 5'-noncoding region. antisens study on glycosaminglycan's synthesis

GORDON Research conference on proteoglycans, USA, 2002

Y. Bontemps, B. Vuillermoz, C. Perreau, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

-L'Uridine diphosphoglucose déshydrogénase: Clonage du gène, régulation de son expression et étude de son promoteur.

Y. Bontemps, B. Vuillermoz, C. Perreau, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

Congrès de la Société Française du Tissu Conjonctif, 2002

-Effects of TGF-beta and hypoxia on UDP-Glucose dehydrogenase (UGDH) promoter activity.

Congrès international ISSX, Munster 2002

Y. Bontemps, B. Vuillermoz, C. Perreau, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

-Clonage et expression du gène codant l'uridine diphospho-glucose déshydrogénase humaine et murine.

Forum des jeunes chercheurs. Société de Biologie de Reims, Avril 2001.

Y. Bontemps, B. Vuillermoz, C. Perreau, F.X. Maquart et Y. Wegrowski

TABLE DES ILLUSTRATIONS

I Figures

- Figure 1 : Structure de la peau.
- Figure 2 : Structure de l'épiderme.
- Figure 3 : Structure de la jonction dermo-épidermique.
- Figure 4 : Représentation des différents motifs disaccharidiques rencontrés dans les chaînes de glycosaminoglycane.
- Figure 5 : Arbre montrant l'évolution des séquences (des différents membres de la famille des SLRPs).
- Figure 6 : Structure des membres de la famille des petits protéoglycannes riches en leucine.
- Figure 7 : Comparaison des séquences nucléotidiques du lumicanne humain, bovin et de poulet.
- Figure 8 : Structure secondaire du lumicanne.
- Figure 9 : Schéma représentant le spectre de la lumière du soleil.
- Figure 10 : Détermination de l'histopronostic du mélanome.
- Figure 11 : Schéma représentant l'activation de l'apoptose par la voie mitochondriale et par les récepteurs de mort cellulaire.
- Figure 11 : Liste des cellules de type fibroblastique.
- Figure 12 : Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm de la décorine et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.
- Figure 13 : Comparaison du taux d'ARNm de la décorine par rapport au taux d'ARN ribosomal 18S mesuré par Northern-blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés.
- Figure 14 : Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm du biglycane et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.
- Figure 15 : Comparaison du taux d'ARNm du biglycane par rapport au taux d'ARN ribosomal 18S mesuré par Northern-blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés.
- Figure 16 : Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm du lumicanne et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.
- Figure 17 : Comparaison du taux d'ARNm du lumicanne par rapport au taux d'ARN ribosomal 18S mesuré par Northern-blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés.
- Figure 18 : Rapport des moyennes des taux d'ARNm de lumicanne par rapport au taux d'ARNm de décorine, mesurés par Northern-blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés.
- Figure 19 : Analyse par Northern-blot (A) et quantification de l'expression de l'ARNm (B) du lumicanne dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents traités ou non avec des UVA à 7,5 J/cm².
- Figure 20 : Analyse par Western-blot de la synthèse du lumicanne par les cellules MRC5 après un traitement par les UVA à 7,5 J/cm².
- Figure 21 : Etude de la régulation de l'expression du taux de lumicanne par différentes cytokines sur des cellules MRC5.
- Figure 23 : Etude par la technique de Western-blot de l'effet dose de l'IGF-I (de 0 à 100 ng/ml) sur la synthèse du lumicanne présent dans les milieux de culture de cellules MRC5.

- Figure 24 : Etude de l'expression du taux d'ARNm de lumicanne dans différentes lignées cellulaires.
- Figure 25 : Détermination par la technique de Dot Blot des clones positifs B16F1 transfectés de façon stable avec le plasmide pcDNA3 contenant l'ADNc du lumicanne humain.
- Figure 26 : Vérification de l'expression de l'ARNm de lumicanne par les clones de cellules B16F1 transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc du lumicanne humain.
- Figure 27 : Synthèse protéique du lumicanne par les clones de cellules B16F1 transfectés avec un plasmide contenant l'ADNc du lumicanne humain.
- Figure 28 : Mesure de la synthèse de glycosaminoglycannes par l'incorporation de glucosamine tritiée.
- Figure 29 : Mesure de la synthèse de glycosaminoglycannes par l'incorporation de soufre
- Figure 30 : Mesure de la quantité de mélanine sécrétée.
- Figure 31 : Détermination par Western blot de la forme glycoprotéique du lumicanne.
- Figure 32 : Détermination de l'activité proliférative en monocouche des cellules de mélanome B16F1.
- Figure 33 : Adhésion et étalement des cellules de mélanome de souris B16F1 sur différents substrats.
- Figure 34 : L'expression de lumicanne par les cellules B16F1 inhibe la croissance indépendante du substrat.
- Figure 35 : L'expression du lumicanne inhibe la migration des cellules de mélanome de souris B16F1 à travers un filtre Transwell non recouvert.
- Figure 36 : L'expression du lumicanne inhibe la capacité des cellules de mélanome de souris B16F1 à envahir un filtre de Transwell recouvert par du Matrigel.
- Figure 37 : Production et purification de lumicanne humain recombinant.
- Figure 38 : L'expression du lumicanne par des cellules de mélanome inhibe la tumorigénicité de ces cellules *in vivo*.
- Figure 39 : Inhibition du potentiel métastatique des cellules de mélanome de souris B16F1 transfectées avec du lumicanne.
- Figure 40 : Coupe histologique du derme (D) et de la tumeur (T) générées par les cellules de mélanome de souris exprimant pas ou peu de lumicanne.
- Figure 41 : Expression de la cycline D1 dans les tumeurs.
- Figure 42 : Présence de cellules en apoptose au sein de tumeur de mélanome B16F1.
- Figure 43 : Le lumicanne recombinant induit l'apoptose des cellules B16F1.
- Figure 44 : Effets de l'expression du lumicanne sur la synthèse de P53 phosphorylée, Bax, Caspase 3, et de PARP dans les tumeurs.
- Figure 45 : Effets du lumicanne recombinant sur l'expression de Bax, PARP, et des Caspases 9 et 3 de cellules B16F1.
- Figure 46 : Figure montrant l'activité de la MMP2, MMP9, plasmine, tPA, uPA, des TIMPs-1 et -2 dans le milieu de culture de cellules B16F1 sauvages, transfectées avec un vecteur vide ou contenant l'ADNc du lumicanne humain.
- Figure 47 : Dosage de l'activité tPA (A) et uPA (B) sur la couche cellulaire de cellules B16F1 sauvages, transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (HLum).
- Figure 48 : Analyse par la technique de zymographie gélatine de l'activité pro-MMP2, MMP2 et MMP9 au sein de tumeurs.
- Figure 49 : Schéma récapitulatif des voies d'activation de l'apoptose par le lumicanne.

II Tableaux

Tableau I : Classification et assemblage supra moléculaire des collagènes.

Tableau II : Tableau représentant les principales glycoprotéines de la matrice extracellulaire.

Tableau III : Exemple de structure des unités disaccharidiques et nombre de résidus sulfates portés par l'unité disaccharidique.

Tableau IV : Tableau montrant la composition en glycosaminoglycannes sulfatés de différents tissus humains.

Tableau V : Principales familles de protéoglycannes clonés chez les mammifères.

Tableau VI : Tableau montrant les caractéristique structurales de la famille des petits protéoglycannes riches en leucine.

Tableau VII : Classification des métalloprotéinases matricielles ou « MMPs » selon leur structure et spécificité de substrats.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
APS :	Persulfate d'Ammonium
b-FGF :	basic-Fibroblast Growth Factor
BET :	Bromure d'Ehidium
BSA :	Albumine Bovine Sérique
cdk:	kinases dépendante des cyclines
CPC :	Chlorure de Cétalpyridinium
CPM :	Coup Par Minute
CS :	Chondroïtines-Sulfates
Da :	Dalton
dCTP :	Désoxycytidine triphosphate
dNTP :	Mélange des 4 désoxynucléotides triphosphate
DEPC :	Diéthyl pyrocarbonate
DMEM :	Milieu Minimum Essentiel de Eagle Modifié par Dulbecco
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
DO :	Densité Optique
DTT :	1,4-Dithiotréitol
EDTA :	Acide Ethylènediaminotétraacétique
GAGs :	Glycosaminoglycannes
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase
HA :	Acide Hyaluronique
HBSS :	Hanks'Balanced Salts
HEPES :	N2 Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethano-Eulfonique acide
HEP :	Héparine
HS :	Héparannes-Sulfates
IGF:	Insulin-like Growth Factor
IPTG :	Isopropyl- β -D-Thiogalacto pyranoside
KS :	Kératannes-Sulfates
M :	Molarité

MEC :	Matrice Extracellulaire
Milieu LB :	Milieu de culture bactérien de Luria Bertani
MOPS :	3-[N-morpholino]-propane sulfonic acide
MGG :	May-Grunwald-Giemsa
MMP :	Métalloprotéinase Matricielle
MTT :	3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide
NS :	Non Significatif
PAI-1 :	Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène-1
PARP :	Poly ADP-ribose polymérase
PBS :	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PG :	protéoglycane
PMSF :	phénylméthylsulfonylfluorure
PPO :	2,5-diphényloxazol
rpm:	rotation par minute
SDS :	Sodium Dodécyl Sulfate
SEM :	Erreur Standard de la moyenne
SLRPs :	small leucine-rich proteoglycans
SSPE :	Solution Saline Phosphate EDTA
SSC :	Standard Saline Citrate
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TGF-β :	Transforming Growth Factor Beta
TAE :	Tris-Acétate-EDTA
TBS :	Tris Buffer Saline
TBS-T :	Tris Buffer Saline-Tween
TCA :	Trichloro acétique
TE :	Tris-EDTA
TEMED :	N,N,N',N'-Tetre-méthylènediamine
TIMP :	Tissue Inhibitors of Metalloproteinase
tPA :	tissue-type-Plasminogène Activator
Tween-20 :	Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate
UA :	Unité Arbitraire
uPA :	urokinase-type-Plasminogène Activator
UV :	Ultra-Violets

INTRODUCTION

INTRODUCTION

De nombreuses études ont démontré que la capacité de prolifération des fibroblastes humains non-transformés était limitée. Ce phénomène a été déterminé comme étant de la sénescence cellulaire et nombre des observations rapportées reflètent la plupart des aspects du vieillissement *in vivo* (Goldstein 1990; Smith et coll. 1996). En plus de la perte de capacité proliférative, le phénotype des fibroblastes humains présente de nombreux changements au cours du vieillissement, incluant une augmentation de la taille cellulaire, une baisse conséquente du nombre de cellules à confluence, ainsi que des altérations de la structure intracellulaire (Goldstein 1990). Le vieillissement cellulaire nécessite des modifications du métabolisme cellulaire. Ainsi les changements quantitatifs et qualitatifs de l'expression de certaines protéines suggèrent que l'efficacité et la spécificité de la machinerie nécessaire à la synthèse protéique peuvent être différents dans les cellules plus âgées en comparaison avec des cellules jeunes. Les changements affectent aussi la composition de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le collagène. Il a été montré que la biosynthèse de protéoglycannes est aussi modifiée au cours du vieillissement.

Le lumicanne est un petit protéoglycane de la famille des Small Leucine Rich Proteoglycans (SLRPs) possédant une chaîne de kératane sulfate ; il présente une expression importante au sein du derme. De nombreuses études ont montré que ce protéoglycane était capable de se fixer au collagène et d'intervenir dans le processus de fibrillogenèse du collagène. De plus, Chakravarti et coll. (Chakravarti et coll. 1998) ont démontré que l'inactivation de ce gène chez la souris entraînait de grandes modifications au sein de la peau, comme par exemple une forte augmentation de sa fragilité.

L'importance des SLRPs dans le maintien de l'intégrité de la peau et l'absence de connaissances sur l'expression du lumicanne au cours du vieillissement, nous ont poussé à étudier l'expression du lumicanne dans les fibroblastes de la peau de sujets d'âges différents. Pour cela, nous avons récupéré des prélèvements de peau sur un certain nombre de donneurs, que nous avons partagé en trois classes d'âge : (1) sujets jeunes de 0 à 15 ans, (2) sujets adultes de 16 à 50 ans et (3) sujets âgés de plus de 50 ans. Sur ces différents fragments de peau, nous avons récupéré les fibroblastes et nous avons étudié sur ceux-ci, par une approche biochimique, la nature et la quantité respective des différents types de glycosaminoglycannes produits par ces cellules et par une approche de biologie moléculaire, l'expression des ARN

messagers des petits protéoglycannes de la peau comme la décorine, le biglycanne et le lumicanne.

Dans un deuxième temps, notre étude s'est intéressée au mélanome, qui est une tumeur maligne ; il s'agit du cancer cutané le plus agressif et présentant un haut potentiel invasif et métastatique. Sa fréquence est en pleine expansion actuellement. Il représente la première cause de mortalité par cancer cutané. Ce cancer est associé à différents facteurs, comme des facteurs constitutionnels (personnes à peau claire, personnes présentant des cheveux roux ou blonds, personnes présentant des antécédents familiaux de mélanome) et des facteurs liés à l'environnement, comme les rayonnements UV. Ces cellules cancéreuses vont tout d'abord envahir le tissu horizontalement et ensuite verticalement. Elles traversent alors les membranes basales et poursuivent ainsi leur envahissement loco-régional puis métastatique. Au cours de la traversée des membranes basales, la cellule cancéreuse entre en contact avec diverses molécules susceptibles de faciliter ou inhiber ce processus. Les connaissances sur le mécanisme moléculaire de dissémination tumorale révèlent que de nombreux protéoglycannes sont impliqués, mais leur rôle semble double. Ainsi, la décorine apparaît comme étant un inhibiteur de la progression tumorale alors que le perlecanne promeut celle-ci. Dans le carcinome mammaire, le taux d'ARNm du lumicanne est surexprimé dans les fibroblastes adjacents aux cellules cancéreuses et ce niveau d'expression est corrélé avec le grade du cancer, l'expression de récepteurs aux oestrogènes et l'âge des patients (Leygue et coll. 1998). Ces données indiquent que le lumicanne joue un rôle dans la différenciation et la prolifération des cellules cancéreuses mammaires humaines.

Nous nous sommes donc intéressés au rôle du lumicanne sur des cellules de mélanome de souris, afin de déterminer si celui-ci aurait un effet promoteur ou inhibiteur dans le développement tumoral. Pour cela, nous avons transfecté des cellules de mélanome de souris B16F1 avec un plasmide contenant l'ADNc du lumicanne humain et observé l'effet de celui-ci sur la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire.

I Organisation générale de la peau

1) Généralités (Grosshans 1997)

La peau est l'organe le plus lourd du corps humain (de 3 à 3,5 kg soit deux fois le poids du cerveau) et c'est également le plus étendu (de 1,5 à 2 m² chez un adulte jeune, de taille moyenne). Le revêtement cutané est fin et souple, mais d'une grande résistance, lui permettant ainsi d'être bien adapté à une vie où les interactions avec l'environnement sont nombreuses. Elle est avant tout une barrière mécanique assurant un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie. La peau, premier organe protecteur de l'organisme, limite les déperditions d'eau ainsi que la pénétration de composés chimiques et de micro-organismes. Elle joue également un rôle central dans la thermorégulation et la protection contre les rayons UV. Pendant longtemps, cette barrière a été considérée comme une défense essentiellement passive. La peau est divisée en plusieurs compartiments juxtaposés possédant chacun des caractéristiques histologiques et des propriétés antigéniques spécifiques. On décrit quatre compartiments distincts : l'épiderme et ses annexes, la jonction dermo-épidermique, le derme et l'hypoderme (figure 1). L'origine embryonnaire de l'épiderme et de ses annexes, telles que les glandes sudoripares, ongles et follicules pilo-sébacés, est ectodermique alors que le derme et l'hypoderme proviennent du mésoderme. Ces différents tissus, de part leurs origines diverses, contiennent des cellules spécifiques qui leur procurent un rôle spécifique au sein de la peau.

2) L'épiderme (figure 2)

En contact avec le milieu extérieur, l'épiderme est un épithélium de revêtement stratifié pavimenteux. Son épaisseur est variable selon sa localisation : de 0,04 mm (paupière) à 1,6 mm (paumes et plantes de pieds). L'épiderme exerce une fonction de résistance aux agressions physiques et chimiques, et joue le rôle d'une barrière à la diffusion de substances exogènes ou endogènes. L'épiderme est composé de cellules jointives : kératinocytes, mélanocytes, cellules de Langerhans et cellules de Merkel qui reposent sur une lame basale, la jonction dermo-épidermique (Kanitakis 1995).

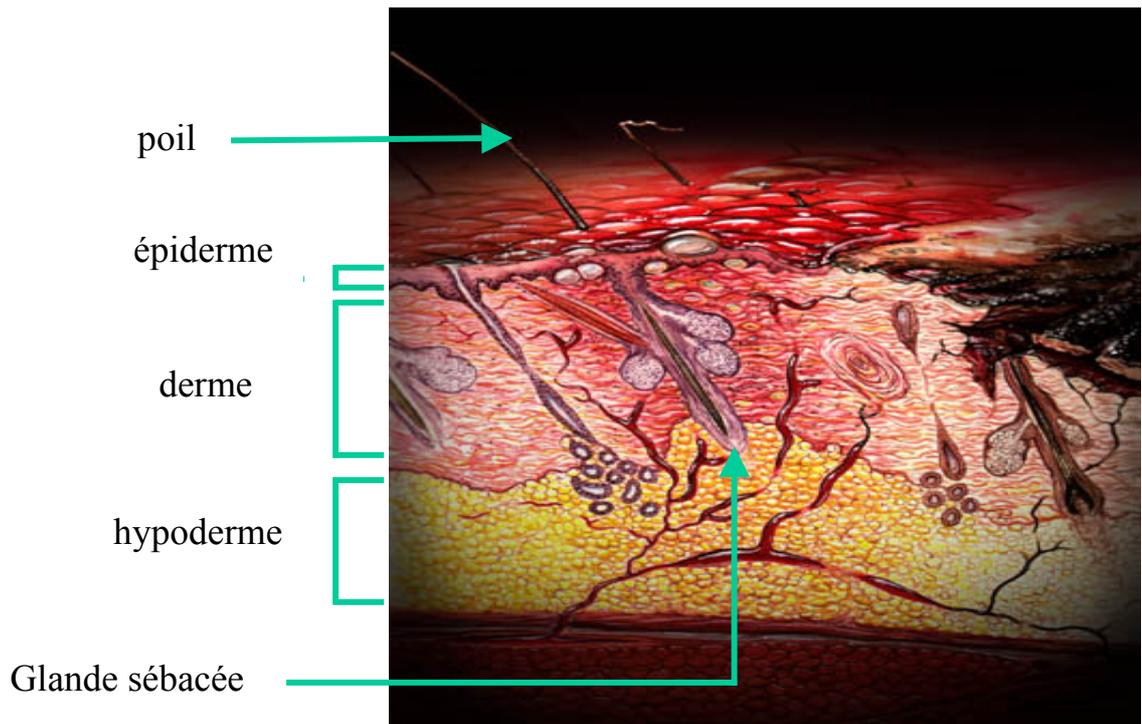


Figure 1 : Structure de la peau

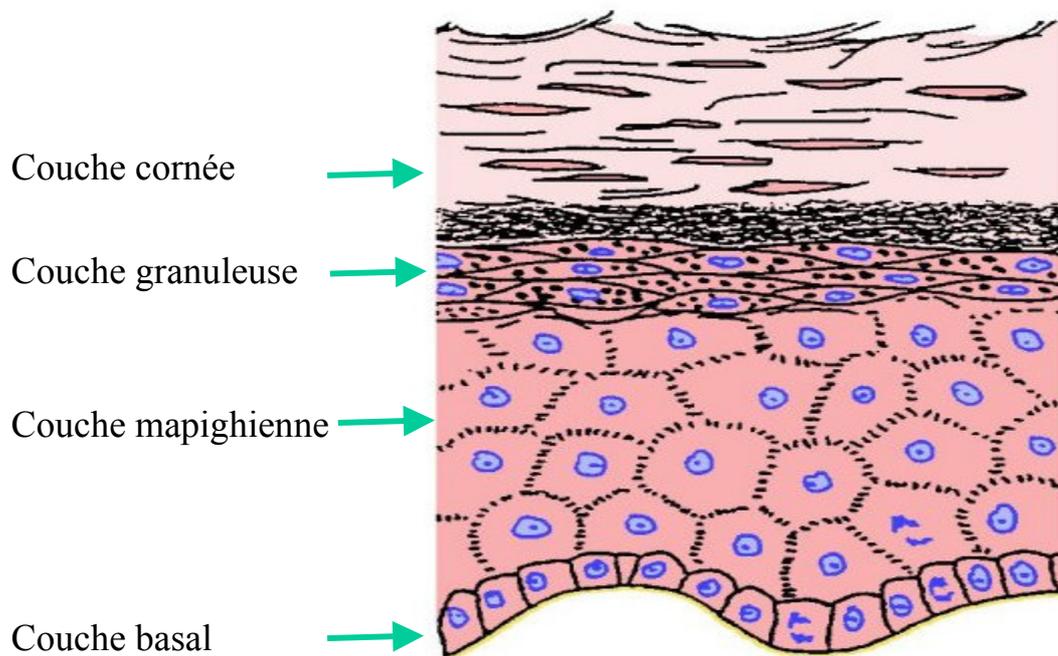


Figure 2 : Structure de l'épiderme

2.1) Les kératinocytes

Ce sont les cellules épidermiques les plus nombreuses (environ 90%). Elles sont caractérisées par leur forme et leur disposition. On distingue quatre compartiments : la couche basale, la couche malpighienne ou épineuse, la couche granuleuse, et la couche cornée.

- *la couche basale germinative (stratum basale ou germinatum)*

Elle est composée d'une assise de kératinocytes peu différenciés, à noyau volumineux. Les kératinocytes de cette couche jouent donc un rôle fondamental dans la régénération de l'épiderme.

- *la couche épineuse de Malpighi (stratum spinosum)*

Elle comporte trois à quatre assises de kératinocytes plus ou moins polyédriques. Dans cette couche, on retrouve une importante activité de phagocytose, ainsi qu'une grande richesse en hydrolases acides, témoignant de l'activité lysosomiale.

- *la couche granuleuse (stratum granulosum)*

Les kératinocytes y sont polygonaux, aplatis, et répartis sur une à trois couches.

- *la couche cornée (stratum corneum)*

Elle est constituée de kératinocytes anucléés, très cohésifs entre eux grâce aux cornéodesmosomes. On distingue usuellement deux zones au sein de la couche cornée, le *stratum compactum* plus profond, où sont présents les desmosomes, et le *stratum disjonctium*, plus superficiel, où les desmosomes disparaissent progressivement et permet une desquamation continue.

2.2) Les mélanocytes

Ils représentent environ 13% des cellules de l'épiderme. Les mélanocytes présentent un corps cellulaire globuleux d'où se détachent des prolongements de cytoplasme, les dendrites. Ces dendrites s'insinuent entre les kératinocytes de la couche basale et du corps muqueux de Malpighi jusqu'à sa troisième couche. Le noyau est arrondi avec un nucléole bien visible et une chromatine fine. Le cytoplasme renferme, en plus des organites cellulaires habituels, des organites spécifiques : les mélanosomes. Par leur localisation dans l'assise basale de l'épiderme, les mélanocytes interagissent avec les kératinocytes. Ces interactions ont conduit à l'élaboration du concept d'Unité Epidermique de Mélanisation (UEM). Cette UEM comprend un mélanocyte pour 30 à 40 kératinocytes avec lesquels il communique via les dendrites. La mélanine, contenue dans les mélanosomes, se regroupe au-dessus du noyau pour assurer la protection du matériel génétique de la cellule en absorbant les UV.

2.3) Les cellules de Langerhans

Ce sont des cellules dendritiques, d'origine médullaire, elles sont dites présentatrices d'antigènes et sont situées dans la couche supra-basale. Leur fonction est d'informer le système immunitaire de la présence d'antigènes exogènes en captant et présentant l'antigène aux lymphocytes-T. Mais elles n'ont pas de capacité phagocytaire. Ces cellules sont aussi des sources de cytokines, plus spécifiquement IL-1.

2.4) Les cellules de Merkel

La cellule de Merkel, est classée parmi les cellules neuro-endocrines car elle possède des granules neuro-sécrétoires. De forme ovale, elle se situe dans la couche basale de l'épiderme.

2.5) Les annexes épidermiques

Elles sont représentées par les glandes sudorales et les follicules pilo-sébacés. Ce sont des structures épithéliales spécialisées, en connexion avec l'épithélium de surface (dont elles sont dérivées embryologiquement) mais logées en grande partie dans le derme et l'hypoderme.

3) La jonction dermo-épidermique ((Briggaman 1982; Eady et coll. 1994)

La jonction dermo-épidermique est une membrane basale complexe à l'interface entre le derme et l'épiderme, élaborée conjointement par les kératinocytes basaux et les fibroblastes dermiques. Elle joue un rôle fondamental de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et permet le contrôle des échanges de produits métaboliques entre ces deux compartiments. De plus, elle sert de support de migration des kératinocytes lors de la cicatrisation et est traversée par différents types cellulaires (cellules de Langerhans, lymphocytes,...) lors de processus immunologiques et inflammatoires. Sa structure à quatre étages distincts visualisée en microscopie électronique de transmission, comprend de l'extérieur vers l'intérieur (figure 3) :

- la membrane plasmique des kératinocytes basaux avec leurs hémidesmosomes,
- la *lamina lucida*, zone claire séparant la membrane plasmique de la lame basale (artefact de manipulation),

- la *lamina densa* (lame basale), zone dense aux électrons, surtout élaborée par les kératinocytes,
- la zone fibrillaire sous-basale, synthétisée par les fibroblastes dermiques et constituée essentiellement de fibrilles d'ancrage.

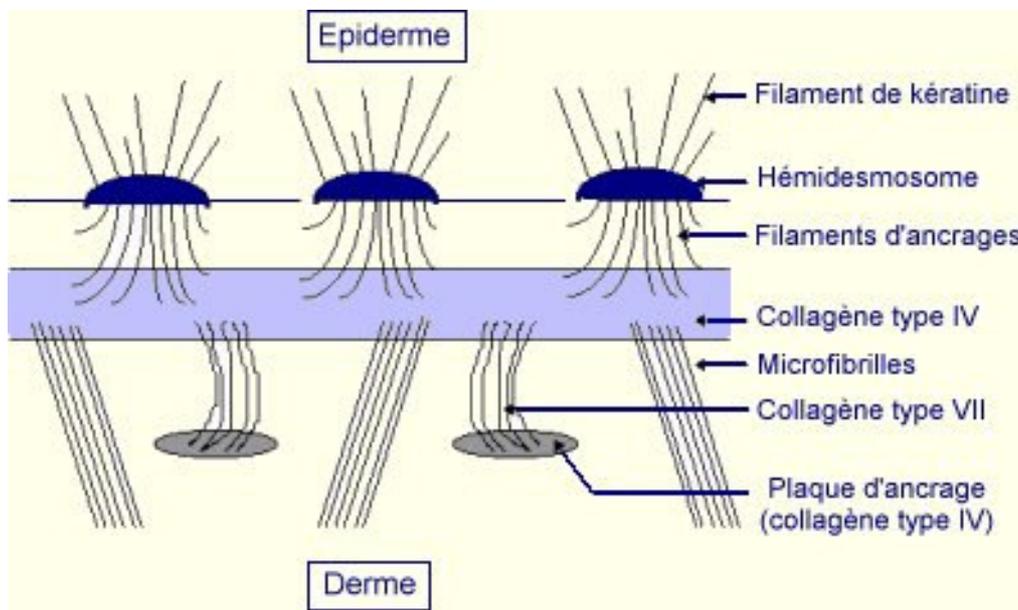


Figure 3 : Structure de la jonction dermo-épidermique.

4) Le derme (Grosshans 1997)

Le derme, sous-jacent à l'épiderme, est un tissu conjonctif à deux étages, le derme papillaire plus superficiel et le derme réticulaire plus profond, dont les fibres conjonctives sont plus épaisses. L'épaisseur du derme varie de quelque dixièmes de mm (paupières) à plusieurs mm (dos). Le derme est sillonné par un réseau veino-artériel. Le derme sert de support aux nerfs, aux vaisseaux et aux annexes épidermiques. Le tissu conjonctif dermique comporte une composante cellulaire et une composante matricielle. La composante cellulaire est constituée essentiellement :

- De fibroblastes qui sont les cellules essentielles du derme et qui produisent tous les éléments de la matrice extracellulaire ; les fibroblastes jouent également un rôle dans la multiplication et la différenciation des kératinocytes de l'épiderme. Ce sont des cellules fusiformes ou stellaires, avec des prolongements cytoplasmiques parfois ramifiés, présentant un ergastoplasme bien développé.

- De mastocytes qui jouent un rôle sur la perméabilité vasculaire et qui participent avec les lymphocytes et les macrophages à la réponse immunitaire.

La composante matricielle est constituée de 4 types de macromolécules ;

- Les protéines fibreuses comme les collagènes et l'élastine sont responsables de la résistance et de l'élasticité.
- Les protéoglycannes et les glycoprotéines matricielles jouent avec l'élastine un rôle dans la régulation et l'attachement des composants.

5) L'hypoderme

L'hypoderme est la structure la plus profonde de la peau sur laquelle repose le derme. Il se présente comme un matelas adipeux variable. On y distingue d'une part les lobules de tissu adipeux, d'autre part les septum fibreux conjonctivo-vasculaires, qui séparent les lobules adipeux. L'hypoderme possède des fonctions physiques (isolement thermique, amortissement des chocs...), mais également de réserve énergétique et nutritionnelle. Son épaisseur varie beaucoup selon la localisation, l'âge et la nutrition.

II La matrice extracellulaire dermique

Selon les tissus, les fibroblastes vont synthétiser de manière plus ou moins abondante les macromolécules composant la matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire dans laquelle sont insérés les fibroblastes, compose les tissus conjonctifs. Les différents composants de cette matrice extracellulaire apportent chacun des propriétés mécaniques et physico-chimiques qui lui sont spécifiques et concourent à former un ensemble, dont les caractéristiques sont adaptées au contexte et aux fonctions du tissu qu'ils forment. Cet ensemble de macromolécules constitue une trame permettant l'adhésion et la migration cellulaire.

La matrice extracellulaire est composée de fibres insolubles, de microfibrilles et d'une grande variété de protéines solubles et des glycoprotéines. On peut classer ces macromolécules en 4 familles :

- les collagènes
- les glycoprotéines matricielles
- l'élastine
- les protéoglycannes

1) Les collagènes

Ce n'est qu'à partir des années cinquante que les collagènes ont été décrits comme un assemblage de protomères formant une structure fibrillaire. Avant cette description préliminaire, les collagènes étaient seulement décrits comme « le constituant du tissu conjonctif qui forme la gélatine après ébullition » (Oxford Dictionary, 1893). Ensuite, le collagène a été décrit comme un assemblage d'unité de tropocollagènes formant un réseau fibrillaire. Ce réseau fibrillaire expliquant la résistance des tissus aux tensions auxquelles ils sont soumis. Dans les années soixante, on reconnaît l'existence de différents types de collagènes (Miller et coll. 1969; Miller 1976).

La définition actuelle des collagènes est un ensemble de protéines de structure de la matrice extracellulaire comportant un ou plusieurs domaines présentant une conformation en triple hélice avec des séquences répétitive de type Gly-X-Y et capables de former pour la plupart des structures supramoléculaires. On les caractérise également par leur richesse en hydroxyproline.

Ce sont des protéines abondantes dans l'organisme des vertébrés; ils représentent environ 30% des protéines d'un organisme adulte, 70% du poids sec de la peau et pratiquement autant pour le stroma de la cornée.

On a décrit actuellement 27 types différents de collagènes, dont près de la moitié est présente dans la peau, et plus de 33 chaînes polypeptidiques différentes entrant dans la structure des collagènes des vertébrés (voir tableau I).

Ces molécules sont génétiquement distinctes, et différentes aussi par leur mode de synthèse, leur répartition, leur taille, leur forme et leurs fonctions biologiques.

Ces 27 types de collagènes sont réparti en 9 classes (tableau I), dont voici quelques exemple :

- **Les collagènes fibrillaires** qui représentent au moins 80 à 90% du collagène dermique total. Ils constituent le composant essentiel du réseau fibreux et possèdent un rôle mécanique. Il est à noter que les proportions relatives de collagènes de type I et III sont un facteur déterminant de la fonction tissulaire. Une diminution du rapport type III/type I se traduit par une perte des propriétés biomécaniques de la peau et notamment, par une diminution de sa flexibilité et une augmentation de sa fragilité, ainsi que celle des vaisseaux sanguins.

Type	Chaînes	Composition du monomère	Expression tissulaire	Particularités
Collagènes fibrillaires				
I	$\alpha 1(I)$ et $\alpha 2(I)$	Hétérotrimère $(\alpha 1)_2(\alpha 2)$ Homotrimère $\alpha 1$	Derme / Os / Dentine / Ligament / Tendon	96% de triple hélice
II	$\alpha 1(II)$	Homotrimère $\alpha 1$	Cartilage / Humeur vitrée	
III	$\alpha 1(III)$	Homotrimère $\alpha 1$	Derme / Vaisseaux / Intestin / Gencive	
V	$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ et $\alpha 3(V)$	Multiples associations	Derme / Os / Placenta / Cartilage	Association aux types I et III
XI	$\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$ et $\alpha 3(XI)$	Hétérotrimère $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$	Cartilage hyalin / Humeur vitrée	Association au type II
XXIV	$\alpha 1(XXIV)$	Homotrimère $\alpha 1$	Os / Cartilage / Rétine / Peau	Association au type V et XI
XXVII	$\alpha 1(XXVII)$	Homotrimère $\alpha 1$	Os / Œil / Poumon	
Collagènes associés aux fibrilles à triple hélice interrompue (FACITs)				
IX	$\alpha 1(IX)$, $\alpha 2(IX)$ et $\alpha 3(IX)$	Hétérotrimère $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$	Cartilage / Cornée	Protéoglycane
XII	$\alpha 1(XII)$	Homotrimère $\alpha 1$	Derme / Os / Tendon / Ligament	10% triple hélice / Protéoglycane
XIV	$\alpha 1(XIV)$	Homotrimère $\alpha 1$	Peau / Tendon / Foie / Vaisseaux	Protéoglycane
XVI	$\alpha 1(XVI)$	Homotrimère $\alpha 1$	Placenta	
XIX	$\alpha 1(XIX)$	Homotrimère $\alpha 1$	Cerveau / Œil / Testicule	Rhabdomyosarcome
XX	$\alpha 1(XX)$	Homotrimère $\alpha 1$	Cornée / Peau / Cartilage / tendon	
XXI	$\alpha 1(XXI)$	Homotrimère $\alpha 1$	Vaisseaux	
Collagène des membranes basales				
IV	$\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 3(IV)$, $\alpha 4(IV)$, $\alpha 5(IV)$ et $\alpha 6(IV)$	Multiples associations	Rein / Cristallin / Aorte / Poumon	
Collagène à filaments perlés				
VI	$\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$ et $\alpha 3(VI)$	Hétérotrimère $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$	Derme / Os / Placenta / Cartilage	
Collagène de fibrilles d'ancrage				
VII	$\alpha 1(VII)$	Homotrimère $\alpha 1$	Derme / os / placenta	

Tableau I : Classification et assemblage supra moléculaire des collagènes

Type	Chaînes	Composition du monomère	Expression tissulaire	Particularités
Collagène à réseaux hexagonaux				
VIII	$\alpha 1(\text{VIII})$ et $\alpha 2(\text{VIII})$	Hétérotrimère ($\alpha 1$) ₂ ($\alpha 2$) Homotrimère $\alpha 1$ Homotrimère $\alpha 2$	Membrane de Descemet / Aorte	Domaine NC1 $\alpha 1(\text{VIII})$ / Vastatine (Activité anti-angiogénique)
X	$\alpha 1(\text{X})$	Homotrimère $\alpha 1$	Cartilage	
Collagènes transmembranaires				
XIII	$\alpha 1(\text{XIII})$	Homotrimère $\alpha 1$	Placenta / Os / Muscle	
XVII	$\alpha 1(\text{XVII})$	Homotrimère $\alpha 1$	Epiderme	BP180 / Hémidésmosome
XXIII	$\alpha 1(\text{XXIII})$	Homotrimère $\alpha 1$	Os / Cartilage / Cornée / Poumons	ADNc uniquement
XXV	$\alpha 1(\text{XXV})$	Homotrimère $\alpha 1$.	Cerveau (plaques amyloïdes)	CLAC-P / Alzheimer
Collagènes à multiples domaines en triple hélice (Multiplexines)				
XV	$\alpha 1(\text{XV})$	Homotrimère $\alpha 1$	Membranes basales	Protéoglycane / Restine
XVIII	$\alpha 1(\text{XVIII})$	Homotrimère $\alpha 1$	Membranes basales	Protéoglycane / Endostatine
Collagènes de forme inconnue				
XXII	$\alpha 1(\text{XXII})$	Homotrimère $\alpha 1$	Cartilage / Tendon	
XXVI	$\alpha 1(\text{XXVI})$	Homotrimère $\alpha 1$	Ovaire / testicule	

Tableau I : Suite

Les chaînes α des collagènes sont synthétisées à partir des gènes de procollagène. Ces gènes sont de grande taille comprenant 50 à 53 exons et pour la plupart de 54 paires de bases (pb) chacun. Ces exons correspondent à la répétition d'une séquence codant six triplets, résultant de la duplication d'un gène ancestral. Selon le nombre et la taille des introns, la longueur totale des gènes varie. Ainsi, le gène codant les chaînes $\alpha 1$ du collagène de type I (COL 1A1) s'étend sur 18kb alors que le gène COL 1A2 mesure 40kb. Ces gènes ont également des localisations chromosomiques différentes.

- **Les collagènes FACIT** (Fibril-Associated Collagen with Interrupted Triple helices) dont le rôle est d'associer les fibres à leur environnement (collagène de type VIII, XII, XIV, XV et XVI).

- **Les collagènes de la membrane basale** localisés au niveau de la membrane basale épidermique et des plaques d'ancrage.

2) Les glycoprotéines matricielles

Citons parmi les différentes glycoprotéines matricielles connues : la fibronectine, la laminine, la vitronectine, la thrombospondine, la ténascine, l'entactine ou nidogène (tableau II) (Raghow 1994; Johansson et coll. 1997).

Les glycoprotéines matricielles jouent des rôles importants dans les interactions cellules-matrice extracellulaire. Ces molécules participent à différentes fonctions grâce à la présence dans leur structure de domaines spécialisés et de séquences capables de reconnaître et de fixer spécifiquement des récepteurs à la surface cellulaire, des protéines extracellulaire comme le collagène ou les protéoglycannes.

Ces protéines présentent certaines caractéristiques communes :

- Elles contiennent des domaines peptidiques spécialisés dans la liaison de certains récepteurs membranaires et de certaines molécules de la matrice extracellulaire comme le collagène, l'héparine ou les héparannes-sulfates;
- Plusieurs de ces glycoprotéines peuvent former des polymères par formation de ponts disulfure ou par des liaisons covalentes;
- Ces protéines et leurs récepteurs sont régulés durant la phase du développement embryonnaire et du remodelage tissulaire.

Glycoprotéine	Fonction
Facteur de Von Willebrand	Liaison des plaquettes au collagène sous-endothélial Complexation du facteur VIII dans le plasma
Fibronectine	Adhérence cellule-matrice Migration cellulaire Chimiotactisme Liaison aux intégrines, héparine, héparane-sulfate, facteur XIII de la coagulation, collagène et fibrine
Laminines	Adhérence cellule-membrane basale Liaison aux intégrines, collagène de type IV, protéoglycannes et nidogène
Nidogène	Adhérence cellule- matrice extracellulaire Liaison aux laminines, au collagène de type IV
Ostéonectine	Régulation de la prolifération des cellules endothéliales, du dépôt et de l'assemblage des protéines de la matrice extracellulaire Stimulation de l'angiogénèse
Tenascines	Liaison aux protéoglycannes, fibronectines, intégrines Propriétés adhésives/anti-adhésives impliquées dans les phénomènes de migrations cellulaires
Thrombospondines	Molécules adhésives ou anti-adhésives selon les types cellulaires Modulation de la forme et de la croissance cellulaire Inhibition de l'angiogénèse Liaison aux intégrines, collagènes et protéoglycannes
Vitronectine	Adhérence, migration cellulaire Régulation de la protéolyse, de la coagulation Liaison aux intégrines, protéoglycannes, glycosaminoglycannes

Tableau II : Tableau représentant les principales glycoprotéines de la matrice extracellulaire.

3) L'élastine

On nomme fibre élastique, la composante fibreuse de la matrice extracellulaire dont la propriété physique est caractérisée par une élasticité. Leur composition comporte majoritairement de l'élastine. Cette propriété d'élasticité est nécessaire au fonctionnement des tissus soumis à des déformations physiques, tels que les cartilages élastiques, le parenchyme pulmonaire, les vaisseaux sanguins ou encore le derme. L'élastine est présente chez tous les vertébrés mais totalement absente chez les invertébrés (Rosenbloom et coll. 1993). L'élastine est une protéine apolaire, dont la composition est la plus riche de toutes les protéines en alanine (25%) et valine (17%). C'est une molécule très hydrophobe dont les séquences hydrophiles se trouvent à l'intérieur de la molécule et servent au pontage. En absence d'eau, elle perd ses propriétés élastiques, devient dure et cassante. Les fibres élastiques sont retrouvées dans les tissus dont la fonction nécessite des déformations répétitives. On peut observer en microscopie électronique les fibres élastiques qui se composent d'une partie amorphe résistante aux protéases (à l'exception des élastases) et de microfibrilles de 10-12 nm de diamètre, associées à des glycoprotéines et qui sont sensibles aux protéases comme la trypsine. Ces microfibrilles sont composées d'une douzaine de protéines dont les plus importantes appartiennent à la famille des fibrillines (Sakai et coll. 1991). Elles se lient à des protéines plasmatiques ou tissulaires comme la fibronectine ou la vitronectine. A la surface des fibroblastes élastogéniques, on trouve une couche de microfibrilles sur laquelle l'élastine amorphe se dépose pour former des fibres élastiques de plus en plus grandes. Ces microfibrilles sembleraient donc jouer le rôle de trame et d'orientation au cours de la fibrillogenèse de l'élastine. Elle est insoluble dans la majorité des solvants et très résistante aux agents de dégradation aussi bien chimiques, physiques, qu'enzymatiques. Elle est toutefois dégradée par quelques protéinases nommées élastases.

L'élastine est principalement synthétisée pendant la vie fœtale et pendant la petite enfance. Chez l'adulte, cette synthèse, qui dans les conditions normales est bloquée à un faible niveau, semble pouvoir être réinitiée par différents stimuli tels que les glucocorticoïdes (Mecham et coll. 1984; Parks et coll. 1988). La teneur en élastine dans la peau est de 2 à 3%. (Sephel et coll. 1986).

4) Les protéoglycannes

4.1) Structure des glycosaminoglycannes et des protéoglycannes

Les protéoglycannes sont composés d'un corps protéique sur lequel sont fixées une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycannes, liées de manière covalente par un point d'ancrage spécifique.

Les glycosaminoglycannes peuvent représenter de 50 à 95% du protéoglycanne sur lequel ils sont branchés. Ils ont une structure rigide formée de répétitions d'unités disaccharidiques. Ils ne forment généralement pas de repliement, ce qui leur confère la propriété importante d'occuper par un grand encombrement stérique l'espace extracellulaire. Ces molécules sont très hydrophiles; elles créent un compartiment aqueux perméable surtout aux cations et aux petites molécules organiques mais imperméables aux grosses molécules. Les glycosaminoglycannes sont des polysaccharides anioniques. La polarité des glycosaminoglycannes, trait physico-chimique le plus marquant, les fait implicitement participer à certaines fonctions biologiques comme l'hydratation des tissus, la fixation des cations ou le rôle de barrière de filtration ionique (Iozzo et coll. 1996; Johanson 1996; Iozzo 1998).

A l'heure actuelle, une cinquantaine de protéines porteuses ont été clonées et la liste ne semble pas être exhaustive. Malgré les importants progrès réalisés dans la compréhension de la structure et du mécanisme de synthèse des protéoglycannes, on ne connaît pas encore la séquence consensus exacte déterminant la glycosylation d'une protéine donnée par une chaîne de glycosaminoglycannes. Ceci est d'autant plus vrai que certaines protéines telles que CD44, thrombomoduline, CSF-1 et autres, existent temporairement, soit sous forme de protéoglycannes, soit sous forme de protéines sans chaîne de glycosaminoglycannes, et sont appelées ainsi des protéoglycannes à temps partiel. Il semble que toutes les cellules diploïdes possèdent un système de synthèse de glycosaminoglycannes, mais on ignore encore à l'heure actuelle si la synthèse de composants polysaccharidiques constitue pour la cellule une condition nécessaire à sa survie.

De façon générale, les rôles biologiques des protéoglycannes sont très diversifiés, allant d'une fonction passive de support mécanique (par exemple, serglycine) ou d'un rôle de barrière ionique de filtration moléculaire (par exemple, perlecanne et bamacanne de la membrane basale glomérulaire), à des effets plus spécifiques dans l'adhésion, l'étalement, la prolifération, la différenciation cellulaire, la morphogenèse ou à des effets très spécifiques d'interactions protéoglycanne-protéine, telles que la fonction de récepteur du bétaglycane ou l'interaction de la décorine avec le collagène. De plus, le produit d'un même gène peut exercer des fonctions différentes liées soit à la chaîne de glycosaminoglycannes, soit à la protéine porteuse ; cependant, la

plupart des fonctions dépendent de l'intégralité de la molécule de protéoglycane. La protéine porteuse peut permettre, en tant qu'agent immobilisant, de masquer un récepteur ou un site de clivage enzymatique. Elle peut aussi contribuer à l'élaboration d'une conformation appropriée de la chaîne de glycosaminoglycannes ou du ligand, ou bien encore présenter le glycosaminoglycane à la surface cellulaire ou à tout autre site approprié pour son action (Bernfield et coll. 1992; Bourin et coll. 1993).

De nombreuses fonctions biologiques des protéoglycannes sont exercées par le biais de leurs protéines porteuses, souvent par des séquences spécifiques (Hayashi et coll. 1992; Svensson et coll. 1995), et avec la participation des composants glycaniques (Scott 1992; Schlessinger et coll. 1995).

4.2) Les glycosaminoglycannes

Il s'agit des chondroïtines-sulfates, des dermatannes-sulfates, des kératannes-sulfates, des héparannes-sulfates et l'acide hyaluronique (figure 4).

Dans la peau, le derme possède une forte résistance mécanique en gardant, toutefois, une grande souplesse. Sa résistance est assurée par le réseau dense des fibres de collagène, mais ce sont les protéoglycannes et l'acide hyaluronique, qui assurent l'hydratation et la souplesse dermique (Sames 1994). Les glycosaminoglycannes constituent 0,5 à 2% du masse sèche du derme.

4.2.a) Les chondroïtines-sulfates et dermatannes-sulfates

La chondroïtine, base non sulfatée des chondroïtines-sulfates, est composée d'unités disaccharidiques d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-galactosamine (figure 4). Les chaînes peuvent comporter jusqu'à 250 disaccharides (Doege et coll. 1990). La sulfatation se fait en position 4 de l'hexosamine pour les chondroïtines-4 sulfates ou en position 6 pour les chondroïtines-6 sulfates (tableau III).

Sous l'action de la 5' épimérase, il peut y avoir une épimérisation des groupes carboxyles du carbone 5 de l'acide glucuronique. Ceci provoque la conversion de l'acide D-glucuronique en acide L-iduronique. Ce conformère est alors appelé dermatanne-sulfate ou chondroïtine-sulfate B. Ainsi, le dermatanne sulfate est une forme dérivée du chondroïtine sulfate, et les deux types de séquences disaccharidiques répétitives se rencontrent habituellement sous forme de segments alternés dans la même chaîne de glycosaminoglycannes.

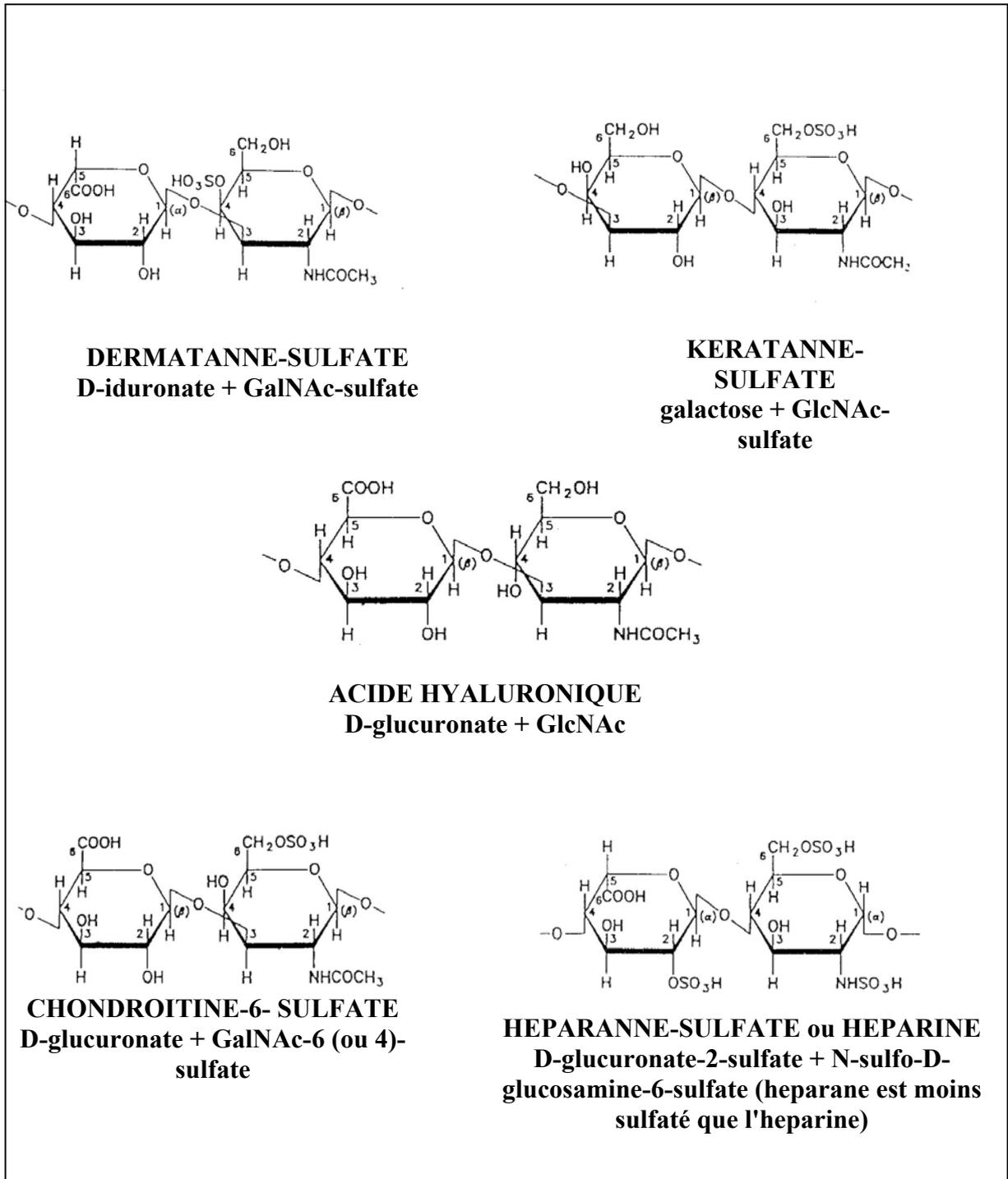


Figure 4 : Représentation des différents motifs disaccharidiques rencontrés dans les chaînes de glycosaminoglycane.

Classe du Glycosaminoglycane	Disaccharide communément rencontré	Nombre de sulfate par unité disaccharidique
Chondroïtine sulfate	GlcA-GalNAc GlcA-GalNAc (4-SO ₄) GlcA-GalNAc (6-SO ₄)	0 à 1 groupement sulfate
Dermatanne sulfate	IdoA-GalNAc IdoA-GalNAc (4-SO ₄) IdoA-GalNAc (6-SO ₄) IdoA (2-SO ₄)-GalNAc (4-SO ₄)	0 à 2 groupements sulfate
Héparanne sulfate	GlcA-GlcNAc GlcA-GlcNSO ₄ GlcA (2-SO ₄)-GlcNSO ₄ IdoA-GlcNSO ₄ IdoA (2-SO ₄)-GlcNSO ₄ IdoA (2-SO ₄)-GlcNSO ₄ (6-SO ₄)	0 à 3 groupements sulfate

Tableau III : Exemple de structure des unités disaccharidiques et nombre de résidus sulfates portés par l'unité disaccharidique.

Le dermatanne-sulfate, est très abondant dans la peau. Il constitue plus de 80% des GAGs dermiques (tableau IV) (Toledo et coll. 1977).

L'acide L-iduronique, mais pas l'acide D-glucuronique, peut être sulfaté en position 2'. La présence du sulfate confère une importante charge négative à la molécule de dermatanne-sulfate. L'abondance de ce GAGs dans un tissu implique, par sa charge, une importante barrière ionique (Jackson et coll. 1991; Jaques 1991). Parmi les autres fonctions du dermatanne-sulfate, on peut souligner son activité anticoagulante, résultant de sa fonction d'activateur du cofacteur II de l'héparine, son activité antithrombotique par activation de la protéine C, enfin son activité anti-agrégante par accélération de la libération de l'activateur tissulaire du plasminogène. Sa contribution au métabolisme des lipides et lipoprotéines est aussi appréciable : le dermatanne-sulfate active la lipoprotéine-lipase et séquestre les LDL (Wegrowski et coll. 1986).

4.2.b) Les kératannes-sulfates

Les kératannes-sulfates sont des polymères composés de D-galactose et de N-acétyl-D-glucosamine (figure 4), d'un poids moléculaire variant de 4 à 19 kDa. Ces chaînes sont sulfatées en position 6 de la glucosamine. On les trouve en grande quantité dans la cornée et dans les disques intervertébraux.

4.2.c) Les héparannes-sulfates

Les héparannes-sulfates sont composés de répétitions du motif disaccharidique composé d'acide D-glucuronique (ou L-iduronique) et de N-acétylglucosamine (figure 4). Ils se différencient par des liaisons α -1 \rightarrow 4 entre le N-acétylglucosamine et l'acide glucuronique (tableau III). L'héparanne-sulfate est très présent dans les lames basales et sur les membranes cellulaires (où il fixe des facteurs de croissance comme le TGF- β). La teneur en groupement N-sulfatés est différente entre l'héparine (>70%) et l'héparanne-sulfate (<50%).

4.2.d) L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique ou hyaluronane est le principal glycosaminoglycane du derme, ce dernier renfermant la moitié de l'acide hyaluronique de l'organisme (Bertheim et coll. 1994); on en retrouve aussi dans le cartilage, l'œil, le cordon ombilical, ainsi que dans tous les

TISSU	Quantité totale de GAGs sulfatés (µg/g de masse sèche)	Chondroïtine sulfates %	Dermatane sulfates %	Héparane sulfates %
Cerveau	385	86	<2	14
Foie	120	<2	44	56
Muscle	316	14	61	24
Aorte	8291	73	10	17
Peau	1300	<2	94	3
Reins	150	15	26	59
Poumons	754	<2	43	57

Tableau IV : Tableau montrant la composition en glycosaminoglycannes sulfatés de différents tissus humains.

liquides du corps (Fraser et coll. 1997) à l'exception du sang. L'acide hyaluronique a été isolé la première fois à partir du vitré de l'œil (Meyer 1958) d'où sa dénomination (du grec $\eta\psi\alpha\lambda\omicron\sigma$ (hyalos) signifiant vitreux). Sa structure est la plus simple de tous les glycosaminoglycannes. C'est le seul glycosaminoglycannes non fixé à une protéine porteuse et non sulfaté. La chaîne d'acide hyaluronique est composée de la répétition d'unités disaccharidiques formées de D-glucuronosyl- β (1 \rightarrow 3) N-acétylglucosamine, liées par une liaison β (1 \rightarrow 4) (figure 4). La masse moléculaire de l'acide hyaluronique varie de 300 kDa à 2000 kDa. Ce polysaccharide gigantesque possède une viscosité intrinsèque très élevée, assurant l'hydratation et l'assemblage des différents éléments du tissu conjonctif par formation

de complexes supramoléculaires. L'acide hyaluronique, avec la fibronectine et la fibrine, contribue à la formation de la trame conjonctive primitive lors des étapes initiales de la cicatrisation. La synthèse d'acide hyaluronique est activée peu de temps après la formation des plaies (Ellis et coll. 1992). Son augmentation est observée dans les cicatrices chéloïdes et dans les cellules des cancers métastasiants.

4.3) La chaîne protéique

La protéine porteuse des protéoglycannes varie en masse moléculaire de 10.000 à 200.000 Da. Le nombre de chaînes de glycosaminoglycannes liées à cette protéine porteuse peut aller de une jusqu'à une centaine (Krusius et coll. 1987) comme pour le protéoglycane de cartilage de rat (Doege et coll. 1987). La nature des chaînes de glycosaminoglycannes est également très variable.

Les sites de liaison des chaînes de glycosaminoglycannes sur la protéine porteuse répondent à des séquences consensus. Les glycosaminoglycannes, sauf pour le kératane-sulfate sont liés à la protéine porteuse par l'intermédiaire d'une sérine contiguë à une glycine.

4.4) Les protéoglycannes de la peau

La famille des protéoglycannes regroupe plus de 50 membres qui ont été clonés ces dernières années (Tableau V).

Dans la peau, on trouve principalement le dermatane-sulfate et minoritairement la chondroïtine-sulfate et l'héparane-sulfate (Tableau IV) (Toledo et coll. 1977).

L'héparane-sulfate est un composant des protéoglycannes de la surface cellulaire : syndécannes, glypicannes, CD44 et son variant d'épissage alternatif dans les kératinocytes, l'épicanne (Bernfield et coll. 1992; Kugelman et coll. 1992; Underhill 1992; David 1993;

Noms et synonymes	Mr de la protéine * 10 ³	Chaînes de GAGs
protéoglycannes extracellulaires (matriciels)		
<u>Famille SLRP (<i>small, leucine-rich proteoglycans</i>)</u>		
Biglycanne, PGS1	38	CS/DS
Décorine, PGS2	36	CS/DS
Asporine	39	
ECM2	55	
Fibromoduline	42	KS
Lumicanne	38	KS
Kératocanne	42	KS
PRELP	44	KS
Ostéoadhérine (mimecanne)	36	KS
Epiphycanne, PG-Lb	36	CS/DS
Ostéoglycine	35	KS
Opticine	45-52	
Chondroadhérine	36	
Nyctalopine	57	
Podocanne		
<u>Hyalectannes</u>		
Agrécanne	220	CS/KS
Versicanne	265	CS/DS
Neurocanne	136	CS
Brévicanne	100	CS
<u>Protéoglycannes de membranes basales</u>		
Perlecanne	400-500	HS/CS
Agrine	200	HS
Bamacanne	200	CS
<u>Collagènes FACIT</u>		
Type IX	chaîne α	CS
Type XII	chaîne α	CS
Type XIV	chaîne α	CS
<u>Divers</u>		
Testicanne	44	HS/CS
CSF-1, M-CSF, PG-100	106	CS
BM-PG (<i>bone marrow PG</i>)	20	CS
Claustrine, MAP1B	70	KS
Peptide riche en proline (PRP)	38	CS
Protéoglycannes membranaires		
<u>Syndecannes</u>		
Syndécanne-1, syndécanne	33	HS/CS
Syndécanne-2, fibroglycanne	48	HS
Syndécanne-3, N-syndécanne	38	HS
Syndécanne-4, ryudocanne, amphiglycanne	35	HS

<u>Glypicannes</u>		
Glypicanne	60	HS
K-Glypicanne	57	HS
OCI-5, glypicanne-3	50	HS
Cérébroglycane	59	HS
Glypicanne-5		
Glypicanne-6		
<u>Hyalectannes membranaires</u>		
CD44, HERMES, H-CAM, PGp-1, épicanne, <i>lymphocyte homing receptor</i> , RHAMM	80-100	HS/CS
<u>Divers</u>		
Thrombomoduline	57	CS
FAT	500	HS
NG2	300	CS
HIP	18	CS
Podocalyxine-like	55	CS
Bêtaglycane	90	HS
Neuroglycane-C	120	CS
Phosphacanne	92	CS
Dystroglycane	153-43	
Sarcoglycane	50-43, 35-35	
Protéoglycannes intracellulaires		
Serglycines	14-19	CS, HEP

Tableau V : Principales familles de protéoglycannes clonés chez les mammifères.

CS : Chondroïtine-sulfate,

DS : Dermatanne-sulfate,

KS : Kératanne-sulfate,

HS : Héparanne-sulfate,

HEP : Héparine

Weksberg et coll. 1996). Il est également caractéristique du perlecanne, protéoglycane de la membrane basale (Iozzo 1994). L'héparanne-sulfate est aussi présent dans les granules des mastocytes, sous forme de serglycine, en tant que précurseur de l'héparine.

Le principal protéoglycane à chondroïtine-sulfate dans la peau est le versicanne (Zimmermann et coll. 1989; Bode-Lesniewska et coll. 1996). Ce protéoglycane appartient à la famille des hyalectannes, constituée de molécules fixant l'acide hyaluronique par leur extrémité N-terminale et ayant des propriétés de lectine dans leur partie C-terminale (Iozzo et coll. 1996). On retrouve aussi certains membres de la famille des petits protéoglycannes riches en leucine comme la décorine et le lumicanne.

4.5) Les petits protéoglycannes riches en leucine (SLRPs)

Le biglycane, la décorine, l'asporine, l'ECM2, le lumicanne, la fibromoduline, le kératocanne, l'épiphycanne, le PRELP, la nyctalopine, la Chondroadhérine, l'ostéoglycine, le podocanne, l'ostéoadérine, l'opticine, forment une famille de protéines extracellulaires de petite taille, contenant des séquences répétées appelées "les répétitions riches en leucine" (RRL). Iozzo et Murdoch (Iozzo et coll. 1996) ont proposé un nom pour cette famille : SLRP (small leucine-rich proteoglycans).

La famille des SLRP a été subdivisée en 5 classes, qui dépendent d'un certain nombre de facteurs comme (Iozzo et coll. 1999) :

- Le nombre de répétitions riches en leucine
- L'espace entre les 4 résidus de cystéine de la région N-terminale
- Le nombre d'exons codant pour le gène
- la complémentarité de bases entre les membres d'une même famille

Ainsi, la classe I est caractérisée par la présence de 10 répétitions riches en leucine, une séquence consensus riche en cystéine (CX3CXCX6C) et 8 exons. La classe II est constituée de 3 exons, de 10 répétitions riches en leucine (sauf pour le PRELP) et de la séquence CX3CXCX9C. La classe III possède un nombre moins important de répétitions riches en leucine (6 à 7), ces membres sont constitués par 7 à 8 exons et possèdent une séquence CX2CXCX6C. Plus récemment, il a été défini 2 nouvelles classes, la classe IV et la classe V définies respectivement par la séquence CX3CXCX8C pour la classe IV et par CX3CXCX7C pour la classe V.

Protéoglycane	Axe Protéique (kDa)	Type De GAG (b)	Localisation chromosomique humain	Nombre de N-Glycosylation (c)
Classe I				
Biglycane	38	CS/DS	Xq28	2
Décorine	36	CS/DS (d)	12q21-23	3
Asporine	39	X	9q21-3	
ECM2	55	X	9q22-3	
Classe II				
Fibromoduline	42	KS	1q32	3
Lumicanne	39	KS	12q21. 3-22	
Kératocanne	42	KS	12q23	
PRELP	44	KS	1q32	
Ostéoadhérine	36	KS	9q22	
Classe III				
Epiphicane	36	CS/DS	12q21	3-4
Ostéoglycine	35	KS	9q22. 2-3	
Opticine	45-52	X	1q32	
Classe IV				
Nyctalopine	57	X		
Chondroadhérine	36-38	X	17q21.33	
Classe V				
Podocanne		X		

a RRL, région riche en leucine

b GAG, glycosaminoglycane; DS, dermatanne sulfate; CS, chondroïtine sulfate; KS, kératanne sulfate

c Le nombre d'oligosaccharides N-liés varie chez les protéoglycannes à kératanne sulfate

d La décorine peut contenir du KS dans la cornée du poulet

Tableaux VI : Tableau montrant les caractéristiques structurales de la famille des petits protéoglycannes riches en leucine.

4.5.a) Famille des SLRPs de la classe I, Tableau VI-(Iozzo 1997)

Le biglycane et la décorine ont une structure primaire très similaire, suggérant une évolution à partir d'un gène ancestral commun (Kresse et coll. 1993) (Figure 5- (Iozzo 1997)). La partie centrale de la protéine contient 10 répétitions riches en leucine, flanquées par les domaines formant la boucle cystéinique. La partie N-terminale contient le peptide-signal, le propeptide et la région de fixation du dermatanne-sulfate. Deux chaînes de dermatanne-sulfate ou de chondroïtine-sulfate sont présentes dans le cas du biglycane et une seule chaîne dans la décorine (Figure 6- (Iozzo 1997)). Bien que la décorine et le biglycane présentent des similarités structurales très importantes, la localisation tissulaire et la régulation de leur expression sont différentes (Wegrowski et coll. 1995a; Wegrowski et coll. 1995b). A l'exception du cartilage, la décorine est un protéoglycane majeur de tous les tissus conjonctifs vasculaires et avasculaires (Scholzen et coll. 1994). La décorine est principalement synthétisée par les cellules d'origine mésenchymateuse (fibroblastes, chondrocytes ou cellules osseuses). La décorine intervient dans de nombreux processus de régulation cellulaire, comme la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion. La décorine peut se lier avec des composants de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la thrombospondine ainsi que plusieurs types de collagène. La décorine, *in vitro*, va retarder la fibrillogenèse du collagène et diminuer le diamètre des fibres néoformées (Danielson et coll. 1997). Le gène de la décorine a été invalidé chez des souris transgéniques. Celles-ci présentent une peau fragilisée avec une résistance mécanique à la déchirure nettement diminuée (Danielson et coll. 1997). Les fibrilles de collagène de la peau de ces animaux présentent une grande variabilité de diamètre. La décorine a été montrée comme pouvant interagir avec une molécule de TGF- β par le biais de son corps protéique, et cela a permis de supposer qu'elle était un inhibiteur naturel de cette cytokine (Yamaguchi et coll. 1990), bien que différentes observations, indiquent que cette interaction ne bloque pas nécessairement son activité (Takeuchi et coll. 1994). La décorine est aussi impliquée dans le contrôle direct de la prolifération et de la migration de différents types cellulaires. Une augmentation de l'expression du gène de la décorine est associée avec un arrêt de la croissance cellulaire (Mauviel et coll. 1995). Le biglycane présente, lui, une localisation tissulaire plus restreinte (Bianco et coll. 1990). Par des méthodes immunohistochimiques, il a été localisé dans l'espace proche des cellules épithéliales (kératinocytes, épithélium glomérulaire) et à proximité des cellules endothéliales. Il est retrouvé majoritairement au sein du tissu osseux et cartilagineux (Fisher et coll. 1987). On pense que le biglycane pourrait avoir un rôle non négligeable dans

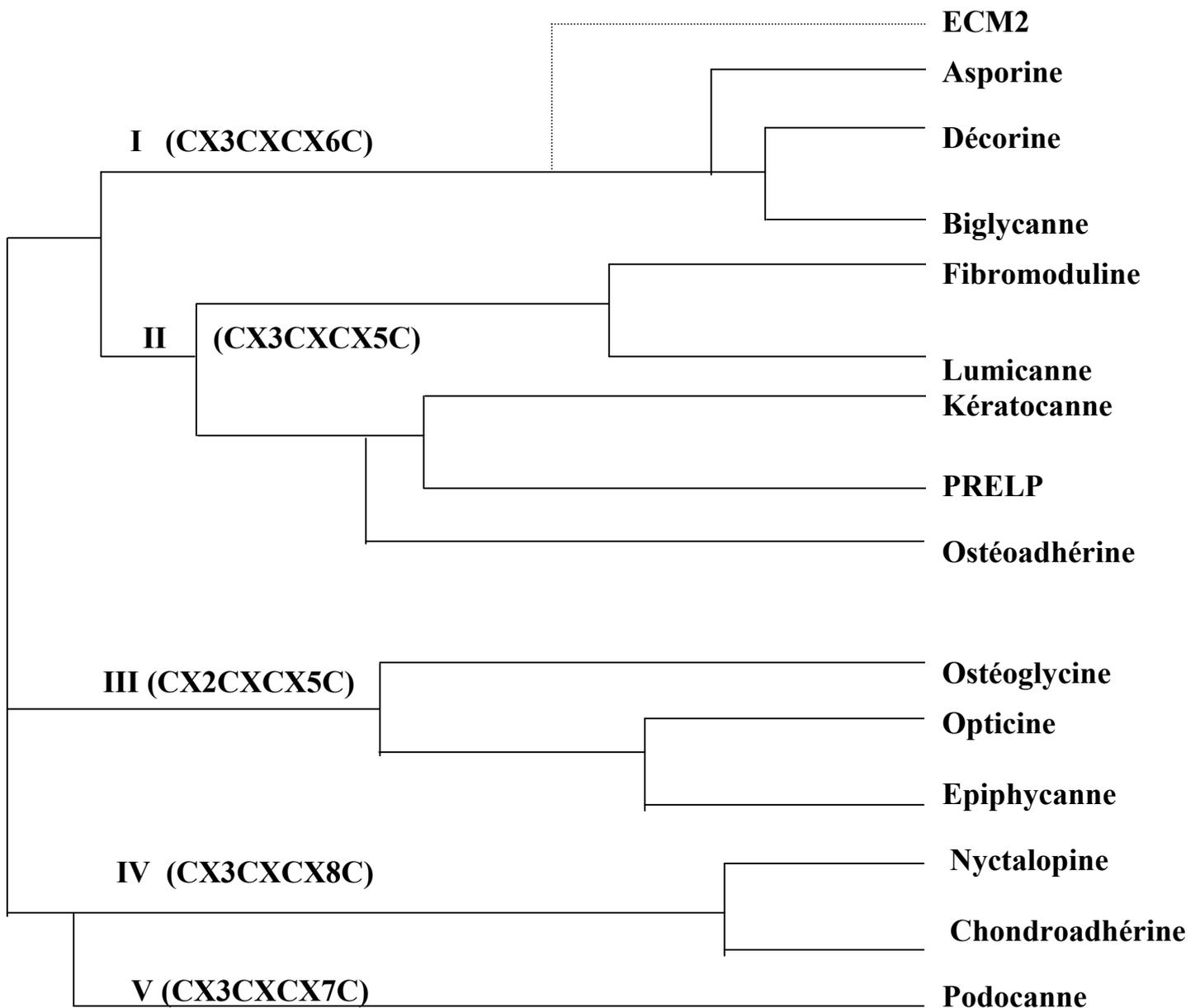


Figure 5 : Arbre montrant l'évolution des séquences (des différents membres de la famille des SLRPs). Sur le schéma, la distance entre les branches horizontales est proportionnelle à la différence d'évolution entre les SLRPs.

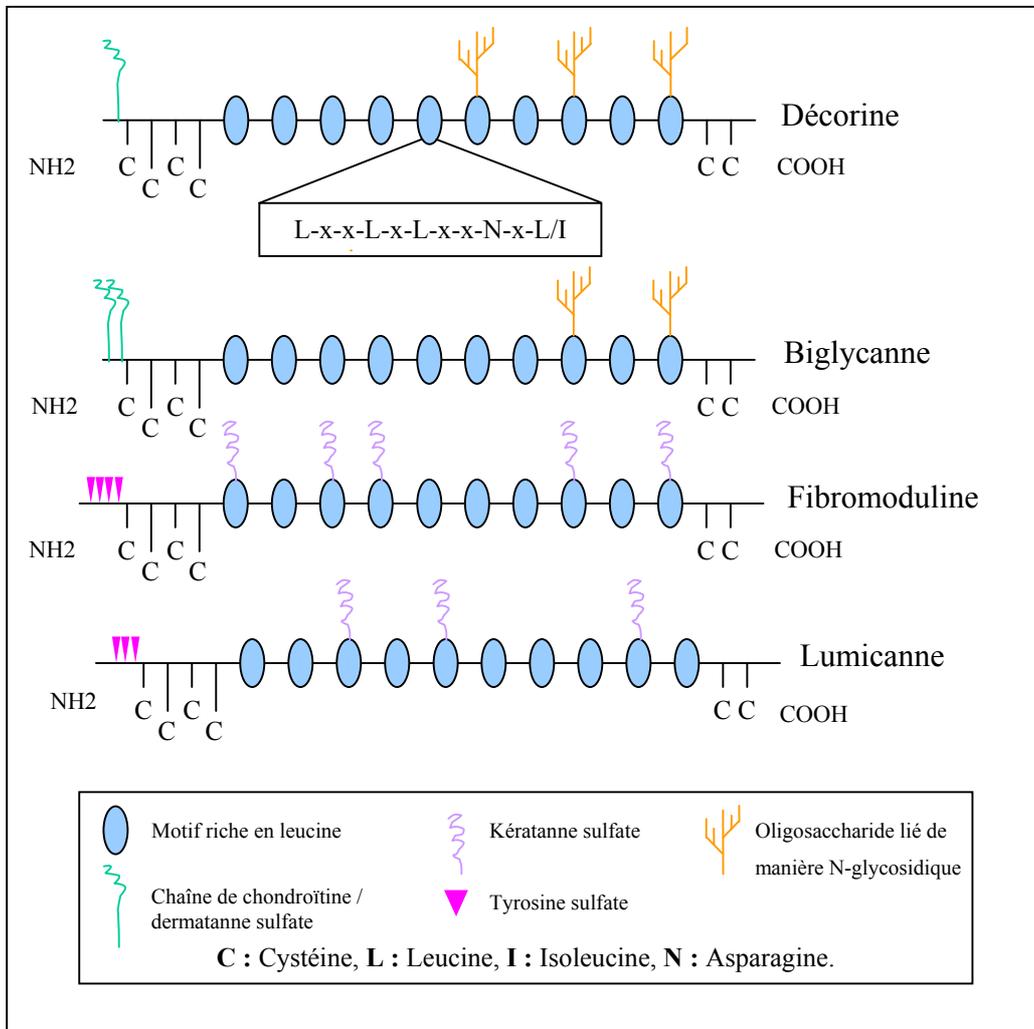


Figure 6 : Structure des membres de la famille des petits protéoglycannes riches en leucine (SLRPs : small leucine-rich proteoglycans)

le processus de minéralisation (Geerkens et coll. 1995). De la même façon que la décorine, le biglycane fixe différentes protéines comme le TGF- β , la fibronectine, le collagène de type I ou type V, mais souvent avec un Kd différent (Schonherr et coll. 1995). On peut aussi remarquer que l'expression du biglycane est généralement à l'opposé de celle de la décorine. Les souris n'exprimant plus de biglycane, présentent une baisse de croissance et une réduction de la masse osseuse (Xu et coll. 1998).

- *Asporine*

L'asporine est caractérisée par la présence d'un résidu unique d'aspartate dans sa région N-terminale. Il présente 10 répétitions riches en leucine, mais il ne possède pas de dipeptide Ser/Gly nécessaires pour l'assemblage des glycosaminoglycannes, on peut donc en déduire que l'asporine n'est pas retrouvée sous forme protéoglycannique mais glycoprotéique.

Cette glycoprotéine est retrouvée majoritairement dans le cerveau, le cœur, le rein, la peau, l'estomac et les testicules (Henry et coll. 2001).

- *ECM2*

ECM2 connu aussi sous le terme de Hevin, SC1, MAST9, SPARC-like 1 et RAG1. Il fait partie de la famille des SPARC (secreted protein acidic and rich in cystein). Mais on peut constater que cette glycoprotéine possède des sites de répétitions riches en leucine et une homologie de séquences de plus de 34% avec la décorine humaine. On peut constater que cette protéine présente une structure différente des autres SLRP. En effet, ECM2 apparaît plus gros que les SLRP. Cette glycoprotéine est aussi caractérisée par la présence dans sa séquence de domaines fonctionnels qui pourraient participer à des interactions protéine-protéine incluant une région RGD, un domaine vonWillebrand et des régions riches en leucine.

Une analyse par Northern-blot révèle que son expression est plus importante dans les tissus adipeux, l'utérus, les ovaires et les glandes mammaires (Nishiu et coll. 1998).

4.5.b) Famille des protéoglycannes de la classe II -Tableau VI-(Iozzo 1997)

Le kératocanne et le lumicanne ont été les premiers protéoglycannes majeurs identifiés dans la cornée, alors que la fibromoduline a été identifiée comme un protéoglycane majeur du cartilage. Les quatre membres de cette famille présentent un domaine N-terminal riche en tyrosine et tous présentent des N-oligosacchrides liés au domaine globulaire de leur corps protéique. Le domaine N-terminal présente des tailles variables (fibromoduline > lumicanne > kératocanne).

- La fibromoduline

La fibromoduline a été identifiée comme un protéoglycane sulfaté du cartilage immature et comme une glycoprotéine (59 kDa) dans le cartilage articulaire mature (Roughley et coll. 1996). Elle a été aussi retrouvée dans le tendon (Svensson et coll. 1999), au niveau de la sclère (Chakravarti et coll. 2003), ainsi que dans de nombreux tissus, à l'exception de la cornée et de la peau (Saamanen et coll. 2001).

Au niveau de sa séquence nucléotidique, on peut remarquer qu'il subsiste une forte identité avec les autres membres des protéoglycannes de classe II, mais aussi de classe I comme la décorine et le biglycane (figure 7). Comme la décorine, la fibromoduline est aussi capable d'inhiber la fibrillogénèse du collagène (Hedbom et coll. 1989) et de fixer le TGF- β (Hildebrand et coll. 1994).

- Le kératocanne

Le kératocanne a été initialement isolé dans la cornée comme un petit protéoglycane à kératane-sulfate. On peut aussi détecter ce protéoglycane dans d'autres tissus comme la peau, les ligaments, les artères, les muscles striés et le cartilage où il existe alors sous une forme glycoprotéique (Corpuz et coll. 1996).

- L'ostéoadhérine

L'ostéoadhérine a été initialement isolée et purifiée comme un composant de la minéralisation de l'os sous une forme de protéoglycane à kératane-sulfate (Wendel et coll. 1998). Elle présente dans sa région C-terminale un fort pourcentage d'acides aminés acides (acide aspartique et acide glutamique), et possède une paire de résidus cystéine. Ce protéoglycane n'a été trouvé que dans les régions osseuses et cartilagineuses (Shen et coll. 1999).

L'ostéoadhérine apparaît être nécessaire dans le processus d'adhésion cellule-matrice et de liaison des ostéoblastes à l'intégrine $\alpha\beta3$ (Wendel et coll. 1998). Il serait impliqué dans le processus de bio-minéralisation (Buchaille et coll. 2000).

- Le PRELP (proline and arginine-rich and leucine-rich repeat protein)

Le PRELP est un SLRP à kératane-sulfate présentant 4 sites de glycosylation qui est retrouvé majoritairement dans le cartilage, son rôle est encore mal connu. Il est capable de se lier au collagène de type I au niveau de la membrane basale et au type II dans le cartilage,

- *Le lumicanne*

Il s'agit d'un petit protéoglycane présentant des chaînes de kératannes-sulfates. Se SLRP sera décrit plus précisément dans le chapitre 5.

4.5.c) *Famille des protéoglycannes de la classe III (Iozzo 2000)*

- *Epiphyccanne (PGLb)*

L'épiphycanne est un protéoglycane présentant une grande chaîne ou deux plus petites de chondroïtine/dermatanne-sulfate. Ce protéoglycane est retrouvé au niveau des membres, dans le cartilage et dans l'épiphyse de squelette de bovin en développement. Le rôle de ce protéoglycane n'est pas clair. On pense que l'épiphycanne empêche le remodelage et que sa perte est un des événements qui permet aux chondrocytes de devenir hypertrophiques.

- *Opticine*

Membre de la famille des SLRP, l'opticine présente plusieurs répétitions riches en leucine et 4 résidus de cystéine dans la région N-terminale (Iozzo et coll. 1999). L'opticine est sécrétée sous une forme glycoprotéique, il ne s'agit pas d'un protéoglycane. Il possède une région riche en Ser/Thr en position N-terminale qui est substituée par des oligosaccharides sialylé o-lié (Le Goff et coll. 2003).

L'opticine est retrouvée dans le corps vitreux de l'œil (Reardon et coll. 2000), dans l'épithélium ciliaire de souris embryonnaire à un haut niveau d'expression (Takanosu et coll. 2001) et plus faiblement dans le cerveau, le ligament et la peau (Hobby et coll. 2000; Reardon et coll. 2000).

- *Ostéoglycine*

Il représente le plus petit membre des SLRPs. L'ostéoglycine a été isolé et caractérisé comme étant un facteur ostéo-inductif des os de bovin (Bentz et coll. 1990). Sa forme humaine est appelée mimecane. Par Northern-blot, il a été montré que l'ostéoglycine avait la même distribution que le lumicanne, à l'exception des muscles où il est en plus faible proportion (Kokenyesi et coll. 1997).

4.5.d) Famille des protéoglycannes de la classe IV.

- Chondroadhérine

Il s'agit d'un composant des protéines matricielles de 36-38 kDa premièrement isolé du cartilage bovin (Larsson et coll. 1991; Neame et coll. 1994). Il est caractérisé par la présence de 10 répétitions riches en leucine, de 4 résidus cystéine dans la région N terminale. On peut remarquer qu'il ne possède pas de site potentiel de N-glycosylation. Il est retrouvé sous forme glycoprotéique et non protéoglycannique (Kobe et coll. 1994). Il est fortement exprimé dans certaines zones comme le cartilage, mais aussi dans les os, le tendon, la moelle osseuse et dans les cellules de chondrosarcome (Tasheva et coll. 2004).

- Nyctalopine

Ce gène, aussi désigné sous le terme de NYX, code une protéine de 481 acides aminés. La nyctalopine est exprimée à des niveaux assez faibles dans la rétine, le cerveau, les testicules, les poumons, la rate et les muscles (Pusch et coll. 2000; Pesch et coll. 2003). Il s'agit d'une protéine présentant 11 répétitions riches en leucine entourées par deux domaines riches en cystéine, un peptide signal sur sa partie amino-terminale et une séquence d'ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'absence d'expression ou la mutation de ce petit protéoglycanne sur chromosome X entraîne une diminution de la vue dans le noir, accompagnée d'une forte myopie et d'une baisse de l'acuité visuelle (Pusch et coll. 2000).

4.5.e) Famille des protéoglycannes de la classe V.

- Podocanne

Il s'agit d'une SLR protéine qui possède des caractéristiques structurales très différentes des autres classes connues de la famille des SLRP et il est donc considéré comme le premier membre d'une nouvelle classe (classe V). Il s'agit en fait d'une glycoprotéine contenant des oligosaccharides N-glycosylés, mais en aucun cas d'un protéoglycanne (Ross et coll. 2003).

Cette glycoprotéine a été retrouvée comme étant liée à du collagène de type I. Il a été démontré par Shimizu-Hirota et coll. que des cellules transfectées avec du podocanne présentaient une diminution de la croissance et de la migration cellulaire (Shimizu-Hirota et coll. 2004).

5) Le lumicanne

Le lumicanne est un protéoglycane présentant une chaîne de kératane-sulfate, membre de la famille des petits protéoglycannes riches en leucine (SLRPs) (Iozzo 1998). Il a été initialement identifié comme un protéoglycane majeur de la cornée (Blochberger et coll. 1992) et a ensuite pu être caractérisé dans d'autres tissus comme dans le cartilage (Grover et coll. 1995), l'os (Raouf et coll. 2002), le tendon (Svensson et coll. 1999), la peau (Corpuz et coll. 2000), le muscle (Qin et coll. 2001), les artères (Funderburgh et coll. 1991), le poumon (Dolhnikoff et coll. 1998), le cœur (Ying et coll. 1997), l'utérus (San Martin et coll. 2003), l'intestin (Blochberger et coll. 1992), les disques intervertébraux (Sztrolovics et coll. 1999), le pancréas (Naito et coll. 2003) et le foie (Gressner et coll. 1994).

Il peut exister sous deux formes selon la localisation tissulaire :

- Dans la cornée, il est détecté comme étant un protéoglycane richement sulfaté avec des chaînes de kératane-sulfate (Funderburgh et coll. 1987; Midura et coll. 1989; Blochberger et coll. 1992).

- Dans les tissus non cornéens, il est retrouvé généralement sous sa forme glycoprotéique, avec des chaînes de polylactosaminoglycannes plus petites, plus homogènes et pauvrement sulfatées ou non sulfatées (Funderburgh et coll. 1991).

Une invalidation totale du lumicanne, sur des souris ($lum^{-/-}$) montre tout d'abord que l'absence de ce gène n'est pas létale, que ces souris sont fertiles et présentent des altérations majeures au niveau de leur peau et de leur cornée.

5.1) Structure du lumicanne

5.1.a) Structure primaire

La séquence codante le gène du lumicanne présente un cadre de lecture ouvert codant une séquence de 338, 338, 342 ou 343 acides aminés pour l'homme, la souris, le poulet et le bovin respectivement.

Le lumicanne de la souris présente une forte homologie de séquence avec le bovin, de l'ordre de 85%, avec principalement une très forte homologie sur la partie N-terminale correspondant à la région proche des cystéines, et sur la partie C-terminale. Le haut degré de conservation de ces régions suggère leur importance (Figure 7). La comparaison de séquences avec le poulet est de l'ordre de 75% d'homologie (Funderburgh et coll. 1995). La séquence du lumicanne humain est semblable à 90% à celle du bovin et à 72% de la séquence du poulet (Chakravarti et coll. 1995).

La masse moléculaire de la protéine cœur du lumicanne est d'environ 37 à 38 kDa (dépend de l'espèce). Sa séquence en acides aminés présente des zones similaires à la décorine, au biglycane, ainsi qu'à la fibromoduline (Blochberger et coll. 1992) ;(Funderburgh et coll. 1993).

Le masse moléculaire du lumicanne sous forme protéoglycannique, c'est à dire présentant des chaînes de kératane-sulfate, est variable (65 à 90 kDa), et d'environ 57 kDa pour sa forme glycoprotéique.

La séquence du lumicanne débute par 18 à 20 acides aminés hydrophobes constituant le peptide signal, permettant ainsi la sécrétion de cette protéine. On trouve ensuite une région N-terminale qui est une zone de 18 à 22 acides aminés ne présentant pas ou peu de similitude entre espèces (Funderburgh et coll. 1995). Cette région « hypervariable » contient plusieurs résidus tyrosine suivis d'un acide aspartique ou d'un acide glutamique. Ce groupement a été identifié comme une zone consensus de sulfatation des tyrosines (Antonsson et coll. 1991).

A la suite de cette zone hypervariable, on trouve la région centrale qui est une région hautement conservée de 305 à 308 acides aminés située juste après quatre résidus de cystéine espacés. Cette région contient 9 répétitions de motifs riches en leucine de 22 à 25 acides aminés avec une séquence consensus variable LxxLxLxxNxxL/I où x représente n'importe quel acide aminé, L la leucine, I l'isoleucine et N l'asparagine (Funderburgh et coll. 1993). Cette région est en fait divisée en 3 sous-unités de 3 motifs de répétitions (Figure 7), montrant ainsi que ces séquences sont bien exactement répétées et avec des espaces constants entre les résidus d'asparagine :

- La première unité comprend 71 acides aminés (de la position 63 à 133) et contient aussi deux sites de N-glycosylation sur la position 87 et 126.

- La deuxième unité (de la position 134 à 201) comprend 68 acides aminés et contient un site de N-glycosylation en position 159 (Chakravarti et coll. 1995).

- la troisième unité (de la position 202 à 271) avec 70 acides aminés, contient un site de N-glycosylation en position 252 (Chakravarti et coll. 1995).

Et enfin un domaine C-terminale contenant deux résidus cystéine supplémentaires qui peuvent former des ponts disulfures. Le lumicanne contient aussi deux répétitions partielles riches en leucine, une en position 281 à 286 qui est similaire au second motif de la région centrale de l'unité 3, alors que l'autre (en position 309 à 314) est semblable à la moitié C-terminale du motif 1 (Figure 7).

Le lumicanne possède donc 5 sites de N-glycosylation potentiels répartie sur l'ensemble de sa séquence (Figure 6 et Figure 8). Les chaînes de kératanes-sulfates du lumicanne sont liées sur des résidus d'asparagine du corps protéique via une liaison N-glycosidique, sur le site NX(S/T) dans

le lumicanne de la cornée. Une étude des chaînes de glycosaminoglycannes du lumicanne présentes dans les artères montre qu'il y a moins de galactose, de glucosamine et de sulfate que dans le lumicanne de la cornée.

5.1.b) Structure secondaire (figure 8)

Les zones présentant des répétitions riches en leucine se présentent généralement sous la forme de repliement- β (Krantz et coll. 1991). L'extrémité supérieure de ces repliements- β est formée par la succession de 3 acides aminés xLx (de la répétition LxxLxLxxN). Ces sites interviendraient dans des interactions protéine-protéine (Brown et coll. 1989; Rada et coll. 1993).

Le modèle tridimensionnel de ce petit protéoglycane n'a pas encore été défini.

5.2) Le gène du lumicanne

A ce jour, le gène du lumicanne a été cloné dans de nombreux organismes, comme le poulet (Blochberger et coll. 1992), la caille (Corpuz et coll. 2000), le bovin (Funderburgh et coll. 1993), l'humain (Chakravarti et coll. 1995) et la souris (Funderburgh et coll. 1995). Il est constitué d'un ARNm de 1,9 kb chez l'homme. Le gène du lumicanne a été cartographié sur la région distale du chromosome 10 de la souris. Cette région montre des homologies de liaison avec le chromosome 12q humain. Ceci est confirmé par la localisation chez l'homme du gène du lumicanne sur le chromosome 12 et plus particulièrement dans la zone 12q21.3-q22 (Chakravarti et coll. 1995; Grover et coll. 1995).

Si on regarde plus précisément le gène du lumicanne, on peut voir qu'il est composé de trois exons et deux introns de 7 à 9 kpb sur le gène (dépendant en fait de l'espèce). Le premier exon contient seulement une séquence 5' non-codante, le second exon contient la plus grande partie de la région codante et enfin le troisième exon contient la fin de la partie codante et la région 3' non-codante. De ces 3 exons, on peut remarquer que la région codante pour la région riche en leucine est située sur un seul exon (le deuxième), alors qu'il est distribué sur plus de 6 exons pour la décorine (Iozzo et coll. 1996).

Human	MSLSAFTLFLALIGGTS	GQYYDY	DFPLSIYQSSPNC	CAPECNC	PESYPS	SAMYCDELK	LKSVPMV	PPG												
Bovine	-n-gv-p-l-----a-typd--e-y--gal--r-----																			
Chicken	-t-nslpi--v--s-ifc-yd-gpad-ygydpf-p-tav-----l--t-----n---ti-i--s-																			
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>																	
Human	IKYLYLRNNQIDHIDEKAFENVTDLQWLILDHNLL	LENSKIKGRV	FSKQKQ	LKQK	LHINHN	NLT	ESV	GPL												
Bovine	-----d-----i-----y-----																			
Chicken	-----m-ea--nt-d-----n-----n-----y-----a-----																			
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>																	
Human	PKSLEDLQLTHNKIT	KLGSF	EGLVNL	TFIHLQ	HNRLK	EDAVS	AAF	KGLKSLEYLDLSFNQIARLP	SGL											
Bovine	--v-----n---s-----d-----q-----l-----mtk-----																			
Chicken	--t-d-----vnpal-----v-----n-q--t-si-g-----n--l-----ltk--t--																			
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>																	
Human	PVSLLTLYLDN	NKISNIP	DEYFKR	FNALQY	LRLSH	NELAD	SGIP	GN	SFNVSS	VELDLS	YNKLN	PIPT								
Bovine	-----s-----v-----																			
Chicken	-n--m--f--q-----qg-kt-----k-t-----v--it-----f--s--																			
Human	VNENLENY	LEV	NQLEK	FDIKS	FCKIL	GPLSY	SKIKH	LR	LDG	NR	ISE	TS	LP	PD	MYE	CL	RV	ANE	VT	LN
Bovine	-----v-----n-ta-----i-v																			
Chicken	-s-----f--q--ki--pls---vv--t---t-----nltrad--qe--n-----adis-																			

Figure 7 : Comparaison des séquences nucléotidiques du lumicanne humain, bovin et de poulet. Les chiffres 1, 2, 3 correspondent aux différents motifs de répétition (LRR).

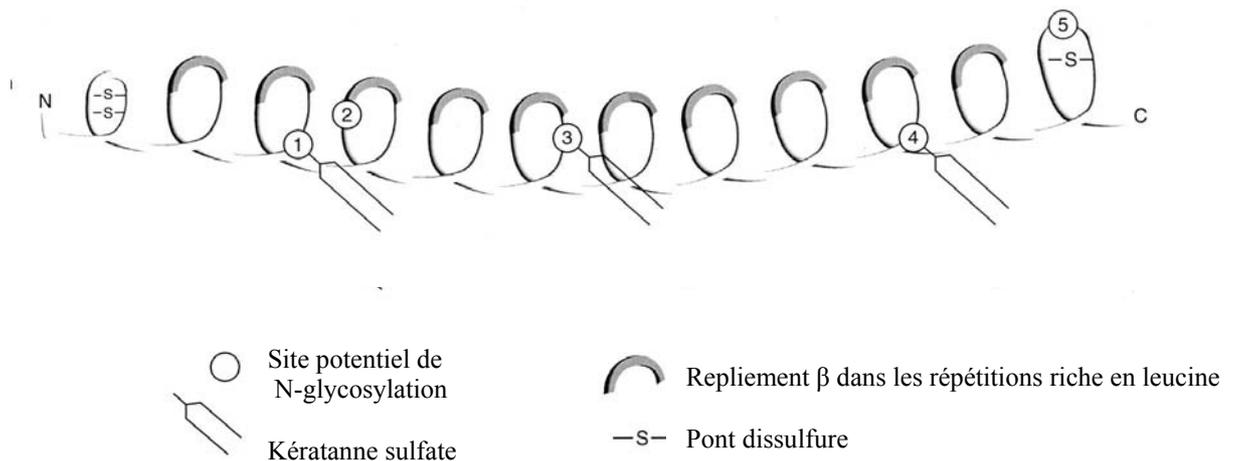


Figure 8 : Structure secondaire du lumicanne

Le gène du lumicanne humain possède un seul site d'initiation de la transcription résidant à 95 pb précédant le site d'initiation de la traduction (Grover et coll. 2000). La même chose est retrouvée dans le gène de la souris, qui possède elle aussi un seul site d'initiation de la transcription, ainsi qu'une partie 5' non-codante de 88 pb (Ying et coll. 1997). On peut noter, que chez le poulet il subsiste des différences dans la séquence génomique, celui-ci présentant plusieurs sites d'initiation de la transcription et une région 5' non-codante de plus de 300 pb (Hassell et coll. 1998). Dans le cas du gène du poulet, la partie 5' en amont du site d'initiation de la transcription présente potentiellement deux boîtes TATA en position 31 et 49 qui peuvent contrôler la transcription du gène. Chez la souris, on trouve une boîte TATA atypique (TATCA) à 27 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Ying et coll. 1997). Il faut ajouter que rien n'indique que ce site soit actif. L'étude de Grover et coll. a montré que le gène du lumicanne humain possède une séquence TATCA précédant le site d'initiation de la transcription. Bien que cet élément ne puisse initier la transcription, il est essentiel pour la transcription en collaboration avec une boîte GC qui lie les facteurs d'initiation de la transcription Sp3 (Grover et coll. 2000). Cette boîte GC (TGGGCTGGG) réside à 74 pb du site d'initiation de la transcription et il est intéressant de remarquer que cette même séquence est présente dans le gène de la souris à 80 pb et dans celui du poulet.

Une étude du promoteur sur des cellules fibroblastiques pulmonaires humaines met en évidence la présence d'un élément répresseur localisé entre la région -384 à -598 en amont du site d'initiation de la transcription. De plus, un site de liaison GATA (en position -386 à -391) a été identifié comme nécessaire pour la répression de la transcription. Cette séquence n'est pas retrouvée dans le promoteur du lumicanne de la souris et cela pourrait expliquer pourquoi le gène du lumicanne peut être exprimé dans le cartilage fœtal de souris mais pas dans le cartilage fœtal humain.

5.3) Régulation du lumicanne

Dans la littérature, peu de choses ont été écrites sur les agents capables de réguler la synthèse de l'expression du lumicanne. Ainsi, cette expression a été montrée comme étant inhibée par un traitement avec du TGF- β 1 sur des kératocytes de cornée (Funderburgh et coll. 2001). Une étude plus récente a montré que le lumicanne présentait une diminution de son expression en présence d'endogline, qui est un composant du complexe récepteur au TGF- β retrouvé à la surface des cellules endothéliales ; cette protéine agirait directement au niveau de la transcription du lumicanne (Botella et coll. 2004). L'expression du lumicanne a été rapportée comme étant régulée positivement par le TGF- β 2 (Saika et coll. 2003).

En plus des modifications d'expression du gène, on trouve des modifications au sein de la chaîne de glycosaminoglycannes ; ainsi l'étude de Melching et coll. montre que les chondrocytes sont capables de produire du lumicanne sous forme protéoglycannique possédant des chaînes de kératannes-sulfates ou de polylactosamine, et que ses chaînes peuvent subir une fluctuation au niveau de leur taille en réponse aux traitements des cellules par différentes cytokines. Ainsi on peut observer qu'un traitement avec de l'IGF-I, du TGF- β , ou du b-FGF vont augmenter la taille de ces chaînes. L'IL1- β est capable de promouvoir la sécrétion de lumicanne sous sa forme glycoprotéique (Melching et coll. 1999).

5.4) Activités biologiques

5.4.a) Interaction avec le collagène et les fibrilles de collagène

L'interaction des SLRPs avec les fibres de collagène est très importante dans l'assemblage, la maintenance et l'hydratation de la matrice extracellulaire au cours de la croissance et du développement (Iozzo 1997; Hocking et coll. 1998). Ainsi, la régulation de la fibrillogenèse du collagène de type I et II se fait par de nombreux facteurs comme les petits protéoglycannes. La décorine, par exemple, va inhiber la fibrillogenèse du collagène de type I et II dans le tendon, par une liaison corps-protéine dépendante (Vogel et coll. 1984) et plus particulièrement par la moitié de sa région C-terminale (Rada et coll. 1993; Keene et coll. 2000), en réduisant le diamètre des fibres de collagène (Vogel et coll. 1987). On peut voir chez les souris présentant une invalidation du gène de la décorine, une fragilité accrue de leur peau qui pourrait s'expliquer par une ultra-structure irrégulière du collagène (Danielson et coll. 1997). Pour la fibromoduline on se rend compte que celui-ci se fixe sur le collagène de type I et peut modifier sa fibrillation en diminuant le diamètre de ceux-ci, par le biais de son corps protéique (Hedbom et coll. 1989). Il est à noter que le biglycane n'a pas d'effet sur la formation des fibres de collagène de type I et II *in vitro* (Vogel et coll. 1984).

Une étude au microscope électronique des fibres de collagène *in vitro*, indique que les fibres formées en présence de lumicanne sont plus fines, il passe en moyenne de 320 nm à 110 nm de diamètre (Rada et coll. 1993). Cette même étude montre que le corps protéique du lumicanne qui intervient dans l'inhibition de la fibrillogenèse du collagène de type I nécessite obligatoirement la présence des ponts disulfures et que les chaînes de kératannes-sulfates pourraient jouer un rôle limitant dans l'interaction lumicanne-collagène. L'importance du pont disulfure entre les cystéines en position 41 et 53 dans la fixation du lumicanne aux collagènes est confirmée par l'étude de Carlson (Carlson et coll. 2003). L'étude de Neame et coll. montre que le site d'interaction du collagène de type I avec le lumicanne n'est pas le même que celui de la décorine, puisque ces deux SLRPs n'entrent pas en compétition. Ils montrent aussi que le lumicanne va augmenter la vitesse de

fibrillation du collagène et va être capable d'augmenter la résistance de ce collagène à la dénaturation en augmentant sa stabilité (Neame et coll. 2000). Svensson et coll. montre dans son étude que la fibromoduline et le lumicanne présentent le même site de fixation au collagène de type I et que la fibromoduline possède une plus grande affinité pour celui-ci. (Svensson et coll. 2000).

Le mécanisme par lequel ces protéoglycannes inhibent la fibrillogenèse du collagène, est encore mal connu. Ils pourraient peut être intervenir soit dans la zone de formation du « nucleus », soit lors de l'assemblage des fibres intermédiaires durant le début la phase de latence.

On peut donc conclure que le lumicanne, comme la décorine et la fibromoduline, est un inhibiteur de l'assemblage latéral des molécules de collagène. Ceci est confirmé par l'étude sur les souris invalidées sur un ou deux allèles du lumicanne ; on peut voir ainsi au niveau de la sclère une augmentation de la taille des fibres de collagène, entraînant par la suite des déficiences visuelles comme la myopie (Austin et coll. 2002). A cela s'ajoute un effet observable au niveau de la résistance de la peau, qui est diminuée chez ces souris « nulles » en lumicanne.

5.4.b) Rôle dans la minéralisation

Raouf et coll. ont observé par RT-PCR (Raouf et coll. 2002) que des cellules d'ostéoblastes MC3T3 E1 ont une expression du gène de lumicanne qui augmente graduellement dans le temps lors des étapes de différenciation et de minéralisation du tissu osseux.

5.4.c) Le lumicanne dans le contrôle de la prolifération et l'adhésion cellulaire

Après avoir démontré le rôle du lumicanne dans la fibrillogenèse du collagène, il apparaît que le lumicanne se lie et interagit avec de nombreuses autres protéines vitales qui sont non seulement impliquées dans l'organisation de la matrice, mais aussi dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'adhésion et la morphogénèse des tissus. Ainsi, des études très récemment menées par Ishiwata et coll. et Vij et coll. montrent que le lumicanne supprime la prolifération cellulaire (Ishiwata et coll. 2004; Vij et coll. 2004) et que cet effet serait la conséquence d'une augmentation du processus d'apoptose. L'étude de Funderburgh (Funderburgh et coll. 1997) montre elle qu'un tapis de lumicanne sous forme glycoprotéique ou de corps protéique augmente l'adhésion ainsi que l'étalement des macrophages. On peut voir que le processus de cicatrisation induit par les kératocytes peut être inhibé par l'absence d'expression de lumicanne (Sundarraj et coll. 1998).

5.5) Rôle du lumicanne dans les tissus

5.5.a) Fonction dans la cornée

Le lumicanne a été le premier petit protéoglycane co-localisé avec les fibres de collagène dans le stroma cornéen. Le lumicanne est un constituant majeur du stroma cornéen, où il joue un rôle significatif dans l'acquisition de la transparence de la cornée par régulation du diamètre des fibres de collagène de type I et de l'espace interfibrillaire (Hassell et coll. 1983; Rada et coll. 1993). La transparence cornéenne va être dépendante du petit diamètre (20nm) et de l'arrangement très régulier des fibres de collagène dans le stroma cornéen (Maurice et coll. 1984).

Cette fonction du lumicanne est confirmée par l'analyse de plusieurs pathologies, comme la sclérose où l'on remarque la désorganisation du réseau de fibres de collagène en même temps qu'une disparition des protéoglycannes riches en kératanes-sulfates (Borcherding et coll. 1975). De plus, chez les souris, on a pu voir qu'une mutation récessive sur le chromosome 10 affecte à la fois les yeux, les reins et le développement des membres ; les yeux peuvent alors présenter une opacité cornéenne. Il est donc possible que cette mutation soit due à une altération du gène codant pour le lumicanne qui est localisé lui aussi sur la région distale du chromosome 10 (Funderburgh et coll. 1995).

L'étude de la sclère chez les souris Lum^{-/-} ne montre pas de différence significative au niveau de son architecture en comparaison des souris sauvages. Mais, si on procède à un double « knock-out » chez ces souris, en inhibant simultanément l'expression du lumicanne et de la fibromoduline, on peut voir alors un effet en synergie de ces deux SLRPs. Ainsi, ces souris présentent tous les symptômes de la haute-myopie, ce qui se caractérise par un changement des fibres de collagènes dans la sclère, par un amincissement de celle-ci, par un détachement rétinien et par une augmentation de la taille de l'axe oculaire tout cela en comparaison avec des souris sauvages (Chakravarti et coll. 2003). Le lumicanne et la fibromoduline sont donc des gènes candidats potentiels pouvant influencer la haute myopie. La localisation sur le locus 12q21.2-22 des gènes de la haute myopie (MYP3) est similaire à celle des gènes SLRPs comme la décorine, le kératocanne et le lumicanne.

5.5.b) Rôle dans la peau

Une invalidation totale du lumicanne, sur des souris homozygotes lum^{-/-} montre des effets majeurs au niveau de leur peau. Ainsi, l'invalidation de ce gène entraîne chez les souris une résistance de la peau à la traction diminuée de 86% (Chakravarti et coll. 1998), ce qui confirme bien l'importance de ce petit protéoglycane dans la stabilité cutanée.

5.6) Lumicanne et cancer

La première étude qui s'est penchée sur l'influence de l'expression du lumicanne dans le développement tumoral, date de 1998. Lors de cette étude, Leygue et coll. ont détecté et localisé l'expression de cette protéine sous sa forme glycoprotéique dans les tissus sains et tumoraux mammaires. Ils ont ainsi montré qu'un fort taux d'expression du lumicanne était associé avec un mauvais pronostic tumoral (Leygue et coll. 1998). Il faut remarquer que le tissu mammaire sain n'exprime pas ou peu de biglycane et de fibromoduline, mais par contre produit du lumicanne et de la décorine qui sont sécrétés exclusivement par les fibroblastes adjacents à l'épithélium. Ainsi, lors du développement tumoral, on peut voir une augmentation du taux de lumicanne et une diminution du taux de décorine. Le lumicanne et la décorine apparaissent donc inversement régulés dans la tumorigénèse mammaire. Par la suite, l'étude de Troup et coll. a montré que la réduction de l'expression de lumicanne au sein de tumeurs mammaires était associée à un volume tumoral plus important, et à une augmentation de la réponse inflammatoire. De même, un faible taux de décorine est associé à un temps de progression très court et à une survie à long terme basse. Les auteurs ont donc conclu qu'une expression à un faible taux des SLRPs dans le cancer du sein peut être associée avec un très mauvais pronostic pour les carcinomes des ganglions lymphatiques invasifs mammaires (Troup et coll. 2003).

Le rôle du lumicanne lors du développement tumoral a été mis en évidence dans d'autres tissus. Ainsi, l'expression de ce SLRP sous sa forme glycoprotéique est assez faible dans le tissu colorectal sain et son expression est fortement augmentée autour des fibroblastes adjacents à la tumeur. Lu et coll. concluent que l'accumulation de lumicanne pourrait contribuer à la croissance des cellules squameuses tumorales ou à l'invasion du tissu stromal adjacent (Lu et coll. 2002). L'expression du lumicanne sous forme glycoprotéique est aussi détectée dans le pancréas sain au niveau des îlots alpha ; cette expression est augmentée lors du processus tumoral (Lu et coll. 2002).

III Vieillessement cutané

1 Vieillessement chronologique

1.1) Généralités

La peau des différentes parties du corps a un vieillissement très hétérogène, ce qui rend difficile son analyse. De plus, la peau est un organe complexe dont le rôle majeur est d'assurer la protection du corps contre les agressions extérieures. A cause de cette situation très particulière, le vieillissement de la peau résulte de la superposition d'un vieillissement dit « intrinsèque » supposé correspondre au vieillissement chronologique et de facteurs dits « extrinsèques » dus en grande partie à l'action du rayonnement ultraviolet émis par le soleil.

Dans le vieillissement « intrinsèque », interviennent des facteurs génétiques, mais aussi probablement d'autres facteurs comme des affections endocriniennes, rénales, hépatiques, les modifications hormonales entourant la ménopause, ainsi que les événements physiologiques.

Parmi les facteurs « extrinsèques », le plus important est l'exposition solaire qui est responsable d'altérations cliniques et histologiques caractéristiques auxquelles a été donné le nom d'héliodermie. Grossièrement, l'épiderme s'amincit au dépend des cellules du corps muqueux de Malpighi avec une diminution de la cohésion et de turn over des cornéocytes, diminution des mélanocytes et des cellules de Langerhans. La jonction dermo-épidermique s'aplatit. Le derme s'atrophie avec raréfaction des fibroblastes, des mastocytes et des vaisseaux sanguins. La réduction de la quantité de protéoglycannes est en partie responsable de l'altération des propriétés visco-élastiques de la peau (Longas et coll. 1987). Le collagène dermique devient moins soluble (Kambayashi et coll. 2001). Les fibres élastiques du derme superficiel disparaissent de façon très inégale alors que celles du derme moyen et profond apparaissent plus denses essentiellement du fait de l'atrophie dermique. Si l'aspect histologique des fibres élastiques paraît normal, leur fonction est probablement altérée comme le suggèrent les anomalies observées en microscopie électronique et la diminution d'élasticité du revêtement cutané avec l'âge (Rao et coll. 2000).

1.2) Les effets de l'âge sur la synthèse des glycosaminoglycannes et protéoglycannes

Le vieillissement chronologique est un sujet qui est étudié depuis un certain nombre d'années, on peut voir que les modifications dans l'expression des glycosaminoglycannes et des protéoglycannes au cours de ce processus touchent à la fois la concentration, la structure et la localisation. On peut aussi remarquer que ces résultats varient en fonction du modèle étudié. En général, il a été observé une baisse du taux global des glycosaminoglycannes avec l'âge, comme par

exemple dans la capsule du cristallin (Winkler et coll. 2001). Par contre, on a rapporté une augmentation du taux de dermatanne-sulfate et de kératanne-sulfate à partir de 45-50 ans chez les fibroblastes dermiques. Une augmentation de l'acide uronique chez le sujet âgé et une baisse de la quantité de chondroïtine -4 et -6 sulfate dès 40 ans ont été signalés (Fodil-Bourahla et coll. 1999). La quantité d'acide hyaluronique, d'héparine et d'héparanne-sulfate semble diminuer aussi avec l'âge dans ce modèle d'étude (Sames 1994).

Dans un modèle de cellules fibroblastiques en sénescence, Fodil-Bourahla et coll. ont observé une augmentation de l'acide hyaluronique avec le nombre de passage (Fodil-Bourahla et coll. 1999), ce qui incite à dire qu'il y aurait une augmentation de la dégradation avec l'âge au sein des tissus. En prenant comme modèle d'étude des chondrocytes cultivés en gel tridimensionnel, Kamada et coll. ont observés une augmentation de l'acide hyaluronique avec l'âge (Kamada et coll. 2002), alors que Meyer et coll. n'ont pas observé de différence significative de cette synthèse au sein de la peau en fonction de l'âge. Ces auteurs concluent que l'acide hyaluronique ne serait plus associé au tissu avec l'âge (Meyer et coll. 1994).

En plus des modifications de la concentration des GAGs, on trouve aussi des modifications au niveau de la structure. Ainsi, une augmentation de la 4 sulfatation avec l'âge et de l'épimérisation de résidu D-glucuronosyl en résidu de L-iduronosyl a été rapportée (Passi et coll. 1997). Ils ont aussi signalé des modifications avec l'âge de la structure mais pas de la taille de la chaîne de kératanne-sulfate de la fibromoduline avec l'âge dans le cartilage articulaire (Lauder et coll. 1998).

L'étude de l'expression des protéoglycannes de la peau, a montré pour le versicanne, qui est un composant majeur, un fort marquage dans les tissus fibroblastiques des sujets jeunes par rapport au sujets âgées (Ito et coll. 2001). Il a été observé pour ceux présentant des chaînes de dermatanne-sulfate et de chondroïtine-sulfate une augmentation de leur proportion par rapport aux autres protéoglycannes suivant l'âge, et des modifications au niveau de leurs chaînes de galactosaminoglycannes riches en sulfate et en résidus iduroniques, ainsi qu'une baisse du nombre de chaînes non-sulfatées (Passi et coll. 1997).

Des études, ont montré dans un certain nombre de modèles d'étude que l'expression de la décorine était fortement augmentée avec l'âge et ceci comme par exemple dans la peau de rat (Ito et coll. 2001), dans les fibroblastes de peau humaine sénescence (Passi et coll. 1997), dans le ménisque humain (McAlinden et coll. 2001), dans des cartilages articulaires humains (Roughley et coll. 1993), dans les cartilages du condyle (Del Santo et coll. 2000), au sein des disques temporomandibulaires de rat en croissance (Kuwabara et coll. 2002) et au niveau des cartilages des membres (Roughley et coll. 1993; Del Santo et coll. 2000). Ont été également rapportées des

modifications au niveau de sa localisation, comme par exemple au sein des disques temporomandibulaires de rat en croissance (Kuwabara et coll. 2002). Nomura et coll. ont rapporté aussi des changements structuraux de la décorine avec l'âge au sein de la peau de rat. Ainsi en Western-blot, la masse protéique passe de 110 à 70 kDa, sans changement de taille du corps protéique. Il y a donc une diminution de la taille des chaînes de glycosaminoglycannes. Les auteurs de cette étude concluent que les modifications au niveau de la taille de la chaîne de glycosaminoglycannes influeraient la structure du réseau de collagène (Nomura et coll. 2003).

De plus, le rapport biglycane sur décorine augmenterait jusqu'à 40 ans environ et diminuerait par la suite (Rada et coll. 2000). En fait, cette expression dans la peau humaine ne semble pas présenter de différence significative avec l'âge (Carrino et coll. 2000), en revanche au sein des disques temporomandibulaires de rat en croissance (Kuwabara et coll. 2002) et dans le cartilage articulaire humain (Roughley et coll. 1994), on a signalé une baisse graduelle de l'expression du biglycane avec l'âge.

Comme pour la décorine, le biglycane présente dans le processus de vieillissement une diminution de la taille de sa chaîne de dermatane-sulfate (Melching et coll. 1989). On a démontré par une étude immunohistochimique que le biglycane était augmenté au sein du cartilage articulaire humain avec l'âge. Chez le sujet jeune, seule la forme protéoglycannique est retrouvée (Roughley et coll. 1993).

Les protéoglycannes à kératane-sulfate ne sont pas présents chez le fœtus de souris et apparaissent par la suite avec une augmentation quantitative et en taille (Ying et coll. 1997). Dans beaucoup de tissus, la présence de kératane-sulfate est fonction de l'âge ; ainsi dans le cartilage, on peut constater que la fibromoduline et le lumicanne sont retrouvés sous leurs formes protéoglycanniques chez les sujets jeunes, et seulement sous leurs formes glycoprotéiques chez le sujet âgé (Grover et coll. 1995; Roughley et coll. 1996). Cela peut s'expliquer soit par une diminution de la sulfatation des chaînes de kératanes-sulfates ou alors par une dégradation accrue avec l'âge (Melching et coll. 1999).

Saamanen et coll. ont montré que l'expression de la fibromoduline au niveau de l'épiphyse du genou était diminuée de 35% avec l'âge (Saamanen et coll. 2001). Pour le lumicanne, il n'existe pas d'étude présentant son expression en fonction de l'âge. L'expression du taux d'ARNm et de protéine du lumicanne est augmentée entre le 9^{ème} et le 18^{ème} jour de développement de la cornée chez l'embryon de poulet (Cornuet et coll. 1994). Celui-ci est retrouvé sous sa forme glycoprotéique du 7 au 18^{ème} jour. La forme protéoglycannique n'est retrouvée qu'à partir du 15^{ème} jour, ce qui correspond à l'apparition de la transparence cornéenne. Cela suggère que la présence de

chaînes de kératannes-sulfates dans le lumicanne est nécessaire dans le développement de la transparence cornéenne.

2) Vieillissement photo-induit

2.1) généralités

L'exposition au soleil peut induire des effets rapides et profonds sur l'organisme. On parle alors de réaction « aiguë ». Ceci englobe la réaction inflammatoire et les événements immunologiques qui en découlent. La photosensibilité et les brûlures conduisent à la formation d'érythèmes et d'œdèmes. Il se produit également des effets à long terme qui ont pour conséquences le vieillissement et les cancers cutanés.

2.2) Caractéristiques des rayonnements ultraviolets

Il existe trois types d'UV : (Figure 9)

- Les UVC (100-280 nm), aussi appelés radiations germicides ; ils ne parviennent pas au niveau terrestre, car ils sont « normalement » stoppés par la couche d'ozone.

- Les UVB (280-315 nm) sont absorbés par l'ADN, qui est leur principale chromophore (Parrish et coll. 1982). Ce sont les rayonnements les plus actifs. Les UVB pénètrent seulement jusqu'à la limite supérieure du derme (Everett et coll. 1966). Ils sont responsables d'érythèmes, de cancers cutanés et d'altérations immunologiques.

- Les UVA (315-400 nm) sont plus abondants que les UVB. Ils pénètrent profondément dans le derme où ils sont absorbés, au niveau de chromophores cellulaires (flavines, porphyrines,...) (McGrath 1994). Les UVA sont toxiques et provoquent très rapidement des oedèmes (Tyrrell et coll. 1987). Ils sont capables d'induire des érythèmes, réactions photo-allergiques, vieillissement actinique et jouent probablement un rôle dans l'induction des cancers cutanés.

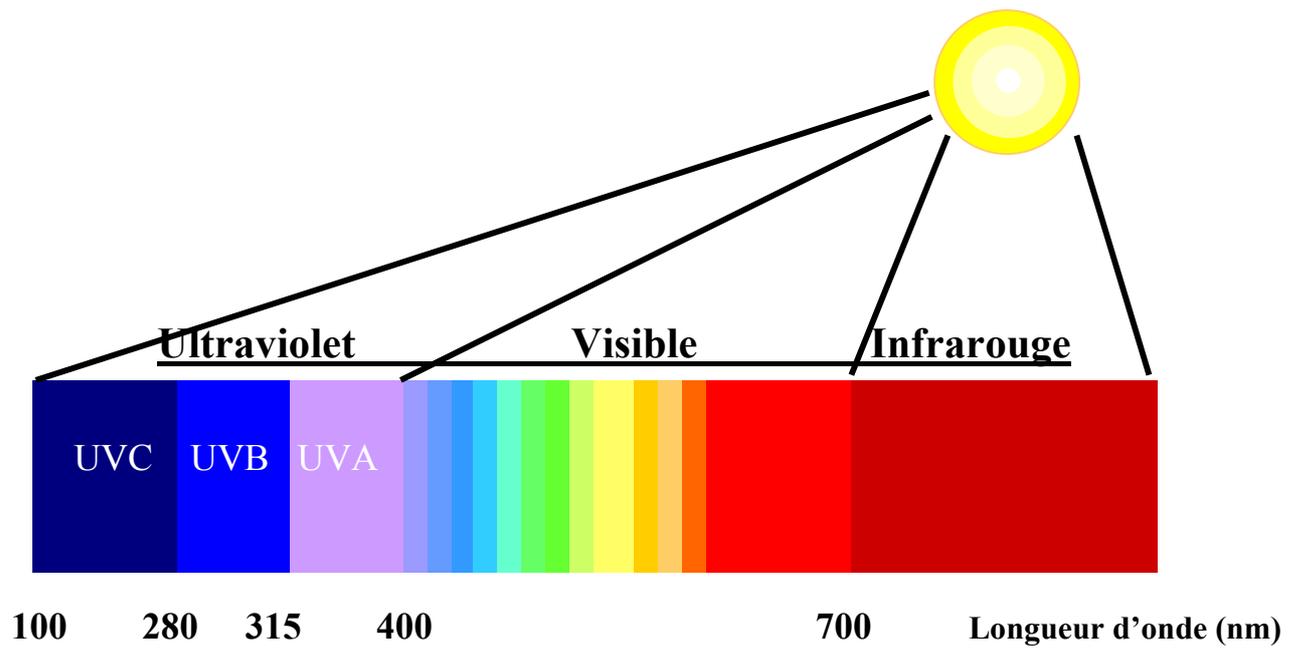


Figure 9 : Schéma représentant le spectre de la lumière

3) Effets à court terme des UV

3.1) Effets inflammatoires

Les brûlures dues à une exposition solaire sont caractérisées par la formation d'érythèmes et d'œdèmes cutanés. Ces manifestations cliniques s'accompagnent de changements histologiques et d'infiltrats inflammatoires au niveau de l'épiderme et du passage de cellules (mastocytes et lymphocytes T) dans le derme. Les irradiations solaires endommagent également l'ADN (Herbert et coll. 1994), l'ARN (Kartasova et coll. 1988) et activent la synthèse, par les kératinocytes, de nombreuses cytokines et médiateurs de l'inflammation. Les modifications de l'ADN se font par la formation de dimères de pyrimidine et par l'hydratation des bases ainsi que la formation de liaison anormale entre les bases (Grebneva 1994). Ces altérations peuvent produire des mutations (Barsalou et coll. 1994).

3.2) Altérations histologiques

Les UVB sont responsables de l'augmentation de la perméabilité cellulaire consécutive à l'altération de la membrane plasmique (Hightower et coll. 1994). Cette dégradation de la membrane est due à l'altération du métabolisme des phospholipides par les UVB (DeLeo 1988) et à la formation de corps cytoplasmiques denses. L'ensemble de ces phénomènes conduisent à la formation d'œdèmes et à la mort cellulaire.

La stimulation des kératinocytes par les UVA provoque, dans ces cellules, l'inhibition de la synthèse de diacylglycérol, qui conduit à la perméabilisation des membranes donc à la dégradation cellulaire (Djavaheri-Mergny et coll. 1994). Ce phénomène aboutit à l'augmentation de la perméabilité des cellules de la peau, qui ne peut plus jouer son rôle de barrière cutanée.

3.3) Photosensibilité

Il s'agit d'une réaction anormale de l'organisme après une exposition au soleil. Il peut se produire un désordre phototoxique ou photoallergique. Dans le premier cas, la réaction provient de l'interaction du soleil avec un agent photosensible. Ce sont des agents polycycliques tels que des sulfones, des tétracyclines ou bien des psoralènes. Ils sont capables d'absorber les UVA et vont ensuite être à l'origine de la formation d'érythèmes, de phlyctènes, d'une fragilisation et d'une hyperpigmentation de la peau.

Dans le deuxième cas, la photo-allergie, il y a intervention du système immunitaire.

3.4) Altérations immunologiques

Les UV participent à la réponse immune par leur effet stimulant sur la synthèse de cytokines. L'immunosuppression due aux UVB se manifeste par un amoindrissement de la résistance de l'organisme aux maladies infectieuses (Goettsch et coll. 1994).

4) Effets à long terme des UV

4.1) Photocarcinogénèse

L'ensemble des réactions observées après irradiation peut être à l'origine de la formation de tumeurs et du développement de cancers cutanés (Grabbe et coll. 1994). Ceci est fonction de la dose d'UV absorbée au cours du temps, de l'épaisseur et de la couleur de la peau ainsi que des agents carcinogènes présents dans l'air et sur la peau (Cascinelli et coll. 1989). Les prédispositions génétiques et l'induction de proto-oncogènes, comme c-fos (Roddey et coll. 1994), sont autant de facteurs intervenant sur le développement d'un cancer cutané.

Les UV sont à l'origine de la plupart des cancers de la peau. Ce sont les UVB qui sont les plus carcinogènes (van der Leun 1984), mais à forte dose, les UVA le sont également (Sternberg et coll. 1990) et plus particulièrement pour le développement des mélanomes malins (Moan 1994).

4.2) Vieillesse cutané photo-induit

Le vieillissement cutané est provoqué par la combinaison de l'âge et des altérations cutanées dues au soleil. Il se produit une désorganisation du tissu conjonctif accompagnée d'une dégénérescence des fibres de collagène due à la stimulation de l'expression de gélatinases après irradiation (Koivukangas et coll. 1994). Ce vieillissement est également provoqué par l'altération de gènes impliqués dans la croissance, par la différenciation, par l'immunomodulation, par la réponse aux UV dans la peau et par la diminution de l'oxygénation cutanée (Gilchrest et coll. 1994).

Les UVA affectent essentiellement le derme (Bernerd et coll. 1998), cela se traduit par une diminution du nombre de fibroblastes dans le derme par induction de l'apoptose. Néanmoins, les fibroblastes situés en profondeur, qui échappent à ce phénomène, recolonisent progressivement le derme lésé au cours d'un processus qui rappelle la réparation et la régénération *in vivo*.

5) Effet des UV sur la synthèse des glycosaminoglycannes et des protéoglycannes

L'irradiation de peau humaine et de souris par des UV montre des altérations des propriétés mécaniques de la peau, ainsi que l'apparition de rides. Cette apparition est corrélée avec un altération des fibres de collagène (Nishimori et coll. 2001), mais elle pourrait aussi être due à une altération de l'expression des protéoglycannes de la peau.

Ainsi, lors d'une exposition avec des UVA ou B de la peau de souris, on observe une augmentation de l'acide hyaluronique, du dermatanne-sulfate et de la chondroïtine-sulfate dans le derme profond (Shwartz et coll. 1988; Takahashi et coll. 1995; Koshiishi et coll. 1999). Bisset et coll. montrent que l'augmentation des glycosaminoglycannes est plus importante pour une exposition entre 295 et 300 nm et qu'une exposition supérieure à 310 nm présente moins d'effet (Bissett et coll. 1989). Cette effet stimulateur des UV sur la synthèse des glycosaminoglycannes est controversé, car Chatterjee et coll. ont montré qu'une peau exposée aux UV ne présentait pas d'augmentation de la quantité de glycosaminoglycannes si on la compare avec la masse de la peau (Chatterjee et coll. 1990). Mais on trouve une augmentation des glycosaminoglycannes si on les compare à la surface de la peau.

La synthèse des protéoglycannes de la peau sur des souris exposées à un rayonnement UVB étalé sur 10 semaines, montre une augmentation de l'incorporation globale de ³⁵S, mais aussi une augmentation de la masse des protéoglycannes (Margelin et coll. 1993). Le taux de syndecanne-1, ne semble pas modifié par un traitement aux UV (Kikuno et coll. 1998). L'étude sur certains petits protéoglycannes a permis d'observer une baisse de la quantité de la décorine après un traitement UV dans les zones d'élastolyse solaire alors que le versicanne qui est un gros protéoglycanne augmente dans des fibroblastes en culture et dans la peau (Bernstein et coll. 1995). Dans la cornée, l'expression du gène de biglycane n'est pas détectable, mais si on expose une cornée à un rayonnement UV, on peut voir après sept jours une augmentation de l'expression de celui-ci et un retour au taux initial par la suite. Le biglycane serait donc nécessaire au processus de la réparation cornéenne (Podskochy et coll. 2004). Tasheva et coll. ont montré que l'expression du mimecane est inhibé, après l'exposition aux UVC de kératocytes humains. De plus, ces auteurs ont observé que ces UV étaient capables de réguler négativement l'expression du gène du lumicanne pendant les 48 premières heures qui suivent l'exposition des kératocytes humains (Tasheva et coll. 2003).

IV Mélanome

1) Définition

Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes de la couche basale de l'épiderme. Il s'agit du cancer cutané le plus agressif avec un haut potentiel invasif et métastatique.

Il représente la première cause de mortalité par cancer cutané (taux de mortalité en France est de 1,5 /100 000 habitants par an). Son incidence est de 10 /100 000 habitants par an et celle-ci augmente régulièrement de 10% tous les ans (Thomas 2002). Une telle évolution suggère qu'une personne sur 75 née en 2000 développera un jour un mélanome.

2) Facteurs de risque

2.1) Facteurs constitutionnels

On retrouve comme facteurs constitutionnels le phototype : les individus à peau claire, qui bronzent difficilement, et/ou qui brûlent au soleil (phototypes I et II de Fitzpatrick) sont plus exposés au mélanome que les individus qui bronzent facilement (phototypes III et IV de Fitzpatrick) (Doré 1990).

Parmi ces facteurs, on retrouve le fait d'avoir des cheveux roux ou blonds, la tendance à développer des éphélides, la présence de *Naevi* atypiques et/ou congénitaux (Marghoob et coll. 1994), ainsi que des antécédents familiaux de mélanome, en particulier dans la parenté de premier degré où le risque de mélanome augmente d'environ 2 à 3.

2.2) Facteurs liés à l'environnement

Comme il a été dit dans le chapitre précédent, les rayons UV naturels (UVB) (3.1) *Photocarcinogénèse*) sont un des principaux facteurs étiologiques du mélanome. Il existe une association entre la latitude de résidence et l'incidence du mélanome dans les populations blanches, et une association entre la résidence à faible latitude et le risque de mélanome.

Enfin, des études cas-témoins en Europe et en Australie ont identifié l'exposition récréative au soleil (pendant les loisirs) comme un facteur de risque de mélanome.

Une étape importante de l'initiation du mélanome paraît se situer dans l'enfance. Plusieurs études épidémiologiques chez des migrants vers les pays ensoleillés (Australie, Israël, Sud des Etats Unis) ont montré que le risque de mélanome était accru par une migration à un âge précoce. De même, une étude comparant des Israéliens et des Australiens avec des immigrés, ont montré que

l'incidence du mélanome était plus importante dans le groupe des natifs du pays concerné (Anaise et coll. 1978; Cooke et coll. 1985)). L'étude d'Autier et coll, a montré qu'il existait une association entre le risque de mélanome et les coups de soleil reçus dans l'enfance (Autier et coll. 1998).

3) Diagnostic de la tumeur primitive

L'attitude standard devant une lésion suspecte de mélanome implique l'exérèse limitée mais complète, passant au-delà des limites macroscopiques, jusqu'à l'hypoderme inclus. On détermine alors :

3.1) Mesure de l'épaisseur selon la méthode de Breslow (Breslow 1970) (figure 10)

Mesure, sur coupe histologique standard au microscope oculaire, en millimètres, de l'épaisseur maximum. On mesure celle-ci depuis la couche granuleuse de l'épiderme jusqu'à la cellule maligne la plus éloignée en profondeur. Cette index permet donc d'évaluer l'évolution de la maladie.

Index de Breslow

Epaisseur : < 0,75 mm

Entre 0,76-1,49

Entre 1,5-2,49

Entre 2,5-3,99

Epaisseur > 4 mm

Niveaux d'invasion de Clark et Mihm (Clark et coll. 1969)

Cette index permet d'évaluer le niveau d'atteinte des différentes structures cutanées.

Stade I : Les mélanocytes malins sont cantonnés à l'épiderme

Stade II : Invasion débutante du derme papillaire, sans comblement ni présence de mélanocytes à l'interface entre le derme papillaire et le derme réticulaire

Stade III: Le derme papillaire est comblé et les mélanocytes malins sont présents au contact du derme réticulaire qui n'est pas infiltré

Stade IV : Atteinte du derme réticulaire

Stade V : Le tissu adipeux hypodermique est infiltré

3.2) Evolution

Dans un premier temps, les cellules cancéreuses ont une progression superficielle et présentent une croissance tumorale horizontale sans caractère métastatique. Dans un deuxième temps, la croissance cellulaire devient verticale tout en prenant des caractères malins et métastatiques. Le développement de la tumeur passe par l'invasion des ganglions lymphatiques ainsi que des vaisseaux sanguins. Les localisations secondaires sont principalement pulmonaires, hépatiques et cérébrales.

3.3) Détermination du type histogénique (Clark et coll. 1969; McGovern et coll. 1973) et anatomoclinique de mélanome (Figure 10, (Thomas 2002))

3.3.a) Mélanome à extension superficielle ou Superficial Spreading Melanoma (SSM) :

Ce mélanome présente une composante mélanocytaire intra-épidermique latéral pagetoïde. Ce diagnostic est possible quel que soit le site de la lésion. La lésion peut comporter un nodule et ne posséder de composante latérale que d'un seul côté ou être entourée par un halo de régression.

Constituant 60 à 70% des mélanomes, il s'observe à tous les âges, surtout au cours des quatrième et cinquième décennies. Il touche plus volontiers le dos de l'homme et les jambes de la femme. Il croît en deux temps, tout d'abord une phase de croissance horizontale, de 1 à 7 ans, puis une phase de croissance verticale. L'apparition d'un nodule ou d'une ulcération signent le passage à la phase d'extension verticale.

3.3.b) Mélanome acro-lentigineux (ALM) (Weyers et coll. 1999)

Ce mélanome est une lésion située en peau glabre ou en muqueuse avec une composante intra-épidermique latérale lentigineuse (cellules isolées le long de la basale). Le nodule, lorsqu'il existe, est souvent fait de cellules fusiformes. La régression est possible .

Ce type de mélanome correspond à 10% des mélanomes dans la population blanche. Il existe deux phases de développement : une phase superficielle longue et une phase verticale agressive. La localisation préférentielle se situe aux extrémités des membres, au niveau palmo-plantaire, voire sous-unguéal, où il réalise une pigmentation longitudinale extensive n'avançant pas avec la poussée de l'ongle.

3.3.c) Mélanome sur mélanose de Dubreuilh ou lentigo maligna melanoma (LMM) ou Hutchinson melanotic freckle-melanoma.

Il s'agit d'une lésion du visage de peau sénile (joue et front) ; une faible proportion (10%) survient dans des sites extra-faciaux tels que la main ou les jambes. En revanche, il existe des dommages actiniques majeurs (élastoses) et la composante intra-épidermique latérale est lentigineuse.

Le nodule, lorsqu'il existe, est souvent fait des cellules fusiformes. Une régression partielle est fréquente. Il faut rechercher une composante desmoplastique qui augmente l'agressivité de la lésion.

Dans cette variété, il existe une phase de croissance horizontale ou *in situ*, qui est la mélanose de Dubreuilh ou *lentigo maligna*. En comparaison avec la phase horizontale du mélanome à extension superficielle, cette phase est beaucoup plus longue.

Les patients ont plus de 60 ans, ils sont généralement plus âgés que les patients présentant les autres types de mélanome. Beaucoup des facteurs de risque suggèrent que cette variété de mélanome présente un certain nombre de similitudes avec le carcinome spinocellulaire.

3.3.d) Mélanome Nodulaire (NM)

Il s'agit d'un mélanome sans composante intra-épidermique latérale. Il constitue 7 à 10% des mélanomes. Il se présente surtout dans les cinquième et sixième décennies. Il est plus fréquent chez l'homme, au niveau du tronc, de la tête et du cou. Sa progression est d'emblée verticale.

4) Le mélanome et les protéoglycannes

Les glycosaminoglycannes des cellules de mélanome humain ont été identifiés initialement par Banks en 1976, qui a mis en évidence la biosynthèse d'acide hyaluronique, d'héparane-sulfate et de chondroïtine-4-sulfate (Banks et coll. 1976). Le mélanome exprime majoritairement deux protéoglycannes transmembranaires à chondroïtine-sulfate : le NG2 et le CD44, qui vont intervenir dans les interactions cellules-matrice (Iida et coll. 1996). Des études préliminaires ont montré que des lignées de cellules de mélanome présentant différents potentiels métastatiques, exprimaient une forte proportion de protéoglycannes à chondroïtine-sulfate ainsi que des protéoglycannes de faible masse moléculaire (Caux et coll. 1990). Ainsi, l'expression et la localisation de l'ARNm et de la protéines-coeur de la décorine au sein des cellules de mélanome humain et de xélogreffe de mélanome, ont été détectées (Ladanyi et coll. 2001). Il subsiste bien d'autres protéoglycannes qui sont sécrétés par le mélanome, comme le perlecanne, qui est un protéoglycanne qui va intervenir dans la croissance et l'invasion de cellules cancéreuses en séquestrant des facteurs angiogéniques

comme le b-FGF (Iozzo et coll. 1994). Son expression est augmentée dans les mélanomes métastatiques (Cohen et coll. 1994). De plus, en supprimant l'expression de ce protéoglycane, on observe une diminution de la croissance cellulaire, de l'invasion et de l'angiogénèse (Adatia et coll. 1997).

5) Mélanome et apoptose

5.1) Généralités sur l'apoptose

Soumise à une agression quelconque susceptible d'altérer leur intégrité, les organismes répondent en développant des systèmes de défense et de réparation, comme le système immunitaire par exemple, ainsi que des systèmes de contrôle de qualité, visant à tester l'intégrité de leur structure et à stopper toute division cellulaire supplémentaire pour laisser le temps aux enzymes de réparation d'accomplir leur travail. Lorsque le signal de mort est impératif ou que les dégâts constatés sont trop importants, un processus de suicide cellulaire est enclenché, l'apoptose.

Cette notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr et coll. (Kerr et coll. 1972), et signifie en grec : *chute des feuilles en automne*, cela veut dire que ce processus de mort programmé est inéluctable. L'apoptose a été comparée à un suicide cellulaire, une autodestruction de la cellule sans léser les cellules environnantes, et en préservant le tissu et l'organisme.

Ce processus diffère de la nécrose : il n'y a pas de libération de facteur toxique, car il n'y a pas rupture de la membrane, et par conséquent pas de phénomène inflammatoire. Il se produit une perte d'eau et d'électrolytes avec une réduction du volume cellulaire. De plus, il y a désorganisation du cytosquelette avec apparition de protubérances membranaires. Il y a également condensation de la chromatine suivie d'une fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes, sous l'action d'endonucléases Ca^{2+} - Mg^{2+} dépendantes (Wyllie et coll. 1980; Wyllie et coll. 1984). On peut voir aussi la fragmentation de l'ensemble de la cellule en corps apoptotiques qui contiennent des organites cellulaires et des fragments de noyau entourés de membranes. La membrane plasmique ne se rompt pas, donc elle n'est pas perméable, mais elle perd son asymétrie normale. Les organites restent tous intacts sauf les mitochondries. Par la suite, la cellule est soit phagocytée par des macrophages, soit détruite lors du phénomène de nécrose secondaire.

Il existe deux voies majeure d'initialisation pour déclencher l'apoptose. Celle-ci peut survenir du fait du retrait d'un signal de survie tel que le tarissement d'une hormone, d'un facteur de croissance ou d'un contact intercellulaire. D'autre part, l'apoptose peut être déclenchée par de nombreux stimuli, comme la sollicitation des récepteurs membranaires (Fas, TNF-R) ou nucléaires

(glucocorticoïdes) ou l'exposition à des stress divers (radiations ionisantes, hypoxie, hyperthermie, xénobiotiques comme les agents anticancéreux).

On a pris conscience que le phénomène apoptotique était impliqué dans de nombreux processus pathologiques, soit par activation excessive comme dans les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique, maladie de Huntington, maladie d'Alzheimer), dans les lésions neurologiques ou cardiaques faisant suite à un accident ischémique, dans les hépatites virales ou le sida, soit par défaut d'intervention conduisant au développement de tumeurs malignes.

5.2) Les différentes voies connues de l'apoptose

Actuellement 2 grandes voies majeurs :

5.2.a) La voie mitochondriale (figure 11, (Pope 2002))

Suite au déclenchement d'un signal apoptotique le cytochrome C est relargué dans le cytoplasme (Kluck et coll. 1997), alors qu'il se trouve normalement localisé entre les membranes mitochondriales interne et externe. Par la suite, il se complexe à une molécule de pro-caspase 9 et son cofacteur APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor) pour former un complexe que l'on nomme l'apoptosome. Une fois formé, la pro-caspase 9 est activée en caspase 9. Cette caspase 9 active la pro-caspase 3 en caspase 3, ce qui aboutit l'apoptose cellulaire.

Physiologiquement, la fluctuation du taux de cytochrome C est étroitement régulée, en particulier par des molécules de la famille Bcl2. Cette grande famille est composée de molécules à effet anti-apoptotique comme Bcl2 et Bcl-xL et pro-apoptotique tels que Bax, Bad et Bid.

Les protéines membranaires, comme Bcl2 et Bcl-xL, inhibent l'apoptose d'une part en contrôlant l'ouverture des mégacanaux et le flux de cytochrome C d'autre part, lorsque celle-ci se produit, en piégeant le complexe d'apoptosome sur la paroi mitochondriale, empêchant ainsi l'activation des protéases.

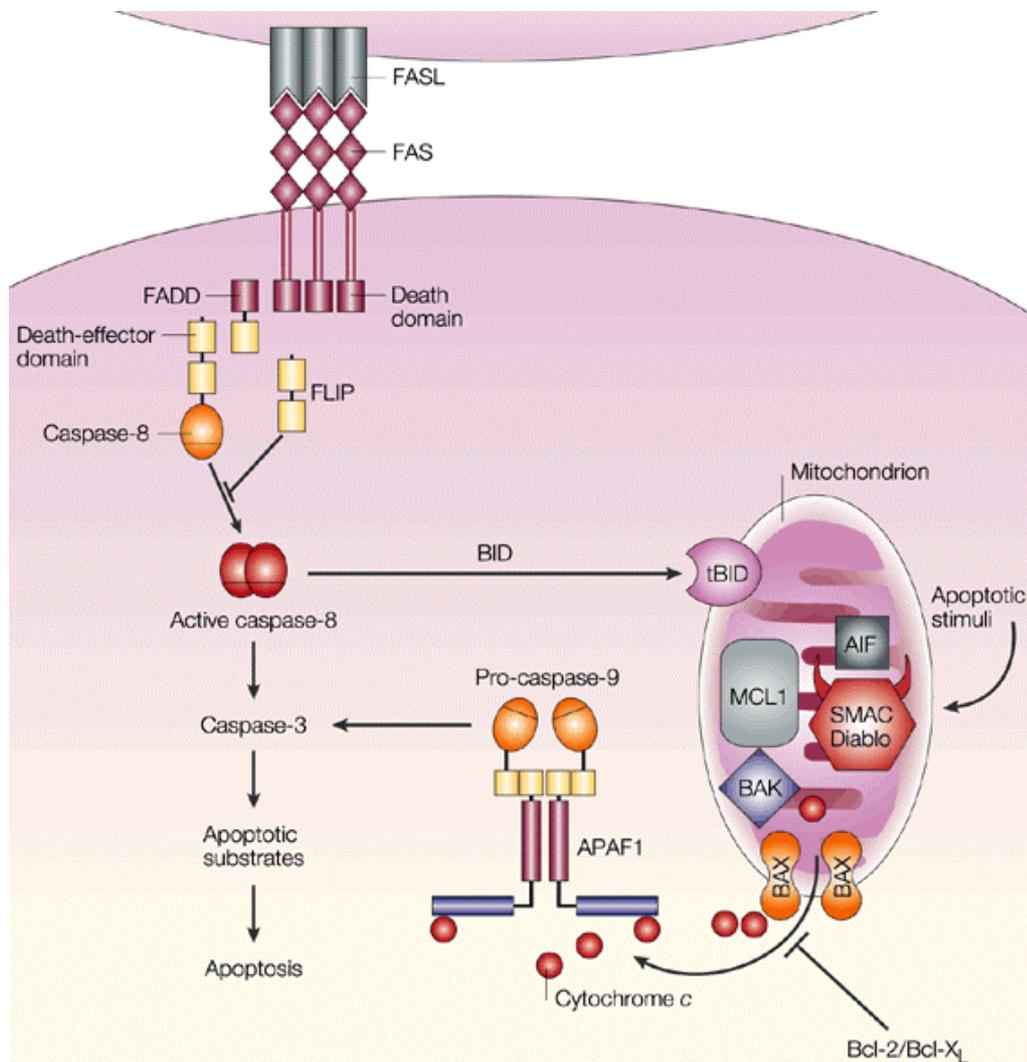


Figure 11 : Schéma représentant l'activation de l'apoptose par la voie mitochondriale et par les récepteurs de mort cellulaire.

5.2.b) La voie des récepteurs de mort (figure 11, (Pope 2002))

Ce sont des récepteurs cellulaires de surface auxquels vont se lier des ligands de mort spécifiques. La liaison du ligand va entraîner la mort par apoptose dans les heures suivantes.

Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF). Ils présentent une particularité sur leur domaine cytoplasmique. Il s'agit d'une séquence homologue à l'ensemble de ces récepteurs que l'on nomme le domaine de mort (DD pour Death Domain)

Par exemple, un Fas ligand se lie à son récepteur de Fas. Il s'en suit un regroupement des domaines de mort des récepteurs. Ensuite, des protéines adaptatrices FADD (Fas Associated Death Domain), viennent se lier sur le domaine de mort et vont initier la cascade de caspases (caspase 8 active la pro-caspase 3 en caspase 3) par le biais de son domaine effecteur de mort (DED pour death effector domain).

5.3) Apoptose et SLRPs

Peu d'études se sont intéressées à l'interaction qui pourrait exister entre les SLRPs et l'apoptose. Les principales données concernent la décorine. Ainsi, en provoquant une obstruction urétrale sur des souris déficientes en décorine, on observe une augmentation de p27 et une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales tubulaires. De plus, la décorine exerce un effet bénéfique lors de la fibrose tubulo-interstitielle premièrement en influençant l'expression des inhibiteurs des cyclines kinases et deuxièmement en limitant l'apoptose, l'infiltration des monocytes et l'expression de TGF- β 1 (Schaefer et coll. 2002). Dans une autre étude, Schönherr et coll. ont montré que la présence de décorine, soit sécrétée par des fibroblastes, soit produites par des cellules endothéliales transfectées par un adénovirus exprimant la décorine, entraîne l'inhibition de l'apoptose de ces cellules dans un lattis de collagène (Schönherr et coll. 1999).

Par la suite, on a constaté que l'expression de décorine après une transfection d'un adénovirus agirait spécifiquement à distance sur les cellules cancéreuses en inhibant leur croissance et leur migration (Tralhao et coll. 2003). Cet effet serait du à l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses. Ainsi, une analyse TUNEL a révélé que les cellules tumorales en apoptose sont retrouvés dans une large région autour des cellules exprimant la décorine, démontrant alors un effet *in vivo* paracrine anti-néoplasique de la décorine.

Un effet anti-apoptotique du biglycane a été démontré sur les cellules stromales de la moelle osseuse de souris invalidées en biglycane. On observe en effet une baisse de la prolifération

de ces cellules quand elles sont « nulles » en biglycane. Cet effet ne passe pas par Fas-L mais par la voie mitochondriale (Chen et coll. 2002).

Très récemment, Vij et coll. ont montré un effet du lumicanne sur la régulation du mécanisme de l'apoptose (Vij et coll. 2004). Ils ont testé l'activité des caspase-3 et 7 et montré que les cellules de fibroblastes embryonnaires et cornéennes de souris, n'exprimant pas de lumicanne ($lum^{-/-}$), ont une activité beaucoup plus faible. Cet effet passerait par la liaison de Fas (CD95) avec son ligand Fas (CD95L), car on retrouve une baisse significative de l'expression de Fas dans les cellules de fibroblastes embryonnaires et cornéennes ($lum^{-/-}$), on trouve aussi une baisse de la réponse au Fas-L.

6) Mélanome et métalloprotéinases matricielles (MMPs)

6.1) Généralités sur les MMPs

Elles appartiennent à la classe des métalloprotéinases, classe qui comprend plus de 200 membres (Barrett A.J 1998). Elle est divisée cette classe en 8 clans et 40 familles. Les MMPs appartiennent au clan MB et à la famille M10 qui comprend les sous familles des serralysines et des matrixines.

Les MMPs jouent un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Elles interviennent donc au cours de processus physiologiques ou pathologiques variés (McCawley et coll. 2001).

Les MMPs représentent une famille d'enzymes possédant les caractéristiques suivantes :

- elles dégradent au moins un composant de la matrice extracellulaire ;
- elles contiennent un ion Zn^{2+} dans leur site actif et sont inhibées par les agents chélatants ;
- elles sont sécrétées sous forme latente et requièrent une activation pour exercer leur activité protéolytique ;
- elles sont inhibées par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs : Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) ;
- elles partagent des homologies de séquences et comportent plusieurs domaines distincts, conservés à travers les différents membres de la famille.

6.2) Classification et caractéristiques

On dénombre actuellement 25 MMPs, réparties en six classes différentes en fonction de leur structure et de leur fonctionnalité.

-Les collagénases : cette famille regroupe les collagénases 1, 2, 3 et 4 aussi appelées MMP-1, 8 et 13 respectivement. Elles ont comme substrats essentiels les collagènes fibrillaires de type I, II et III, la gélatine et certains protéoglycannes comme l'aggrécane (tableau VII). Les collagénases initient spécifiquement la dégradation des collagènes fibrillaires. Elles clivent la triple hélice pour donner deux fragments correspondant aux $\frac{3}{4}$ N-terminaux et $\frac{1}{4}$ C-terminaux, provoquant ainsi le déroulement de la triple hélice et libérant un collagène dénaturé, alors accessible aux autres protéinases non spécifiques comme les gélatinases.

-Les gélatinases : la gélatinase A de 72 kDa (MMP-2) et la gélatinase B de 92 kDa (MMP-9) (tableau VII). Elles ont comme substrats préférentiels les collagènes de type IV et V, la gélatine et l'élastine. Elles possèdent dans leur structure un domaine spécifique de cette classe de MMPs, constitué de la répétition de trois motifs fibronectine de type II. Ce domaine joue un rôle clé dans le mécanisme d'action de ces enzymes, en permettant la fixation de la gélatine à l'enzyme.

- Les stromélysines (MMP-3, -10 et -11) possèdent une spécificité de substrat très large. Les stromélysines-1 et -2, respectivement MMP-3 et -10, sont capables de dégrader les protéoglycannes, les laminines, la fibronectine, l'élastine, la gélatine, les collagènes de type II, IV, V, IX et X (tableau VII). Elles sont exprimées dans les cellules épithéliales et sont capables aussi d'activer les collagénases interstitielles.

- Les matrylisines (MMP-7 et MMP-26) ont pour particularité de ne pas avoir de site hémopexine. Elles possèdent un spectre de dégradation très large (fibronectine, laminine, entactine, collagène de type IV et protéine-cœur des protéoglycannes) (tableau VII).

- Les métalloprotéinases membranaires (MT-MMP) forment un groupe de 7 membres actuellement. Elles sont fixées à la membrane de la cellule soit par un domaine transmembranaire (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP), soit par un glycérophospholipide (MT4-MMP et MT6-MMP). Elles participent directement à la

<u>Enzymes</u>	<u>MM</u>	<u>PM</u>	<u>Substrats matriciels</u>
Gélatinases Gélatinase A Gélatinase B	MMP-2 MMP-9	72 000 / 62 000 92 000 / 86 000	Gélatine, collagène IV, V, VII, X et XI, élastine, fibronectine et protéoglycannes Gélatine, collagène IV, V, élastine, fibronectine et protéoglycannes
Collagénases Collagénase interstitielle Collagénase du neutrophile Collagénase 3	MMP-1 MMP-8 MMP-13	55 000 / 45 000 85 000 / 64 000 60 000 / 48 000	Collagène I, II, III, VII e X, gélatine, protéoglycannes Collagène I, II, III et protéoglycannes Collagène I, II et III
Stromélysines Stromélysine-1 Stromélysine-2 Stromélysine-3	MMP-3 MMP-10 MMP-11	57 000 / 44 000 57 000 / 44 000 51 000 / 44 000	Protéoglycannes, fibronectine, laminine, élastine, gélatine, collagène II, IV, V, IX et X Identiques à ceux de la MMP-3 Gélatine, fibronectine, protéoglycannes
Matrilysine	MMP-7 MMP-26	28 000 / 19 000	Gélatine, fibronectine, laminine, collagène IV, entactine et protéoglycannes
Elastase macrophagique	MMP-12	54 000 / 22 000	Elastine , collagène IV, laminine, fibronectine
Métalloprotéinases membranaires MT1-MMP	MMP-14	6 000 / 60 000	Collagène I, II, III, IV, gélatine, fibronectine, protéoglycannes, laminine, vitronectine, dermatanne sulfatée, élastine
MT2-MMP MT3-MMP MT4-MMP MT5-MMP	MMP-15 MMP-16 MMP-17 MMP-24	72 000 / 60 000 64 000 / 60 000 57 000 / 53 000 ?	? ? ? ?
Enamélysine	MMP-20	54 000 / 43 000	Amélogénine

Tableau VII: Classification des métalloprotéinases matricielles ou « MMPs » selon leur structure et spécificité de substrats

dégradation des composants de la matrice extracellulaire, comme par exemple la gélatine ou le collagène de type IV (Kahari et coll. 1997; Ohuchi et coll. 1997) (tableau VII). Les MT-MMP sont surtout décrites comme étant des activateurs naturels de la MMP-2 (Seiki 1999). Il est bon de noter qu'une forme soluble de la MT3-MMP a été décrite chez l'homme (Matsumoto et coll. 1997) et que cette forme est capable de dégrader différents substrats matriciels (fibronectine, collagène de type III) et d'activer la proMMP-2.

- L'élastase macrophagique (MMP-12) dégrade préférentiellement l'élastine, mais également la fibronectine, le collagène IV et la laminine (tableau VII).

- D'autres membres de la famille des MMPs ont été clonés et désignés comme la MMP-18 (Cossins et coll. 1996) et la MMP-19 (Pendas et coll. 1997), mais leur spécificité de substrat n'est pas encore connue. La MMP-20 est une nouvelle métalloprotéinase à activité collagénolytique isolée à partir d'une banque d'ADNc d'odontoblastes (Colonna et coll. 1997).

6.3) Contrôle de l'invasion tumorale du mélanome par les protéinases

6.3.a) Métalloprotéinases matricielles et mélanome

Le processus d'invasion tumorale est automatiquement lié à la protéolyse et ce processus implique l'association de protéinases dont des MMPs. Ces protéinases permettent le développement tumoral, ainsi que le potentiel invasif (Hofmann et coll. 2000). Plusieurs voies d'activation et d'invasion sont décrites :

6.3.a.a) La voie MMP-2/MT1-MMP/TIMP2

Le système de la MMP2 est l'un des premiers impliqués dans le mélanome. La pro-MMP2 est synthétisée principalement par la cellule de mélanome. Celle-ci est activée à la membrane de la cellule, en faisant intervenir plusieurs modes d'activation. Ainsi la Pro-MMP-2, fixée à la membrane par l'intégrine $\alpha\beta3$, peut être activée par une MT1-MMP (Brooks et coll. 1996). Le deuxième mode d'activation implique le clivage de la pro-MMP-2 complexée avec la MT1-MMP en MMP-2 par l'action d'une sérine protéinase du système plasminogène/plasmine (u-PA) (Monea et coll. 2002). Enfin, le troisième mode est l'activation de la pro-MMP2 préalablement fixée à la membrane au complexe TIMP-2 -MT1-MMP par son domaine hémapexine en MMP-2, par le biais d'une MT1-MMP (Strongin et coll. 1995).

In vitro, la MMP-2 active est peu sécrétée dans les milieux de culture de cellules de mélanome. Seules les lignées très invasives en produisent (Capon et coll. 1999). La surexpression de la MMP2 augmente la migration des cellules de mélanome (Hofmann et coll. 2000). D'autre part, l'adhésion et l'étalement des cellules de mélanome en culture sont stimulés par la surexpression du TIMP-2.

In vivo, les études sur la souris ont montré que la MMP-2 était responsable de l'augmentation de la croissance tumorale, de la néoangiogenèse et du pouvoir métastasant des cellules. L'inactivation de la MMP2 chez la souris montre que la croissance tumorale est diminuée de 40%, les métastases de 54%, avec une nette diminution de l'angiogénèse (Itoh et coll. 1999). La MMP-2 intervient donc à tous les stades du développement de la tumeur, à la fois aux stades précoces de l'invasion et au cours du processus métastatique.

Chez les patients porteurs de mélanome, le dosage sérique de la MMP-2 n'est pas corrélé au stade de la tumeur, mais une augmentation de son taux constitue un mauvais facteur pronostique (Vaisanen et coll. 1999), à la fois pour la présence de métastases et pour la survie à 5 ans du malade (Wollina et coll. 2001).

6.3.a.b) La voie MMP-9

Les cellules de mélanome produisent peu ou pas de pro-MMP-9 *in vitro*. Cette protéinase intervient dans la régulation de l'invasion tumorale de ces cellules. La MMP-9 active *in vivo* peut être corrélée à l'agressivité de la tumeur (plus les cellules secrètent de la pro-MMP-9 plus les cellules sont invasives). Les souris déficientes en MMP-9 présentent une inhibition du nombre de métastases de 45% après injection de cellules tumorales (Itoh et coll. 1999). La MMP-9 ne semble donc pas jouer un rôle majeur dans les phases de développement précoce de la tumeur mais participe activement à la formation des métastases.

6.3.a.c) La voie MMP-1

Cette protéinase est sécrétée au cours de la progression tumorale (à partir des stades III et IV de Clark). Ce sont les fibroblastes au contact de ces cellules de mélanome qui produisent la MMP-1 (Wandel et coll. 2000). La MMP-1 participe activement à la dégradation de la matrice, en particulier des collagènes.

6.3.a.d) Les autres MMPs

De multiples études démontrent l'implication d'autres MMPs dans le mélanome, en particulier la MMP-3 présente au cours de l'invasion (Airola et coll. 1999). Son expression est accrue dans les formes métastatiques et de mauvais pronostic (Walker et coll. 1999).

Les MMPs transmembranaires, MT2-MMP et MT3-MMP, sont également impliquées dans les formes invasives et métastatiques du mélanome et joueraient un rôle non négligeable dans l'invasion (Ohnishi et coll. 2001).

6.4) Le système plasminogène/plasmine dans le mélanome

La protéolyse matricielle est un mécanisme indispensable à la migration et l'invasion des cellules tumorales. Ce processus est dépendant en partie du système plasminogène/plasmine.

La plasmine agit directement en dégradant la matrice et en activant les autres cascades protéolytiques. Dans le mélanome, on peut remarquer que le t-PA (activateur du plasminogène de type tissulaire) présente un rôle non négligeable dans la phase initiale de progression (Baramova et coll. 1994; de Vries et coll. 1996). Par la suite, lors du processus métastatique, c'est l'u-PA qui a un rôle important (de Vries et coll. 1996).

6.5) Régulation de l'expression des MMPs par les membres de la famille des SLRPs

De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les agents régulateurs de l'expression des MMPs, comme par exemple les membres de la famille des SLRPs. On peut ainsi observer à la fois des effets positifs ou négatifs de ceux-ci sur l'expression de ces MMPs, avec des résultats qui peuvent différer selon le modèle d'étude.

Hall et collaborateurs ont montré que la distribution des protéoglycannes riches en kératane-sulfate était inversement localisée par rapport à l'expression de la MMP-3 (Hall et coll. 1999). Al Haj Zen et coll. en 2003 ont montré que sur des cellules de fibroblastes gingivales humaines, il y avait une régulation des différentes métalloprotéinases par le biais d'une surexpression de la décorine. Ainsi, on a pu observer que la décorine stimulait l'expression de la MMP-2 et du TIMP-2 et qu'elle inhibait l'expression et l'activation de la collagénase 1 (MMP-1) et de la MMP-3 (Al Haj Zen et coll. 2003). Ces phénomènes pourraient s'expliquer par un rétrocontrôle positif de la décorine sur l'expression de cytokines comme le TGF- β 1 et l'IL1- β et négatif sur l'expression du TNF- α et de l'IL4. En effet, il a été montré que le TNF- α stimulait l'expression de la MMP2 (Han et coll. 2001), et que le TGF- β lors des phases tardives du

développement tumoral agirait comme un promoteur de la progression tumorale (Ellenrieder et coll. 2001).

Des études plus anciennes avaient en fait montré que la décorine et le biglycane étaient capable de réguler positivement l'expression de la collagénase de type 1 (MMP-1) par des fibroblastes cultivés sur un tapis de vitronectine ou de fragment de 120 kDa de la fibronectine (correspondant à son domaine de liaison). On observe en plus une augmentation de l'expression de la MMP-2. Il est à noter que ces effets sont spécifiques au corps protéique de ces petits protéoglycannes et non à la chaîne de glycosaminoglycannes, qui n'a aucun effet sur la régulation de ces MMPs (Huttenlocher et coll. 1996). Dans un autre modèle d'étude développé par Schonherr et coll., portant sur des cellules endothéliales de veine ombilicale (EA.hy 926), (Schonherr et coll. 2001), on a pu observer que la décorine, produite soit par une co-culture de fibroblaste, soit par l'ajout d'adénovirus exprimant la décorine sur des cellules endothéliales, entraînait sur celles-ci une augmentation de l'expression de la MMP-2 sous sa forme active ou sous sa forme pro, ainsi qu'une augmentation de la MMP-9. On a trouvé aussi une régulation positive de l'expression de la MMP1 et la MMP-14.

Ainsi, on peut en déduire que les membres de petits protéoglycannes sont capables de réguler l'expression des MMPs, et plus particulièrement des MMP-1, -2, -3 et -9.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I MATERIELS

1) Matériels spécifiques pour la biologie moléculaire

Les réactifs utilisés lors de certaines manipulations sont de qualité biologie moléculaire. Afin de permettre l'élimination des ribonucléases, l'eau utilisée est ultra-pure (MilliQ) puis traitée par le DEPC à 0.1% (v/v) durant 12 heures sous agitation, et ensuite autoclavée.

Le matériel en plastique est à usage unique et le matériel en verre est lavé, rincé à l'alcool 60% (v/v), puis rincé de nouveau à l'eau traitée par le DEPC avant d'être chauffé 18 heures à 180°C.

2) Fournisseurs réactifs

Abcys/Vector Laboratories	- Solution de révélation de l'activité peroxydase
Air liquide	-Azote liquide
Amersham (Life Science)	-Coffret ECL plus -Pellicule hyperfilm
	-Désoxycytidine 5' [α - ³² P] triphosphate ([α - ³² P] dCTP)
	-D-[6- ³ H] glucosamine hydrochloride
	-Lait en poudre -Sulfure (³⁵ S)
	-Membrane polyvinylidifluorate
BDH	-Acrylamide 40%(m/v)
Biorad	-Colonne de chromatographie
	-Réactif de Bradford -Sephadex G50
Bio101	-Coffret Geneclean
Boehringer	-Désoxyribonucléotide triphosphate (50mM)
	-Enzymes de restriction -Coffret de ligation
Chromogenix	-S-2251 (substrat de la plasmine)
	-S-2244 (substrat de u-PA)
Dako	-Milieu de montage pour fluorescence
Dutsher	-Gants en latex
Euromedex	-Ampicilline -Glycine
	-SAB -SSC20X
	-SSPE20X -Tris-HCl
	-Tri-Reagent

Gibco	-Bactéries α DH5
Harlan	-Souris femelle C57BL6
Merk	-APS -DTT -HCl -Réactif de Folin-Ciocalteu du phénol
NEN	-Membrane de nylon Genscreen plus
Pharmacia	-Témoin de masse moléculaire: Kb DNA Ladder -Tampon pour enzymes de restriction: One Phor All Buffer Plus.
Polylabo	-Microtubes 0.5 ,1.5 et 2 ml -Embouts pointes ART 100 E ,200 E et 1000 E -Tubes Falcon 15 et 50 ml
Prolabo	-Acétone -Acide acétique -Acide citrique -Acide chlorhydrique -Acide trichloroacétique -CaCl ₂ -Ethanol absolu -Ether diéthylique -Glycérol -Méthanol -NaCl -NaOH -Propan-2-ol -Xylène
Promega	-Fragment de Klenow
Serva	-Bleu de coomassie G-250 et R-250
Sigma (Biologie moléculaire)	-Acétate de sodium -Agarose -ADN de sperme de saumon -Alpha-caséine -Aprotinine -Brij-35 -Bleu de bromophénol -BET -DEPC -DMSO -ECM gel (Matrigel®) -EDTA -Formaldéhyde -Formamide -Glutaraldéhyde 25% -HEPES -MOPS -Orthovanadate de sodium -PMSF -Rnase A -Sodium dodécyl sulfate -Solution de préhybridation 2X (P1290) -Standards de masses moléculaires de protéines -Sulfate de dextran -TEMED

	-Triton X-100	-Triton X-114
	-Tween 20	-Violet cristal
Stratagène	-Kit de marquage "Prime It II"	
Whatman	-Papier absorbant 3MM	

3) Fournisseurs matériels

Beckman	-Centrifugeuse GS-15R	
Eppendorf	-Micropipettes	-Centrifugeuse 5804 R
Heraeus	-Incubateur à CO ₂	
Hybaid	-Cuve à électrophorèse horizontale	
Jouan	-Hotte à flux laminaire	
Julabo	-Bain marie SW-20C	
OSI	-Etuve à hybridation HB-1	
	-Cylindre à hybridation en verre borosilicaté	
Radiometer	-Appareil de mesure du pH	
Taylor-Wharton	-Container à azote liquide	
Vilber Lourmat	-Analyseur d'image Bioprofil	
	-Chambre d'exposition UV, Biosun (RMX 3W)	

3.1) Matériel spécifique à la culture cellulaire

La solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (tampon phosphate 30 mM, pH 7,4 , NaCl 0,15M) est préparée au laboratoire et stérilisée en chaleur humide.

Les autres réactifs sont distribués par les sociétés suivantes :

Costar	-Grattoirs pour cellules	
Gibco BRL	-DMEM	-Lipofectamine 2000
	-Pénicilline/Streptomycine	-RPMI
	-Sérum de veau foetal	-Trypsine
Nalgène	-Tubes à congélation	
Nunc	-Flacons de culture de 75cm ² -Boîtes de culture à 12 puits	
Schleicher et Schuell	-Supports de filtre 2µm	
Sherwood	-Aiguilles pour injections sous-cutanées	
Swann-Morton	-Scalpels	

Sigma	-solution de bleu trypan 0,4%
Terumo	-Seringues de 10, 20 et 50ml

3.2) Souches cellulaires

Cellules MRC5 : (ATCC CCL 171).

Lignée cellulaire dérivée de fibroblastes pulmonaires normaux de fœtus humain de 14 semaines établie par J.P Jacobs en 1966.

Cellules B16F1 : (ATCC CRL-6323)

Cellules de mélanome de souris, faiblement métastatiques, adhérentes. Cette souche cellulaire nous a été donnée par le professeur K. Meflah de Nantes.

II Méthodes

1) Hygiène et sécurité

Les différentes expériences ont été menées selon les règles d'hygiène et sécurité, établies au laboratoire de biochimie médicale de Reims.

Les déchets des manipulations réalisées sont triés (déchets biologiques, déchets radioactifs, solvants, déchets toxiques ou nuisibles à l'environnement, papeteries) et éliminés conformément à la réglementation.

Les règles de sécurité concernant les réactifs ont été respectées conformément aux recommandations des fournisseurs inscrites sur les flacons (selon les codes R et S de la législation).

2) Culture cellulaire :

2.1) Technique de culture cellulaire

Les cellules sont conservées congelées dans l'azote liquide, dans un milieu contenant du DMEM pour les fibroblastes et du RPMI 1640 pour les cellules de mélanome murin B16F1, additionné de 20% de sérum de veau fœtal (v/v), et 10% de DMSO. On décongèle rapidement l'ampoule et on reprend les cellules dans du DMEM contenant 20% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Ce mélange doit se faire très lentement afin d'éviter tout choc osmotique.

La culture se fait dans 10 ml de milieu pour une boîte de 75 cm² à 37°C sous atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO₂. Après 24 heures, le milieu est remplacé par du milieu à 10% de SVF. Les cellules sont confluentes au bout de sept jours et sont alors repiquées. On élimine le milieu de culture, la couche cellulaire est rincée avec 5 ml de PBS contenant 0,5 ml de trypsine à 0,25% afin d'éliminer toute trace de SVF. Les cellules sont ensuite détachées par addition de cette même solution, mais avec une incubation à 37°C jusqu'à détachement complet. La suspension cellulaire est diluée par 25 ml de milieu DMEM à 10% de SVF. Les cellules sont ensuite réparties en trois boîtes et remises en culture jusqu'à une nouvelle confluence cellulaire.

Les cellules fibroblastiques utilisées dans les expériences suivantes ont subi de 2 à 4 passages. Elles ont été obtenues par traitement à la trypsine des cultures en monocouche, leur nombre a été déterminé par comptage à la cellule de Neubauer, puis la suspension cellulaire a été diluée afin d'obtenir la densité cellulaire nécessaire pour chaque expérience.

2.2) Explants de fibroblastes dermiques

Tous les prélèvements de peau utilisés pour cette étude sont des déchets post-opératoires et sont obtenus avec le consentement des patients ou de leurs parents pour les enfants.

Les fibroblastes ont été obtenus à partir de derme sain provenant de prépuce humain, de peau abdominale ou de paupière supérieure. Les fragments de peau sont prélevés dans des conditions d'asepsie chirurgicale et sont placés dans du HBSS stérile, additionné de pénicilline (100 UI/ml) et de streptomycine (100 µg/ml), dans lequel ils peuvent être conservés, au maximum 48 heures.

Les fragments de peau sont placés stérilement dans une boîte de pétri en verre contenant de la PBS. En premier lieu, la couche grasseuse sous-jacente et de l'épiderme sont éliminés, le derme est ensuite découpé à l'aide de bistouris et de pinces. Le derme est ensuite découpé avec un scalpel en fragments d'environ 1mm³. Ces derniers sont ensuite déposés sur le fond d'une boîte de 25 cm² à l'aide d'une pipette Pasteur stérile (une quinzaine par boîte). On laisse les explants adhérer au support quelques minutes à sec puis on ajoute 3 ml de milieu de culture (milieu DMEM avec 20% de SVF (v/v) contenant 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). Ce milieu est changé 24 heures plus tard et les fragments non adhérents sont éliminés. Le flacon est maintenu dans l'étuve à 5% de CO₂. Les fibroblastes vont alors migrer à partir de l'explant sur le fond de la boîte. Tous les 7 jours, le milieu est changé. Le nombre de cellules hors de l'explant est surveillé régulièrement au microscope inversé. Lorsque les cellules sont suffisamment nombreuses autour de chaque explant, le premier repiquage est effectué (environ 3 à 4 semaines après la dissection).

2.3) Traitement anti-mycoplasmique des cellules

Les mycoplasmes sont des mycobactéries ayant perdu leur paroi rigide. Ils se fixent sur la membrane cellulaire, provoquant de nombreux changements phénotypiques (fragilisation des membranes, baisse de l'inhibition de contact, inhibition de l'arginine désaminase). Les filtres de 0,22 µm de diamètre, utilisés au laboratoire pour la stérilisation des milieux, faits de matériaux plastifiés, n'arrêtent pas ces germes souvent présents dans les explants, ce qui justifie un traitement anti-mycoplasmique systématique au cours des quatre premières semaines de culture.

Après un premier repiquage, les fibroblastes sont cultivés dans du DMEM, SVF 10% (v/v) additionné de puromutiline à 10 µg/ml pendant 3 jours, puis de tétracycline à 5 µg/ml pendant les 4 jours suivants (coffret anti-mycoplasme « BM Cycline », Roche). Ce traitement est répété deux fois. Les fibroblastes sont ensuite mis en culture sans antibiotique pendant au moins 7 jours avant d'être utilisés.

2.4) Les stimulations cellulaires

2.4.a) Etape de pré-incubation

L'étape de pré-incubation a pour but de synchroniser les cellules en phase G1 ou G0 par diminution des facteurs sériques nécessaires aux divisions cellulaires et à l'activité métabolique. Ainsi, le milieu de culture est éliminé, les cellules sont rincées deux fois avec de la PBS, puis un milieu frais adéquat ne contenant que 0,5% de SVF est ajouté. Cette pré-incubation dure 6 heures à 37°C, 5% de CO₂.

2.4.b) Stimulation par l'IGF-1

Les cellules sont préalablement lavées avec de la PBS, puis elles sont incubées en présence de milieu adéquat supplémenté de 0,5% de SVF contenant les concentrations stipulées d'IGF-1. Les incubations sont réalisées durant des temps variables notés dans les paragraphes correspondants à cette étude.

2.4.c) Irradiation des cellules

Les cellules fibroblastiques (primaires ou MRC5) sont mises en culture dans une plaque de 6 puits à raison de 5×10^5 cellules/puits (1 ml de suspension cellulaire par puits). Lorsque les cellules sont confluentes (après 24 à 48 h d'incubation), le milieu de culture est éliminé. On procède à une pré-incubation et on remplace le milieu par de la PBS. Le milieu de culture contient de nombreuses molécules susceptibles d'interférer entre le rayonnement UVA et les cellules. C'est pourquoi, lors de l'irradiation (Biosun, Vilbert Lourmat) nous plaçons les cellules dans de la PBS. Les cellules sont ensuite exposées à température ambiante pendant 30 min à une dose de 7,5 joules par cm² d'UVA. Par la suite, les cellules sont incubées 24 h dans un milieu de culture avant d'être étudiées.

La plaque 6 puits est placée dans le tiroir de l'appareil BIO-SUN (Vilbert-Lourmat) et soumise à une irradiation de 7,5 J/cm² (UVA). L'irradiation des cellules s'effectue par le dessus. La durée de l'irradiation est calculée par l'appareil suivant la dose à délivrer. L'irradiation se fait par accumulation de doses, lorsque la dose programmée est atteinte, l'appareil s'arrête.

Après l'irradiation, la PBS est remplacé par un milieu DMEM sans SVF. La plaque témoin, non soumise aux UVA, est traitée dans les mêmes conditions. Les cellules sont mises en présence de PBS, puis laissées sous la hotte à flux laminaire le temps de l'irradiation, ensuite la PBS est remplacé par du milieu DMEM sans SVF. Les deux plaques sont incubées 24 heures à 37°C.

2.5) Dosage de la production de mélanine

Le taux de mélanine produit par les cellules B16F1 est mesuré par l'analyse spectrophotométrique des extraits cellulaires (Burg et coll. 1998; Kosano et coll. 2000).

Après trypsinisation des cellules, on centrifuge celles-ci à 1500 rpm et après comptage sur cellule de Neubauer, on reprend 2×10^6 cellules dans 500 μ l d'une solution à 0,85 M de KOH et 10% de DMSO (v/v). Le mélange est ensuite incubé à 80°C pendant 90 minutes. On centrifuge l'échantillon afin de se débarrasser des débris cellulaires. L'absorbance est ensuite déterminée à 405nm.

2.6) Etude de la viabilité cellulaire

Pour vérifier la toxicité cellulaire des différents traitements, les cellules sont incubées dans une solution de bleu trypan à 0,4 % (m/v), 10 minutes. Elles sont rincées plusieurs fois avec de la PBS et ensuite les cellules sont observées en microscopie à contraste de phase. Ainsi, on peut calculer la viabilité cellulaire (en %), qui correspond au nombre de cellules viables (non marquées)/ nombre de cellules total x100.

2.7) Détermination de la prolifération cellulaire : Méthode du cristal violet

Les cellules de mélanome B16F1 sontensemencées dans des plaques à 24 puits (10000 cellules par puits) dans du milieu avec 10 % (v/v) de SVF et incubées à 37°C sous atmosphère de 5% de CO₂. Au troisième jour de culture, on ajoute 10 μ l de SVF. Aux jours 0, 3 et 5, les cellules sont préalablement rincées avec de la PBS. Les cellules sont ensuite fixées avec 100 μ l d'une solution de PBS contenant 1,1 % de glutaraldéhyde pendant 20 min. Les cellules ainsi fixées sont rincées 3 fois à l'eau déminéralisée et séchées pendant 15 min. Elles sont ensuite colorées pendant 20 min à température ambiante avec 100 μ l d'une solution à 0,1% de Cristal Violet dissous dans un tampon HEPES (20 mM) ajusté à pH 6. L'excès de colorant est enlevé par plusieurs lavages à l'eau déminéralisée et la plaque est séchée à température ambiante. Le résidu coloré est repris dans 200 μ l d'acide acétique à 10% et la densité optique lue à 560 nm.

Une gamme étalon de cellules de mélanome est effectuée et le nombre de cellules est confirmé en parallèle avec un comptage sur cellule de Thomas. Les cellules de cette gamme sont traitées de la même manière que précédemment, afin de corréler le nombre de cellules avec la densité optique.

2.8) Coloration au May-Grunwald Giemsa

En premier lieu, les cellules sont rincées par deux lavages de PBS à 37°C, fixées par une solution de glutaraldéhyde à 1,1% (v/v). La couche cellulaire est par la suite recouverte par une solution de May Grunwald pendant 10 min, et rincées avec de l'eau. Ensuite, on ajoute une solution de Giemsa diluée au dixième (10 min d'incubation). Les cellules sont alors rincées, séchées et observées. La quantification par analyse spectrophotométrique, se fait par ajout d'acide acétique à 10% (v/v) et la lecture des échantillons se fait à 635 nm.

2.9) Mesure de l'adhésion et de l'étalement cellulaire des cellules B16F1

Une plaque de 96 puits est tapissée ou non par 10 µg/puits de Matrigel® (ECM GEL, Sigma) ou de collagène de type I. La plaque est séchée pendant 24 heures. Les puits sont alors réhydratés par de la PBS contenant de la SAB dénaturée à la concentration de 10 mg/ml.

Les cellules sont détachées avec une solution de PBS à 5 mM (m/v) d'EDTA puis une solution de PBS à 10 mM (m/v) de CaCl₂ est ajoutée pour neutraliser l'effet de l'EDTA. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée (1500 rpm, 8 min à température ambiante) et le culot cellulaire est repris dans 1 ml de milieu RPMI (Gibco Invitrogen) supplémenté avec 1% (m/v) de SAB. Les cellules sont alors comptées puis diluées dans ce même milieu RPMI supplémenté de 1 % de SAB, de manière à obtenir une suspension cellulaire à 200 000 cellules/ml. La solution de SAB présente dans les puits est aspirée, puis 100 µl de suspension cellulaire sont déposés dans chacun des puits, soit 20 000 cellules/puits.

Après 4 heures d'incubation, le milieu est aspiré et chaque puits est lavé avec 200 µl de PBS. Les cellules sont ensuite fixées pendant 30 min par 100 µl de méthanol puis elles sont colorées pendant 30 min par 100 µl de réactif de May-Grundwald-Giemsa (Frink 1965). Le colorant non fixé est éliminé par lavages successifs à l'eau désionisée. 200 µl d'acide acétique 10 % (v/v) sont ensuite ajoutés. Après dissolution du colorant, l'absorbance est mesurée à 630 nm à l'aide d'un spectrophotomètre muni d'un lecteur de plaque.

Les cellules présentant un diamètre cytoplasmique égal ou plus large que le diamètre nucléaire sont considérées comme étalées. L'estimation de ces cellules se fait par un comptage manuel au microscope à contraste de phase. Ainsi, on estime de cellules étalées en pourcentage par rapport aux cellules ayant adhéré sur le collagène de type I et sur le Matrigel®.

2.10) Migration

Ces expériences ont été effectuées avec le Dr A. Khoruzhenko. Ces essais sont réalisés sur chambre de migration (Transwell®, Costar) dont le puits est recouvert d'un filtre poreux (8 µm de diamètre) délimitant un compartiment (ou chambre) supérieure et une chambre inférieure. La face supérieure de la membrane du Transwell® est éventuellement tapissée par différents facteurs (collagène et lumicanne recombinant à 0, 1 ou 10 µg par Transwell®). Les Transwell® sont séchés 24 heures. Les membranes sont alors réhydratées par 100 µl de RPMI 1640.

Les cellules détachées sont centrifugées 10 minutes à 2 500 rpm. Le culot est repris par 1 ml de milieu RPMI à 0,2% de SAB (m/v). Une numération est effectuée puis une dilution par cette même solution jusqu'à obtenir 500 000 cellules/ml. Le milieu RPMI 1640 qui a servi à réhydrater la membrane des Transwell® est aspiré, on dépose alors 100 µl de la suspension cellulaire dans le compartiment supérieur, soit 50 000 cellules.

Dans la chambre inférieure, on ajoute 800 µl d'une solution de milieu RPMI additionnée de 2% de SAB (m/v) et 10% SVF (v/v) jouant le rôle de chémoattractant pour les cellules. Les boîtes 24 puits contenant les Transwell® sont alors incubées à 37°C et en présence de 5% de CO₂ durant 24 heures.

A l'issue du temps d'incubation, le milieu placé dans la chambre supérieure est délicatement retiré à l'aide d'une pipette. Chaque Transwell® est rincé deux fois par 1 ml de PBS. Les cellules sont fixées par une solution de méthanol 100% durant 15 minutes (200 µl dans la chambre supérieure, 800 µl dans le compartiment inférieur). Après rinçage, les cellules sont colorées par une solution de cristal violet pendant 30 minutes (200 µl dans la chambre supérieure, 800 µl dans le compartiment inférieur). Les cellules n'ayant pas migré au travers de la membrane sont éliminées mécaniquement à l'aide d'un coton tige humide. Les cellules qui ont migré sont ensuite photographiées à l'aide d'un microscope optique Axiovert25 (Zeiss) équipé d'un appareil photo numérique (Sony) et comptées manuellement sur 5 champs par Transwell® de manière aléatoire.

2.11) Invasion

Ces expériences ont été effectuées avec le Dr A. Khoruzhenko. Elle reprend la méthode précédente. La membrane du Transwell® est tapissée par 10 µg de Matrigel®, un extrait de la tumeur d'Englebreth-Holm-Swarm (Sigma), reconstituant une pseudo-membrane basale.

Le Matrigel® est dilué à la concentration souhaitée, soit 5 mg pour 100ml de PBS stérile. On peut alors ajouter ou non à cette solution du lumicanne recombinant (0, 1 ou 10 µg/Transwell®).

Les Transwell® sont séchés pendant 24 heures. Le coating est effectué en deux fois (5 µg). A chaque fois, il est déshydraté sous une hotte puis réhydraté par du milieu.

50 000 cellules sont déposées dans la chambre supérieure tandis que 800 µl de la solution chémoattractante sont ajoutés dans le compartiment inférieur. Après incubation, les cellules sont fixées par du méthanol coloré au cristal violet.

2.12) Croissance en agar mou

Ces expériences ont été effectuées avec le Dr A. Khoruzhenko. Cette analyse s'effectue en plusieurs étapes, Il faut en premier lieu préparer une solution d'agar à 3% (m/v) diluée dans l'eau distillée autoclavée. La dissolution s'effectue à une température de 60°C afin de permettre une bonne solubilisation. Ensuite on prépare une solution de DMEM deux fois concentrée (8 ml) supplémenté avec du SVF à 20% (m/v) dans laquelle on introduit de l'agar 3% jusqu'à une concentration finale de 1,5% (incubation du mélange dans un bain-marie à 38-39°C).

Finalement, on dilue à 0,9% le mélange DMEM/agar par ajout de milieu RPMI, nécessaire à une bonne croissance des cellules B16F1 (l'ensemble de la solution est toujours maintenu à 38-39°C). On ajoute 1 ml de cette solution par puits d'une plaque à 6 puits et on laisse quelques minutes à température ambiante. Pendant ce temps, on procède à la trypsinisation des cellules B16F1 et, après comptage sur cellule de Neubauer, on place 300000 cellules dans 8 ml de milieu de culture (RPMI à 10% (m/v) de SVF) que l'on supplémente avec 2 ml de la solution d'agar à 1,5% (m/v) afin d'obtenir une concentration finale de 0,3% (m/v), on mélange et on dépose 1 ml de ce mélange sur la plaque à 6 puits. On laisse reposer 10 à 15 minutes à température ambiante. Ensuite, on ajoute 1 ml de la solution à 0,9% (m/v) d'agar, on attend 10 minutes et finalement on ajoute 1,5 ml par puit d'un milieu de culture RPMI supplémenté à 10% (m/v) de SVF. Les plaques sont alors incubées 10 min à 4°C afin que l'agar puisse bien polymériser.

Après 10 jours de culture à 37°C en présence de 5% de CO₂, on compte le nombre de colonies formées. Celles-ci sont visualisées par coloration au MTT (incubation de 3 heures dans l'incubateur à 37°C avec 20% (v/v) d'une solution de MTT à 1 mg/ml repris dans de la PBS puis 4 à 5 rinçages avec de la PBS).

On rapporte ainsi le nombre de clones observés (supérieur à 50 cellules) au nombre de cellulesensemencées, ce qui permet de définir la capacité des cellules à former des clones.

2.13) Coloration cytochimique au Hoechst-33342

On cultive des cellules de mélanome de souris (B16F1) en plaque 24 puits, à 90% de confluence cellulaire, on ajoute du lumicanne recombinant à différentes concentrations (0, 10 et 50 µg/ml). Après 16 heures d'incubation, les cellules sont rincés deux fois avec de la PBS. A cette étape, on ajoute du Hoechst-33342 (50 µg/ml) dilué dans de la PBS, sur les cellules (200 µl/puits). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 5% de CO₂, les cellules sont observées sur un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse TE 300 fluorescence) et on les photographie avec une caméra CCD (Nikon DXM 1200).

3) Extraction des ARN totaux

3.1) Principe

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et coll. 1987) utilisant le kit d'extraction Tri Reagent™.

La méthode consiste à reprendre les cellules par un volume de solution dénaturante (dépendant du nombre de cellules) dans les boîtes de culture. Cette solution contient de l'isothiocyanate de guanidinium et du phénol, qui vont dénaturer les acides nucléiques et dissocier les protéines. Elle possède également une activité inhibitrice sur les ribonucléases endogènes. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, on ajoute 1/5 du volume de chloroforme et les tubes sont agités énergiquement. Le chloroforme va permettre d'obtenir une dissociation entre la phase phénolique et la phase aqueuse. L'incubation s'effectue durant 15 minutes à température ambiante. Cette étape permet de séparer par solubilisation différentielle les acides nucléiques.

La phase aqueuse qui contient les ARN est prélevée et précipitée par le même volume d'isopropanol pendant 10 minutes à température ambiante. Le précipité est récupéré par centrifugation à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot d'ARN est lavé deux fois par 1ml d'éthanol 75% (v/v), séché à l'air et dissous dans de l'eau traitée au DEPC (50% v/v) et du formamide (50% v/v).

3.2) Analyse qualitative et quantitative de l'ARN extrait

La concentration en ARN est déterminée par la mesure d'absorbance à 260nm. Une unité d'absorbance correspond à 40 µg d'ARN/ml.

L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1.5% (m/v) en présence de bromure d'éthidium dans du tampon TAE 1X (40 mM de Tris-acétate et 1 mM

d'EDTA, pH 8) pendant 45 minutes à 100V. Les ARNr de taille 28s et 18s seront alors visualisés par exposition aux UV. Une fois l'intégrité des ARN vérifiée, on procède alors à une analyse par "Northern-blot".

4) Technique du Northern-blot (Sambrook J 1989)

4.1) Electrophorèse

4.1.a) Préparation du gel d'agarose dénaturant

Un gel d'agarose à 1% est préparé en portant à ébullition 1,1 g d'agarose dans 68.5ml d'eau traitée par le DEPC. Après refroidissement à 60°C, on ajoute 22 ml de tampon de migration 5X (0,1 M de MOPS (pH 7), 40 mM d'acétate de sodium et 5 mM d'EDTA, pH8) et 19,5 ml de formaldéhyde à 37% (v/v). Le gel est coulé dans le support d'électrophorèse. La polymérisation va s'effectuer en 30 minutes. Ce gel est ensuite recouvert par du tampon de migration 1X et placé à 4°C.

4.1.b) Préparation des échantillons

On solubilise 12 µg d'ARN dans un volume de 4 µl d'eau traitée au DEPC, 2 µl de tampon de migration 5X, 10 µl de formamide et 3,5 µl de formaldéhyde à 37% (v/v). Ce mélange est dénaturé à 65°C pendant 15 minutes, puis refroidi rapidement dans la glace. On ajoute aux échantillons 2 µl de BET dilué au dixième et 2 µl de tampon de charge (50% de glycérol (v/v), 1 mM d'EDTA et 0,25% de bleu de bromophénol (m/v), pH 8). Après dépôt des échantillons, la migration s'effectue pendant 6 heures sous une tension de 90V à 4°C.

4.1.c) Transfert

Après la migration, le gel est rincé plusieurs fois à l'eau traitée par le DEPC afin d'éliminer le formaldéhyde. Les ARN sont ensuite transférés par capillarité du gel d'agarose sur une membrane de Nylon au moyen d'une solution saline au citrate 6X (NaCl 3 M et du citrate 0,3 M, pour une solution saline au citrate 20X).

Le transfert des ARN est réalisé selon le montage suivant :

- Une plaque de verre posée dans un plat en Pyrex, contenant du tampon SSC 6X
- Une feuille de papier Whatman 3MM saturée en SSC 6X dont les extrémités trempent dans le tampon.
- Le gel d'agarose rincé à l'eau traité au DEPC.

- Une membrane de Nylon également saturée en SSC 6X et découpée aux dimensions du gel.
- Deux feuilles de papier Whatman 3MM imbibées de SSC 6X afin d'amorcer le transfert.
- Une épaisseur de 8 à 10 cm de papier absorbant surmontée d'un poids exerçant une pression sur l'ensemble.

Après 18H de transfert, la membrane est rincée dans une solution de SSC 2X afin d'éliminer les éventuelles traces d'agarose. La membrane est ensuite exposée aux UV pendant 5 minutes pour permettre la fixation des ARN de façon irréversible. Ceci est suivi par un séchage à 80°C durant 2 heures afin permettre l'évaporation du formaldéhyde.

4.2) Détection d'un ARNm cible par hybridation avec une sonde radiomarquée

4.2.a) Préhybridation

Cette étape a pour but de saturer les sites libres de la membrane par un ADN hétérologue (ADN de sperme de saumon). Pour cela, on place la membrane avec la face portant les ARN tournée vers l'intérieur dans un cylindre en rotation continue pendant 4 heures à 60°C dans un four à hybridation, dans une solution de préhybridation (Sigma P-1290) complétement avec du sulfate de dextran à 8% (m/v), du SDS à 0,5% (m/v) et enfin extemporanément par de l'ADN de sperme de saumon à 100 µg/ml, que l'on dénature 5 min à 100°C.

4.2.b) Marquage de sonde

Le principe consiste à marquer un brin d'ADN (ici l'insert isolé de plasmide) par un nucléotide radioactif, grâce au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I de E.coli (qui possède les activités polymérase 5'→3' et exonucléase 3'→5'). La technique d'élongation employée est celle du multiamorçage au hasard : les amorces s'apparient à la sonde et sont reliées entre elles grâce à l'action du fragment de Klenow. La présence de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP dans le milieu réactionnel permet de marquer les fragments d'ADN neo-synthétisés.

Pour cela, le protocole suivant est réalisé :

La réaction est réalisée avec les réactifs présent dans le coffret « Prime-it II® », Pour cela, 25ng d'insert sont dissous dans 24 µl d'eau traité au DEPC additionnée de 10 µl d'amorces (hexamères de nucléotides synthétisés au hasard). Cette solution est chauffée 5 min à 100°C afin de permettre la dissociation des deux brins d'ADN. Après refroidissement à température ambiante pour permettre la fixation des hexamères sur les brins d'ADN, on ajoute 10µl de tampon contenant des dTTP, dGTP et dATP, 5 µl de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (50 µCi), et 1 µl de fragment de Klenow (1 U/µl). Le marquage est réalisé à 38°C pendant 15 min A la fin de cette étape, le fragment de Klenow qui

possède une activité polymérisique aura reconstitué un nouveau brin, qui présentera un marquage radioactif. La réaction est stoppée par l'addition de 2 µl d'EDTA (0,5 M, pH 8). La sonde est purifiée des nucléotides non incorporés par chromatographie d'exclusion, sur une colonne contenant du gel Sephadex G-50 en tampon TEN (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM et de l'EDTA 0,1 mM, pH 8). La fraction exclue contenant la sonde radiomarquée est recueillie.

4.2.c) Hybridation

La sonde préalablement marquée est dénaturée par chauffage à 100°C, puis additionnée à la solution de préhybridation. Cette hybridation est réalisée à 60°C pendant 18 heures.

4.2.d) Lavages

La dernière étape avant la révélation est le lavage qui a pour objectif d'éliminer la sonde non spécifique appariée et toute l'activité résiduelle. Les conditions de lavage utilisées sont stringentes et seules les sondes spécifiquement appariées restent associées à leur cible d'ARN messenger. Les membranes sont passées successivement 15 min dans trois solutions de lavage de stringence croissante (tampon SSPE 2X, 1X et 0,5X (m/v) pour la troisième solution, avec du SDS à 0,5% (m/v)).

4.2.e) Autoradiographie

La membrane est placée entre deux feuilles de plastique soudées, dans une cassette à autoradiographie contenant un film photosensible. Cette cassette est alors placée à -80°C (pour limiter l'effet Compton) pendant un temps dépendant de la quantité d'ARN d'intérêt présent sur la membrane et de la réactivité spécifique de la sonde. Le développement est réalisé selon un procédé photographique classique.

La membrane peut être utilisée pour plusieurs expériences : la sonde fixée est déshybridée par chauffage à 95°C pendant 1 minute, sous agitation lente, dans une solution de SSC 0,1X contenant du SDS 0,5% (m/v). La membrane est rincée avec une solution de SSC 0,1X et peut être conservée à 4°C dans un film plastique scellé.

4.2.f) Sondes d'ADN utilisées

- A) La sonde lumicanne est spécifique des ARNm codant le lumicanne humain. Il s'agit de l'ADNc du lumicanne cloné dans un plasmide pCR2.1-TOPO (Grover et coll. 2000)
- B) La sonde MoBg est spécifique des ARNm codant le biglycane murin. Il s'agit d'un fragment d'ADNc de 1.6 Kb cloné dans le plasmide Bluescript (Schonherr et coll. 1995).
- C) La sonde MoDec est spécifique des ARNm codant la décorine murine. Il s'agit d'un plasmide Bluescript contenant la totalité de l'ADNc de la décorine. Ce plasmide ainsi que le plasmide MoBg nous ont été gracieusement fournis par le Dr Larry Fisher du National Institute of health, Bethesda, USA (Fisher et coll. 1995).
- D) La sonde de 36B4 est spécifique des ARNm codant le gène de la 36B4. Il s'agit d'un fragment d'ADNc de 1.0Kb cloné dans le plasmide pBR 322 (Masiakowski et coll. 1982).

5) Précipitation des protéines

Les milieux de culture de cellules fibroblastiques MRC5 et de cellules de mélanome sont récupérés, et précipités par l'ajout d'acide acétique à 10% (25 µl pour 3 ml de milieu) et de 3 volumes d'éthanol absolu.

6) Extraction des protéines nucléaires

Les cellules de mélanomes de souris B16F1, sont cultivées en plaque 6 puits. Après une incubation de ces cellules avec du lumicanne recombinant, les cellules sont lavées dans de la PBS froide. Les cellules sont ensuite collectées par grattage dans 0,4 ml de PBS, centrifugées à 2000 rpm, 4°C, 5 min. Le culot est encore rincé une fois avec de la PBS, et ensuite il est incubé 15 min avec 0,4 ml d'une solution A (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 2 mM, EDTA 0,1 mM, leupeptine 1µg/ml, PMSF 0,4 M et orthovanadate de sodium 0,2 mM). On ajoute ensuite 25 µl de Nonidet P40 à 1%. On mixe vigoureusement une quinzaine de secondes et on centrifuge 15 à 30 secondes à 14000 rpm, 4°C. Le surnageant contient les protéines cytosoliques. Le culot est repris par 50 µl d'une solution B (HEPES 50 mM, KCl 50 mM, NaCl 300 mM, EDTA 0,1 mM, PMSF 0,4 M et orthovanadate de sodium 0,2 mM). On incube cette suspension 20 min sur la glace. On centrifuge 5 min, 14000 rpm à 4°C. Le surnageant contient les protéines nucléaires. Il est collecté et conservé à -80°C.

7) Extraction des protéines totales

A partir de tumeurs ou de tissus, on effectue une extraction des protéines totales. Pour ce faire, on découpe des fragments de tumeurs ou de tissus en petit morceaux et on broie ceux-ci en présence d'une solution d'extraction à 4°C (Tris HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, 0,6% Nonidet P40 et un cocktail d'inhibiteurs de protéinases (PMSF 1 mM, EDTA 5 mM et l'iodoacétamide 1 mM)). Après homogénéisation, les échantillons sont soniqués une 10 à 15 seconde sur la glace. On laisse ensuite les échantillons une nuit à 4°C sous agitation, on centrifuge et on récupère le surnageant, où l'on dose les protéines par la méthode de Lowry (Lowry et coll. 1951).

8) Digestion par l'enzyme N-glycosidase F et à la kératanase II

Afin d'étudier la composition glycanique des protéoglycannes sécrétés dans le milieu de culture des cellules B16F1, on précipite par l'ajout d'éthanol (cf chapitre 5).les protéines présent dans le le milieu de culture des différents échantillons. Le précipité est soit repris par du tampon Tris-HCL 0,1 M (pH 7,4), SDS 0,1% (m/v), nonidet P40 et incubé un nuit à 37°C avec 2.5 U/ml de N-Glycosidase F, soit repris par de l'acétate de sodium 10 mM (pH 6,5) et incubé 30 heures à 37°C avec 5mM/ml de keratanase II. Après digestion, les échantillons sont analysé par la technique de Western-blot (cf chapitre 11).

9) Dosage des protéines

Les dosages de protéines ont été effectués par des méthodes différentes selon les interférences potentielles : dosage selon les méthodes de Lowry ou de Bradford.

9.1) Dosage des protéines par la méthodes de Lowry

Cette technique de dosage de protéines (Lowry et coll. 1951) a été adaptée pour limiter au maximum le volume de la prise d'essai. Elle n'a pu être réalisée qu'en absence de détergent dans l'échantillon (SDS, Triton-X-100).

Le réactif de dosage est préparé extemporanément à partir de trois solutions : A (Na_2CO_3 2 % (m/v) dans NaOH 0,1 M), B (tartrate de sodium et potassium 2 % (m/v)) et C (CuSO_4 et $5\text{H}_2\text{O}$ 1 % (m/v)).

Les surnageants de culture, éventuellement conservés à -20°C , sont agités au Vortex et centrifugés 2 min à 10 000g pour éliminer toutes particules en suspension. Par la suite, 20 μl d'échantillons sont mélangés à 68 μl de réactif de dosage (4,9 ml de solution A, 0,05 ml de la solution B et 0,05 ml de la solution C) et 10 μl d'une solution de réactif de Folin-Ciocalteu de phénol 60 % (v/v). Les tubes sont agités au vortex et incubés 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'intensité de la coloration obtenue est évaluée par mesure de l'absorbance à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Parallèlement, une droite d'étalonnage de SAB (de 0 à 1 mg/ml) est réalisée. Les concentrations de protéines sont exprimées en mg/ml d'échantillon.

9.2) Dosage des protéines par la méthode de Bradford (Bradford 1976)

Cette technique est basé sur le principe de la variation de couleur du bleu de brillant de Coomassie G-250 par l'interaction à différente concentration de protéines. On mélange 10 μl d'échantillon avec 790 μl d'eau distillée et 200 μl de réactif Bio-Rad Protein Assay. On agite vigoureusement et on incube 15 min à température ambiante, on mesure l'absorbance à 595 nm. On réalise en parallèle, et dans les mêmes conditions, une gamme d'étalonnage avec de l'albumine bovine, qui permet de déterminer la concentration en protéines de nos échantillons.

10) Protocole pour Dot-Blot

La membrane de polyvinylidifluorure (Immobilon-P) est tout d'abord incubée dans du méthanol (15 secondes) et placée dans de l'eau. Ensuite, elle est installée sur le système de Dot blot, qu'on verrouille. On enclenche le vide, et on peut alors déposer les échantillons. Une fois que l'échantillon on adhéré la membrane, on coupe le vide. La membrane est alors mise dans du méthanol (15 secondes) afin de fixer les protéines.

Ensuite, on incube la membrane dans du TBS-T (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,6) + 0,05% (v/v) de Tween 20) avec 5% de lait au minimum 1 heure à température ambiante, on la rince avec du TBS-T (2 fois 2 min) et on l'incube avec l'anticorps primaire polyclonal (dilué au 1/200^{ème}), une nuit à 4°C . Il s'agit d'un anticorps primaire polyclonal dirigé contre le lumicanne humain qui a été obtenu par l'immunisation de lapins avec un polypeptide correspondant aux acides aminés 211 à 227 du lumicanne humain (YLDNNKISNIPDEYFKR) (Covalab). Cette séquence est retrouvée dans un certain nombre d'espèce, ainsi cet anticorps reconnaît le lumicanne humain, mais croise aussi avec le lumicanne de souris et de rat. On rince la membrane avec du TBS-T (3 fois 5 min), on ajoute un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (Amersham, Life Science)) (1 μl dans 10ml de TBS-T avec 1% lait) et on incube 30 min à température ambiante. Le

rinçage se fait avec du TBS-T (2 fois 10 min) et par du TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,6) (3 fois 5 min). La mise en évidence de l'activité peroxidase est révélée par incubation de la membrane pendant 5 minutes avec un substrat de chimioluminescence ECL. La membrane est ensuite mise à exposer sur un film photographique (hyperfilm ECL) pendant 30 secondes à 15 minutes. Le film photographique est ensuite révélé, séché et photographié.

11) Western-blot

11.1) Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS

Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium ou PAGE-SDS selon la méthode décrite par Laemmli (Laemmli 1970).

Les échantillons sont mis en suspension dans le tampon échantillon (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 2% (m/v), Glycérol 5% (v/v), bleu de bromophénol 0,001% (m/v) pH 6,8), et réduits en présence de 0,1 mM de DDT. Un gel de polyacrylamide à 7,5% (m/v) est préparé (Tris-HCl 0,375 M, SDS 0,1% (m/v), APS 0,05% (m/v), TEMED 0,05% (v/v) pH 8,8). Les échantillons ainsi qu'un témoin de masses moléculaires sont déposés. Le gel est alors soumis à un courant de 10 mA pendant 30 min puis de 20 mA pendant 1 heure 30 permettant respectivement la concentration et la migration des échantillons (tampon de migration : Tris 25 mM, SDS 0,1% (m/v), Glycine 192 mM pH 8,3).

Après migration, le gel est démoulé. Il peut alors être coloré pour révéler les protéines présentes (Bleu de Coomassie R-250 0,0025% (m/v), méthanol 40% (v/v), acide acétique 7% (v/v) ou bien, celles-ci peuvent être électrotransférées et immuno-révélerées.

11.2) Electrotransfert et immuno-révélation des protéines

Des protéines séparées en SDS-PAGE peuvent être révélées par la technique de Western-blot selon la méthode décrite par Towbin (Towbin et coll. 1979).

Après migration, le gel d'électrophorèse est équilibré 30 minutes dans le tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, 20% (v/v) pH 8,2). Les protéines sont alors électrotransférées par une tension de 15V pendant 30 minutes à température ambiante sur une membrane de polyvinylidifluorure (Immobilon-P), mise au contact du gel, à l'aide du système de transfert semi-dry Trans-Blot SD.

Après électrotransfert, la membrane est rincée avec le tampon TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,6) + 0,05% (v/v) de Tween 20 (TBS-T). La partie de la membrane correspondant à la

piste de migration des témoins de masses moléculaires est découpée et colorée à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie R-250 (bleu de Coomassie R-250 0,1% (m/v), méthanol 50% (v/v), acide acétique 7% (v/v)). Ceci permet de vérifier que la migration et le transfert des protéines ont bien eu lieu.

La membrane est incubée pendant 30 minutes en présence de tampon TBS-T + 5% (m/v) de SAB sous agitation en vue de saturer les sites de liaisons non spécifiques. La membrane est ensuite mise en présence du premier anticorps (1 /200) pendant 2 heures puis en présence de l'anticorps secondaire (1 /10000) couplé à la peroxidase. Entre chaque incubation, la membrane est lavée une fois 10 minutes puis 2 fois 5 minutes avec le tampon TBS-T et 3 fois 5 minutes avec du TBS afin d'éliminer toutes traces de Tween 20. La membrane est ensuite révélée par chimioluminescence ECL et exposition sur un film photographique.

Lors de cette étude, nous avons utilisé des anticorps anti-lumicanne, et des anticorps de la voie apoptotique anti-p53, anti-Bax, anti-PARP et anti-Caspase 3 et 9 (Apoptosis antibody sampler kit, Cell Signaling).

12) Dosage des métalloprotéinases (MMPs)

La zymographie est une technique dérivant de l'électrophorèse en gel polyacrylamide, adaptée à l'étude des activités enzymatiques. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE dans des conditions non réductrices, dans un gel contenant le substrat de l'enzyme étudiée (de la gélatine pour l'étude de la MMP2 et 9). Suite à la séparation, le gel est incubé avec un tampon permettant la renaturation des protéines et ensuite dans un tampon d'incubation permettant l'activité des protéinases étudiées. Ces protéinases dégradent alors le substrat présent dans le gel, au niveau de leur distance de migration. La révélation du gel se fait par une coloration en bleu brillant G-250 de Coomassie, ce qui permet de voir des plages de lyse, correspondant à l'activité protéinase (Heussen et coll. 1980).

12.1) Préparation des échantillons

Les échantillons concentrés sont repris dans du tampon échantillon (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 bleu de bromophénol 0,1 %, SDS 2 % et saccharose 4 %) avant d'être déposés, à taux égal de protéines sur chaque piste.

12.2) Zymographie en gel gélatine

12.2.a) Préparation du gel et migration

Les protéinases des surnageants de culture ou des extraits cellulaires totaux, sont soumises à une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS 0,1 % (m/v)) en gel de polyacrylamide 9 % (m/v), contenant de la gélatine 0,1 % (m/v). La migration est effectuée sous intensité constante (1 mA/cm), à 4°C, dans un tampon de migration pendant 2 heures. Un témoin positif est déposé en parallèle (pro-MMP2 ou pro-MMP9). A l'issue de la migration, le gel est lavé deux fois pendant 30 min dans du Triton X-100 à 2,5 % (v/v). Le gel est alors mis à incuber une nuit à 37°C dans un tampon favorisant la protéolyse de la gélatine par les gélatinases présentes (Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, Brij-35 0,002 % (m/v), pH 7,6).

12.2.b) Révélation du zymogramme

Après incubation, les gels sont colorés pendant 30 min dans une solution de bleu brillant G-250 de Coomassie (1 g dans 250 ml de méthanol, 35 ml d'acide acétique et 215 ml d'eau filtrée) et décolorés dans une solution d'acide acétique à 7,5% et de méthanol à 5 % dans l'eau, pendant une heure. Les protéines ayant une activité gélatinolytique apparaissent sous la forme de bandes claires sur fond bleu.

12.3) Zymographie caséine-plasminogène

Cette technique est une variante de la technique décrite précédemment, qui permet de mettre en évidence les activateurs du plasminogène (activateur de type urinaire : uPA et tissulaire : tPa) Elle consiste en l'incorporation de 1 mg/ml d' α -caséine et 10 μ g de plasminogène dans un gel SDS-PAGE à 12,5 % de polyacrylamide. Après la migration, les gels sont incubés pendant une nuit à 37°C dans un tampon d'incubation glycine 100 mM et 5 mM EDTA, pH 8,3 et colorés au bleu brillant G-250 de Coomassie. Les protéines ayant une activité protéinasique apparaissent sous la forme de bandes claires sur fond bleu.

12.4) Zymographie inverse

Les protéines sont séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 15 % (m/v) contenant un mélange de MMP2 active (200 ng de pro-MMP2 activée par l'acide 4-aminophényl mercurique (APMA)) et de gélatine (0,1%, (m/v)). Le gel est ensuite traité comme nous l'avons vu précédemment dans le paragraphe concernant le zymographie en gel gélatine (12.2). La MMP2 contenue dans le gel dégrade la totalité de la gélatine incorporée à celui-ci, excepté aux endroits où

elle est complexée aux inhibiteurs de gélatinases (TIMPs). Après coloration, les complexes sont repérés par la présence de bandes colorées par le bleu brillant G-250 de Coomassie, seules portions du gel où la gélatine n'a pas été dégradée.

12.5) Dosage d'activité plasmine générée

L'activité plasmine et u-PA se mesurent en utilisant un substrat chromogène spécifique de chaque activité enzymatique. La séquence peptidique H-D-Val-Leu-Lys-pNa (réactif S2251) clivée par l'enzyme est couplée à la paranitroaniline (pNa). Le taux de pNa libéré, est évalué par une mesure d'absorbance à 405 nm. Ce taux est proportionnel à l'activité de l'enzyme.

Dans les milieux de culture

Après 24 heures d'incubation, les milieux de culture sans SVF des cellules étudiés sont prélevés et centrifugés. Dans une plaque à 96 puits, sont successivement déposés dans chaque puits : 5 µl d'échantillon, 155 µl de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8, 20 µl de solution de plasminogène (40 µg/ml) et 20 µl de solution de réactif S2251 à 0,3 mM. On incube à 37°C à l'abri de la lumière et l'absorbance à 405 nm est mesurée toutes les 10 min.

Sur les couches cellulaires

Après une incubation de 24 heures des cellules, les milieux de culture sont prélevés. Les cellules sont rincées avec 200 µl de PBS. Sont successivement ajoutés dans chaque puits : 160 µl de PBS, 20 µl de solution de plasminogène (40 µg/ml) et 20 µl de solution de réactif S2251 (0,3 mM). On incube à 37°C à l'abri de lumière L'absorbance à 405 nm est mesurée.

13) Dosage des glycosaminoglycannes :

13.1) Protocole d'incorporation de sulfure ³⁵S et de glucosamine tritiée

Les cellules à confluence en plaque 24 puits, sont rincées avec une solution saline (deux fois 1ml) et on ajoute 1,4 ml d'un milieu MEM sans sulfate complété avec 1 % de SVF dialysé, de l'HEPES à 10mM, de l'acide ascorbique à 50 µg/ml, un dixième du volume de milieu RPMI et du sulfure (³⁵S), à raison de 20 µCi/ml. Pour le marquage à la glucosamine tritiée, on utilise un milieu RPMI complété avec 1 % de SVF, de l'HEPES à 10 mM, de l'acide ascorbique à 50 µg/ml et de la glucosamine ³H, à raison de 10 µCi/ml.

On prépare ainsi 3 puits avec du ³⁵S et 3 puits avec du ³H et on laisse incuber à 37°C pendant 24H.

Après l'incubation, on ajoute 50 µl par puits de sulfate de sodium à 5 % et de la chondroïtine-sulfate à 100 µg/ml pour le marquage au ³⁵S et 50 µl par puits de glucosamine à 2 % et de chondroïtine-sulfate à 100 µg/ml pour le marquage à la glucosamine ³H. On laisse incuber 15 min. Ensuite, on récupère les milieux dans des tubes de 2 ml. La couche cellulaire est rincée par 200 µl de PBS, que l'on ajoute au milieu que l'on a précédemment récupéré. La couche cellulaire est à nouveau rincée par 1 ml de PBS que l'on ne récupère pas par la suite. Enfin on additionne 800 µl de NaOH à 50 mM et on incube 10 min à 80°C.

13.2) Mesure de l'incorporation par la technique de CPC

On prélève 2 fois 40 µl du milieu de culture, et de l'extrait de la couche cellulaire que l'on dépose sur une feuille de papier Whatman 3MM, que l'on le sèche à l'air libre. Le papier Whatman est lavé à 3 reprises (un premier bain de 30 min, suivi par un de 2 heures et enfin un dernier d'une nuit) dans une solution CPC à 1 % (m/v), sulfate de sodium à 0,5 g/l (m/v) et NaCl à 1 g/l (m/v) pour ne retenir que la radioactivité incorporée dans les macromolécules sulfatées ou marqué de glucosamine tritiée (Wasteson et coll. 1973). Les feuilles de papier Whatman sont séchées, découpées et déposées dans 2 ml de liquide de scintillation (Instagel). Le comptage de la radioactivité est effectué dans un compteur à scintillation liquide Packard.

14) Production et purification de plasmide

14.1) Transformation des bactéries αDH5 et JM109(DE3) et sélection sur agar

Après une incubation de 30 min sur glace, le mélange plasmides repris dans de l'eau et bactéries subit un choc thermique de 90 sec à 42°C, suivi d'un refroidissement rapide. Après une pré-incubation d'1 heure à 37 °C dans 750 µL de LB, le mélange est concentré par centrifugation. 200 µL de culture sont étalés sur boîte de pétri contenant 10 mL de LB à 1,5 % d'Agar (m/v) et 100 µg/mL d'ampicilline. Si nécessaire, le milieu contient en plus 140 µg/mL d'IPTG et 100 µg/mL d'X-GAL. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C dans une chambre humidifiée.

14.2) Extraction des plasmides

La première étape consiste à mettre en culture des bactéries transformées par le plasmide d'intérêt. Pour cela, une colonie bactérienne prélevée sur une boîte de pétri est inoculée dans un millilitre de milieu LB en présence d'ampicilline (à 100 mg/ml). Après 15H d'agitation à 37°C, 150 µl de cette culture sontensemencés dans 150 ml de milieu LB avec ampicilline et incubés à nouveau 15 H à 37°C.

On centrifuge 100 ml de ce milieu de culture à 6000 rpm 10 min à 4°C. Le culot bactérien est repris par 8 ml de la solution de resuspension (Tris-HCl à 150 mM, 10 MM d'EDTA et du glucose à 50 mM).

Les bactéries sont lysées par 16 ml de la solution de lyse (200 mM de NaOH et 1% de SDS (m/v)) pendant 15 min dans la glace. L'ADN bactérien est ensuite précipité pendant 15 min à 4°C en ajoutant 12 ml de solution de neutralisation (acétate de potassium 5 M, pH 5,5) préalablement refroidie à 4°C.

Après une centrifugation de 15 min à 6000 rpm, le culot est séché puis resuspendu dans 5 ml de TE. L'ARN est précipité en ajoutant 0,5 volume d'une solution d'acétate d'ammonium 7,5 M. Cette solution est centrifugée 15 min à 4000 rpm.

Le surnageant qui contient l'ADN plasmidique est précipité par deux volumes d'éthanol absolu. Après au moins 2 H à -80°C, une nouvelle centrifugation est effectuée (15 min/10000 rpm/4°C). Le culot est repris par 1 ml d'eau traitée par le DEPC. L'échantillon est ensuite digéré par de la RNase A (à raison de 100 µg/ml) pendant 30 min à 37°C, afin d'éliminer toute trace d'ARN.

Afin de purifier l'échantillon, on procède à une extractions phénol-chloroforme. Par la suite, on précipite l'ADN plasmidique par l'ajout de 3 volumes de l'éthanol absolu et de d'acétate d'ammonium 10 M (pour une concentration finale de 2M). Après centrifugation (10 min à 6000 rpm) le culot est repris par 150 µl d'eau stérile.

14.3) Vérification des plasmides extraits

La concentration ainsi que la pureté de l'ADN présent dans l'échantillon est déterminée en effectuant une mesure de l'absorbance à 260 nm/280 nm. L'intégrité des échantillons est ensuite vérifiée après avoir effectué une digestion par des enzymes de restriction appropriés. Pour cela, 1 µg d'ADN plasmidique est incubé 10 min à 65°C afin de dénaturer d'éventuelles protéases bactériennes et d'éliminer les structures secondaires du plasmide. La digestion se fait après addition de tampon MULTI-CORE™ 10X (Promega) et d'enzyme de restriction. Après 2 heures d'incubation à la température optimale de l'enzyme, on procède à une séparation électrophorétique en gel

d'agarose 1% (m/v) en présence de BET. Les fragments obtenus sont visualisés sous rayonnement UV.

15) Sous clonage, expression et purification du lumicanne recombinant

Construction du plasmide d'expression pQE30-Hlum et amplification des plasmides pCR[®]2.1-TOPO contenant l'insert du lumicanne et pQE30. Ces expériences ont été effectuées avec l'aide de M.F. D'Onofrio et C. Perreau.

15.1) Digestion enzymatique des plasmides pCR[®]2.1-TOPO et pQE30

La digestion enzymatique des plasmides est réalisée dans un volume de 50 µl contenant 5 µl de tampon de digestion MULTI-CORE™ 10X (Promega). Le plasmide pCR[®]2.1-TOPO contenant l'ADNc du lumicanne humain (donné par le Dr. P.ROUGHLEY; Genetics unit, M^cGill University, Montréal) est digéré par 5 µl de KpnI à 10 U/µl et 5 µl de EcoRV à 10 U/µl, le plasmide pQE30 est digéré par 2 µl de KpnI à 10 U/µl et 2µl de SmaI à 10 U/µl. Le volume est complété par de l'eau qsp 50 µl. La digestion enzymatique du plasmide pCR[®]2.1-TOPO est réalisée à 37°C durant 2 heures. Pour le plasmide pQE30, elle s'effectue d'abord à 25°C (température optimale pour SmaI) durant 2 heures puis la solution est portée à 37°C (température optimale pour KpnI) pour la même durée. La digestion est vérifiée par une électrophorèse en gel d'agarose 1 % (m/v) contenant du BET. Les fragments sont visualisés sous rayonnement UV.

15.2) Extraction des fragments de restriction (coffret GENE CLEAN[®])

Les bandes d'intérêt excisées du gel décrit ci-dessus, sont déposées chacune dans 3 volumes de solution de NaI puis incubées à 55°C durant 5 min. L'ADN est précipité par ajout de la solution GLASSMILK[®]. Après une brève centrifugation, le culot est lavé par 3 volumes de solution NEW Wash et centrifugé à nouveau. Le culot est séché avant d'être repris dans un tampon de solubilisation (DNA dilution buffer 5X, Boehringer). Après une dernière centrifugation, l'échantillon présent dans le surnageant est récupéré.

15.3) Ligation et transformation du plasmide d'expression pQE30-HLum

La ligation est réalisée selon le protocole Rapid DNA Ligation Kit (Boehringer Mannheim). A 10 µl de solution de plasmide pQE30 digéré par les enzymes KpnI et SmaI, sont ajoutés 5 µl de solution contenant l'ADNc du lumicanne humain obtenu après digestion du plasmide pCR[®]2.1-TOPO par les enzymes KpnI et EcoRV, ainsi que 15 µl de tampon de ligation 2X et 1 µl de ligase (5 U/µl). La réaction se déroule à température ambiante durant 30 min.

La transformation des bactéries, la sélection des clones, la culture en milieu liquide et l'extraction du plasmide s'effectuent comme décrites précédemment, à l'exception de la sélection des clones sur agar qui est réalisée en absence d'IPTG et de X-GAL, le plasmide d'expression n'étant pas doté du gène codant l'enzyme β-galactosidase il n'y a donc pas de sélection blanc/bleu possible.

Afin de vérifier la présence de l'insert du lumicanne dans le plasmide pQE30-HLum, un premier échantillon est digéré par l'enzyme de restriction HindIII, un second échantillon est digéré par HindIII et KpnI. Une électrophorèse en gel d'agarose 1 % (m/v) contenant du BET est ensuite réalisée.

L'insert contenu dans le plasmide est séquencé par la société MWG Biotech. Pour cela, 2 µl de plasmide non digéré sont dilués dans 18 µl d'eau, 2 µl d'acétate de sodium 3M et dans 3 volumes de éthanol 100 %. La suspension est laissée une nuit à -20°C afin de précipiter l'ADN. Après centrifugation (10000 rpm, 20 min à 4°C) le culot est repris dans 1 ml d'éthanol 75 % puis évaporé à sec.

Les bactéries JM109(DE3), souche d'expression des protéines (Promega) sont transformées par le plasmide d'expression pQE30-HLum selon la procédure décrite ci-dessus.

16) Production du lumicanne recombinant

16.1) Culture bactérienne

Les bactéries JM109(DE3) transformées par le plasmide d'expression pQE30-HLum sontensemencées dans 25 ml de LB contenant 50 µg d'ampicilline/mL. La pré-culture est ensuite incubée à 37°C sous agitation pour la nuit. Puis la pré-culture est diluée dans 100 ml de LB à 50 µg d'ampicilline/ml de manière à partir d'une culture dont l'absorbance à 600 nm est de 0,15. La culture est ensuite incubée à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une absorbance à 600 nm comprise entre 0,5 et 0,7.

L'induction de la synthèse de lumicanne recombinant est réalisée par ajout d'IPTG dont la concentration finale est de 0,4 mM, le plasmide possédant le promoteur de ce gène. Après 4 heures d'induction, la suspension est centrifugée (4000 rpm, 15 min à 4°C). Le culot est repris dans 1,5 ml de tampon TE.

16.2) Extraction du lumicanne recombinant des corps d'inclusion

Les bactéries sont éclatées par sonication sur glace (3 fois 1 min à l'amplitude 12). Après centrifugation (3000 rpm, 5 min), le culot est repris dans 2 ml de tampon Tris 10 mM, pH 8. La suspension est centrifugée (3000 rpm, 5 min), puis le culot est repris dans 2 ml de tampon B. La suspension est agitée à température ambiante pendant 30 min. Après centrifugation (10000 rpm, 5 min), le surnageant est récupéré.

16.3) Purification par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA superflow

Le surnageant mélangé à 1 ml de résine Ni-NTA superflow (Quiagen) est agité pendant 1 heure à température ambiante. Après dépôt dans une colonne, ce mélange est lavé successivement par 4 mL de tampon B à pH 6,3 et 5,9. Puis, le lumicanne recombinant est élué par du tampon B à pH 4,5. La solution de lumicanne recombinant purifié est ensuite dialysée contre de l'eau distillée pendant 3 jours à 4°C (avec renouvellement de l'eau deux fois par jour) pour éliminer l'urée. Le lumicanne recombinant est lyophilisé, solubilisé dans 1 mL de PBS puis conservé à -20°C.

17) Transfection de l'ADNc codant le lumicanne humain

17.1) Construction du plasmide

La digestion enzymatique des plasmides est réalisée dans un volume de 50 µl contenant 5 µl de tampon de digestion MULTI-CORE™ 10X (Promega). Le plasmide pCR®2.1-TOPO est digéré par 2 µl d'EcoRI à 10 U/µl, le plasmide pcDNA3 est, quant à lui, digéré par 2 µl d'EcoRI à 10 U/µl. La digestion enzymatique du plasmide pCR®2.1-TOPO et pcDNA3 est réalisée à 37°C, 2 heures. Le fragment de 1,2 Kb ainsi libéré par la digestion du plasmide pCR®2.1-TOPO est extrait, ligué au plasmide pcDNA3 et transformé dans des bactéries compétentes (selon les protocoles vus précédemment : paragraphe 14.1).

Afin de vérifier la présence de l'insert du lumicanne dans le plasmide pcDNA3-HLum, un premier échantillon est digéré par l'enzyme de restriction EcoRI, un second échantillon est digéré par HindIII. Une électrophorèse en gel d'agarose 1 % (m/v) contenant du BET est ensuite réalisée.

L'insert contenu dans le plasmide est séquencé par la société MWG Biotech.

17.2) Transfection stable de cellules B16F1 et sélection des clones positifs

Un million de cellules B16F1 sont ensemencées dans une boîte de pétri de 100 mm, de manière à obtenir 90 % de confluence cellulaire. Le lendemain, ces cellules sont rincé deux fois par une solution saline et transfectées en présence d'un milieu sans SVF à l'aide de l'agent transfectant lipofectamine 2000, à raison de 5 µl pour 3 µg d'ADN plasmidique purifié (cf chapitre 14.3), (un plasmide pcDNA3 contenant l'ADNc du lumicanne humain, on utilise comme témoin négatif de transfection le plasmide pcDNA3 sans insert). Vingt quatre heures après la transfection, on ajoute du milieu de culture RPMI en présence de 2 % de SVF et de G418 (généticine), à raison de 400 µg par ml de milieu. Le milieu est changé tous les 2 jours. Après 15 jours de traitement, les clones sont individualisés et collectés à l'aide d'un cylindre de clonage.

18) Modèle d'étude *in vivo*

Les expériences *in vivo* ont été effectuées en collaboration avec le Dr L. Ramont.

18.1) Modèle animal

Nous avons utilisé des souris C57BL6 provenant du centre d'élevage Harlan (Gannat, France). Ce sont des souris noires à croissance rapide et possédant une bonne homogénéité génétique. La masse moyenne des souris au cours de nos expérimentations était de 18 à 20 g avec un age moyen de 6 à 8 semaines. Les animaux sont hébergés dans une pièce à température et ventilation constante, à l'animalerie de la faculté de Médecine de Reims. La boisson et l'alimentation sont fournies *ad libitum* pendant toute la durée des expériences. L'hébergement et toutes les manipulations ont été effectués en respectant les réglementations et l'éthique pour l'expérimentation animale selon les recommandations du Centre National de la Recherche Scientifique. Les souris n'étaient utilisées qu'après une période d'acclimatation de deux semaines minimum.

18.2) Modèle expérimental de tumeur sous cutanée

Les cellules de mélanome B16F1 sont trypsinisées, reprises par du milieu de culture, comptées et diluées au nombre nécessaire. Les cellules en suspension sont alors incubées à 37°C sous atmosphère à 5 % de CO₂ pendant 15 min en présence des effecteurs. Les cellules (100 000 par souris) sont injectées en sous-cutané chez les souris C57BL6 au niveau du flanc gauche, dans un volume de 0,1 ml. La présence d'une tuméfaction visible à la suite de l'injection atteste du caractère sous-cutané de celle-ci. A J-14, les souris sont sacrifiées par inhalation de CO₂.

18.3) Méthode de mesure

Le diamètre vertical et le diamètre horizontal des tumeurs sont mesurés au pied à coulisse après le sacrifice des souris. La présence ou non de métastases pulmonaires est alors vérifiée. Tout tumeur péritonéale signale une injection défectueuse et entraîne l'exclusion de l'étude. La mesure des deux diamètres permet le calcul du volume tumoral selon la formule :

$$V=0,5 \times (\text{Diamètre horizontal}) \times (\text{Diamètre vertical})^2 \text{ (Wald et coll. 2001)}$$

18.4) Modèle expérimental de formation de métastases pulmonaires

Les cellules de mélanome B16F1 sont trypsinées, reprises par du milieu de culture, comptées et diluées au nombre nécessaire. Les cellules (250 000 par souris) sont injectées dans l'une des veines de la queue chez les souris C57BL6 dans un volume de 0,1 ml. Au jour 14 après l'injection initiale, les souris sont sacrifiées par inhalation de CO₂. Après dissection, les poumons sont prélevés puis examinés sous loupe binoculaire. Le nombre et la taille des métastases formées sont ainsi évalués. Nous comptabilisons le nombre de métastases d'un diamètre compris entre 1 et 3 mm.

19) Histologie

Ces études ont été faites en collaboration avec Mme L. Venteo dans le laboratoire d'Anatomie Pathologique du CHU de Reims.

19.1) Fixation des tissus

Après la mesure macroscopique de leur taille, les tumeurs sont extraites par dissection et fixées dans du formol afin d'immobiliser les constituants tissulaires et cellulaires dans un état le

plus proche possible du vivant et de stopper la lyse tissulaire. Les prélèvements sont ensuite coupés en petits morceaux et déposés dans des cassettes en plastiques.

19.2) Le paraffinage

A la suite de la fixation par le formol, les différents tissus séjournent dans une série de liquides intermédiaires qui va permettre l'imprégnation de ce tissu par une matière rigide qui lui donnera la résistance voulue. L'imprégnation repose sur le remplacement de l'eau contenue dans le tissu par une substance solide et chimiquement inactive qui généralement est la paraffine. Cependant, l'eau et la paraffine sont deux substances non miscibles, il va donc falloir employer des substances intermédiaires (alcool et xylène). Les tissus sont déshydratés, par des bains successifs d'alcool de degré croissant (éthanol 70% 30 min, éthanol 95 % 3 x 45 min, éthanol 100 % 45 min, éthanol 100 % 2 x 1 heure). L'étape de clarification consiste à remplacer l'alcool par du xylène (trois bains de xylène, de 30, 40 et 60 min). Ensuite on passe à l'étape d'imprégnation, où le xylène est remplacé par de la paraffine en surfusion à environ 55°C (un bain de 15 min, de 30 min, d'une heure et de 1 heure 30 min).

19.3) L'inclusion

La mise en bloc s'effectue grâce à des moules en métal Tissue Tek®, de taille variable en fonction de la pièce à inclure. L'inclusion se réalise à l'aide d'un appareil Tissue Tek®. Il délivre la paraffine liquide dans le moule, la pièce y est déposée et orientée à l'aide des pinces chauffées. La paraffine est ensuite légèrement refroidie afin de figer la pièce, puis la cassette en plastique est placée par dessus le moule. Le tout est recouvert de paraffine et déposé sur une plaque réfrigérée à environ -15°C ; lorsque la paraffine se figera, la cassette sera scellée au bloc paraffine contenant la pièce. Il sera alors possible de démouler le bloc.

19.4) Microtomisation

A partir des blocs de paraffine, et à l'aide d'un microtome, des coupes de 4 µm d'épaisseur sont confectionnées, étalées sur lame et colorés.

19.5) Coloration

Celle utilisée est une coloration trichromique à l'Hématéine Phloxine Safran (HPS). Elle colore les noyaux en bleu, les cytoplasmes en rose et les tissus conjonctifs en jaune orangé. Une lamelle est ensuite déposée sur la coupe après avoir ajouté deux gouttes de résine synthétique sur la lame. Cette étape a pour objectif de protéger les coupes tissulaires dans le temps.

20) Technique d'immunohistochimie

20.1) Principe

Cette technique peut être utilisée sur tous les tissus, le principe est de mettre en évidence *in situ* des antigènes à l'aide d'anticorps marqués. La révélation de ce marquage se fait grâce à une réaction enzymatique utilisant une peroxydase dont le substrat est une molécule chromogène.

20.2) Protocole

Les prélèvements inclus en paraffine sont coupés au microtome et déposés sur des lames de verre superfrost® (CML). Les coupes de 3 µm ainsi obtenues sont utilisées pour les immunomarquages. Nous avons utilisé le kit de marquage Ultravision (Microcom). Les lames sont traitées selon le protocole suivant :

- Les lames sont en premier lieu déparaffinées puis réhydratées

Bain de Xylène	3x5 min
Alcool 100%	rincer les lames Changer l'alcool et laisser 5 min
Alcool 95%	5 min
Alcool 70%	5 min
Eau du robinet	plusieurs rinçages
Eau distillée	

- Inhibition des peroxydases endogènes, par incubation des lames dans de l'eau oxygénée à 3% durant 10 min

- Restauration antigénique à l'autocuiseur, dans du tampon citrate pH 6, 1 min 30 sous pression

- Rinçage à l'eau distillée, deux bains de 5 min, puis dans de la PBS

- Blocage des sites non spécifiques par une incubation avec un sérum normal non immun (Microcom, Labvision) de même espèce que l'anticorps secondaire pendant 6 min

- Incubation avec l'anticorps primaire, une nuit à 4°C (dilution 1/50 pour l'anticorps anti-lumicanne et 1/200 pour l'anticorps anti-cycline D1 (clone SP4, Microm Microtech)
 - Rinçage dans de la PBS, deux fois 5 min
 - Incubation avec un anticorps secondaire biotinylé, pendant 10 min
 - Rinçage dans de la PBS, deux fois 5 min
 - Incubation avec le réactif streptavidine couplé à la peroxydase, 10 min
 - Révélation de l'activité peroxydasique par le chromogène AEC (3 amino-9-ethylcarbazole), 20 min (donnant un précipité rouge)
 - Rinçage à l'eau et Contre-coloration à l'hématéine (bain d'hématéine (10 secondes), plusieurs rinçages à l'eau courante, un bain d'eau lithinée de quelques secondes, plusieurs rinçages à l'eau courante et un bain d'eau distillée)
 - montage des lames avec du glycergel (Dako) et une lamelle
- Les lames sont ensuite observées au microscope optique.

21) Etudes Statistiques

Sauf mention contraire, chaque expérience a été réalisée au minimum en triplicata. Les valeurs moyennes sont exprimées plus ou moins une erreur standard de la moyenne (SEM). Lorsqu'ils sont représentés graphiquement, les SEM sont symbolisées par une barre.

Les tests suivants ont été utilisés pour l'analyse statistique :

Test de Student avec séries appariées (méthode des couples).

Test non paramétrique de Mann et Whitney pour les résultats obtenus *in vivo*

Les niveaux de probabilités sont schématisés par les signes suivants :

NS = non significatif

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

RESULTATS

I Lumicanne et vieillissement cutané

1) Souches cellulaires

Pour cette étude, nous avons cultivé un large panel de cellules fibroblastiques que nous avons réparti en trois classes d'âge (Figure 11) : une classe comprenant des cellules de sujets jeunes (de moins de 15 ans), des cellules adultes (de 16 ans à 50 ans) et des cellules âgées (plus de 50 ans). En tout, 36 souches de cellules ont été cultivées, 12 pour chaque tranche d'âge. L'ensemble des expériences est réalisé avec des cellules à confluence et présentant un passage compris entre le 3^{ème} et le 4^{ème}. Cette étude est réalisée en duplicate.

2) Analyse des ARNm par Northern-blot

L'analyse par Northern-blot des ARN messagers spécifiques des petits protéoglycannes a été effectuée sur un total de 36 lignées de fibroblastes d'âges différents, divisées en trois séries d'expériences.

L'analyse des ARN messagers par Northern-blot pose toujours le problème de l'ARN de référence auquel seront comparés les ARNm d'intérêt. Lors de notre étude sur le vieillissement, nous avons testé deux références: la 36B4 qui est un ARNm d'une protéine ribosomiale, et l'ARN ribosomal 18S qui représente un index de la quantité totale d'ARN déposée sur le gel. Il nous est apparu que la comparaison avec ce dernier, donnait les résultats les plus reproductibles et les plus significatifs. C'est donc par rapport à l'ARN ribosomal 18S qu'ont été exprimées les mesures des ARNm des petits protéoglycannes lors de l'étude sur le vieillissement des fibroblastes dermiques.

2.1) Décorine

La première série d'expériences montre, sur les figures 12 et 12 (suite), l'hybridation des ARN extraits des cellules fibroblastiques avec une sonde d'ADNc de la décorine, qui permet de voir deux transcrits, cela correspond à ce qui est observé dans la littérature. La quantification des gels a été effectuée par un analyseur d'image (Vilbert Lourmat). Les résultats représentés sur la figure 13 expriment le taux d'ARNm de la décorine en fonction du taux de l'ARN ribosomal 18S. On peut constater qu'il n'y a aucune modification significative dans l'expression de la décorine avec l'âge, dans les cellules fibroblastiques. La figure 13 A montre une tendance à l'augmentation statistiquement non significative de l'expression de la décorine entre les sujets de la classe jeune, adulte et âgée. La courbe de corrélation (figure 13 B), aplanit cette augmentation.

Sujets jeunes

Age	Sexe	Localisation
1 mois	F	orteil
1 ans	H	prépuce
2 ans	H	prépuce
3 ans	H	prépuce
4 ans	H	prépuce
5 ans	H	prépuce
5 ans	H	prépuce
7 ans	H	prépuce
8 ans	H	prépuce
11ans	F	?
12 ans	H	prépuce
12 ans	H	prépuce

Sujets adultes

16 ans	F	Peau abdominale
21 ans	F	Peau abdominale
22 ans	F	Peau abdominale
28 ans	F	Peau abdominale
31 ans	F	Sein
34 ans	F	?
39 ans	F	?
42 ans	F	Tatouage
46 ans	F	Paupière
47 ans	F	Paupière
49 ans	F	?
49 ans	F	Paupière

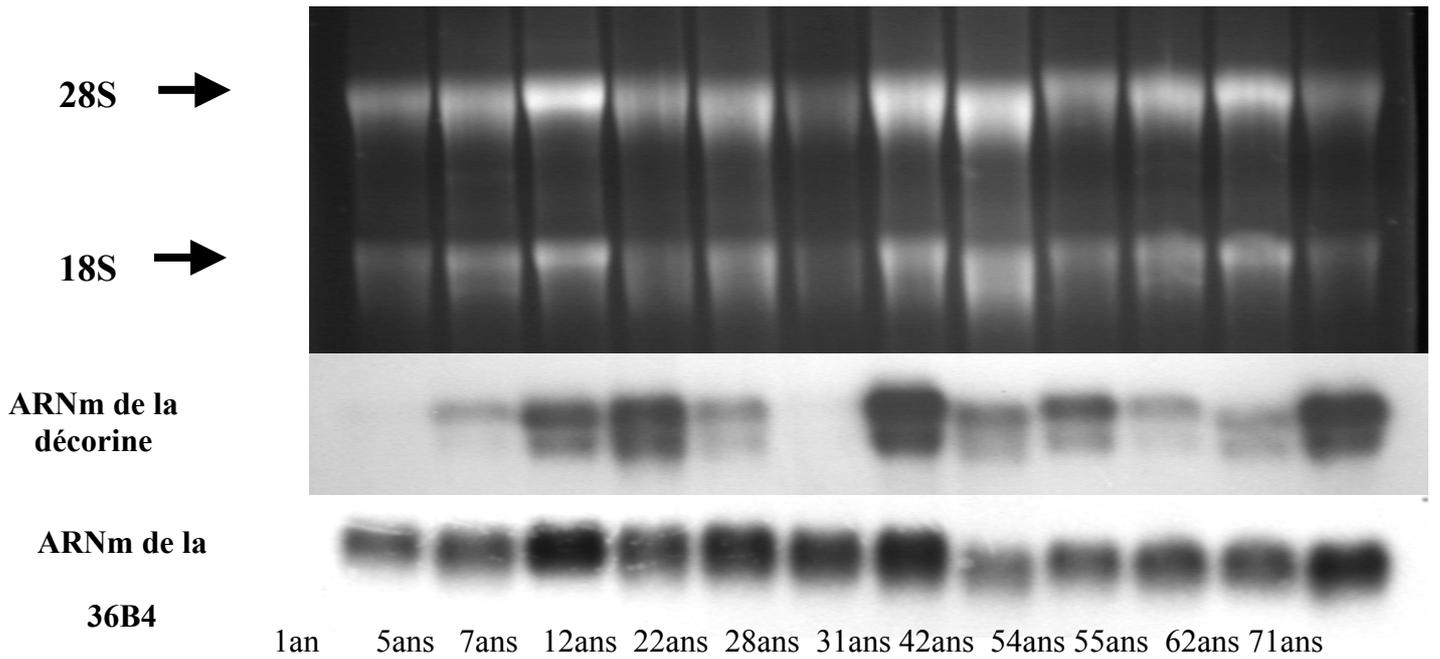
Figure 11 : Liste des lignées de fibroblastes qui ont été utilisées pour l'ensemble de cette étude. Les cellules sont réparties en trois classes d'âge : jeune, adulte et âgé.

Sujets âgés

Age	Sexe	Localisation
51 ans	H	Peau abdominale
54 ans	F	Paupière
55 ans	F	Paupière
58 ans	F	Peau abdominale
61 ans	F	Paupière
62 ans	F	Paupière
63 ans	F	Tatouage
65 ans	F	Paupière
68 ans	F	Paupière
69 ans	F	Paupière
71 ans	H	?
83 ans	F	?

Figure 11 (suite) : Liste des lignées de fibroblastes qui ont été utilisées pour l'ensemble de cette étude. Les cellules sont réparties en trois classes d'âge : jeune, adulte et âgé.

Coloration BET



Coloration BET

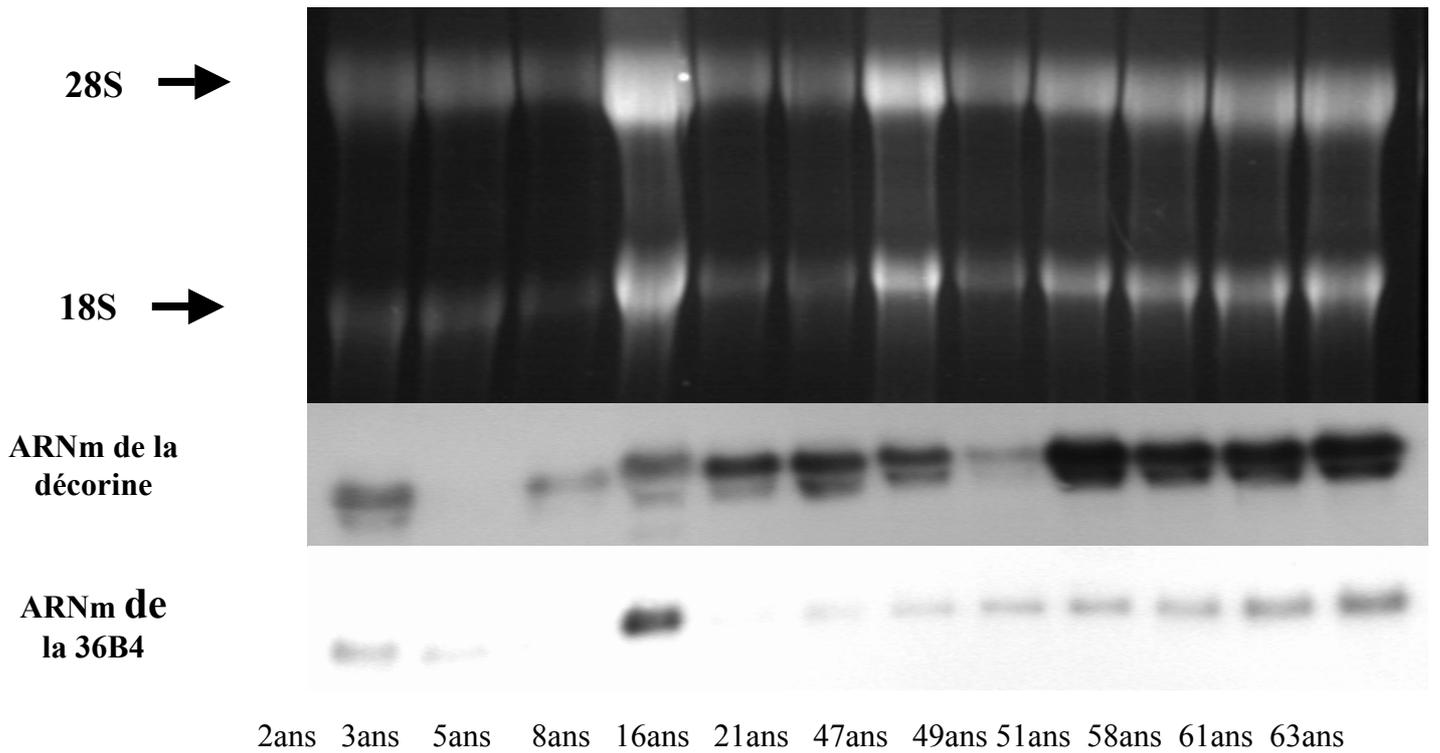


Figure 12 : Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm de la décorine et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.

Coloration BET

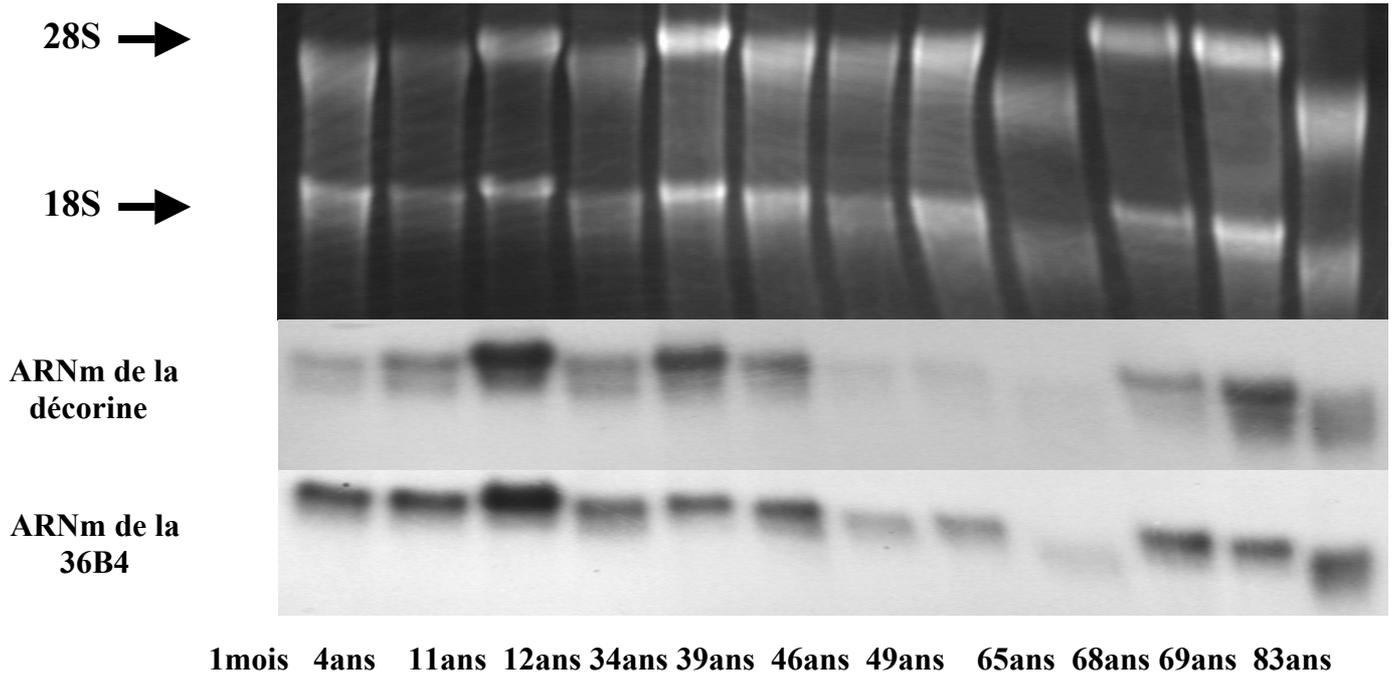


Figure 12 (suite) : Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm de la décorine et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.

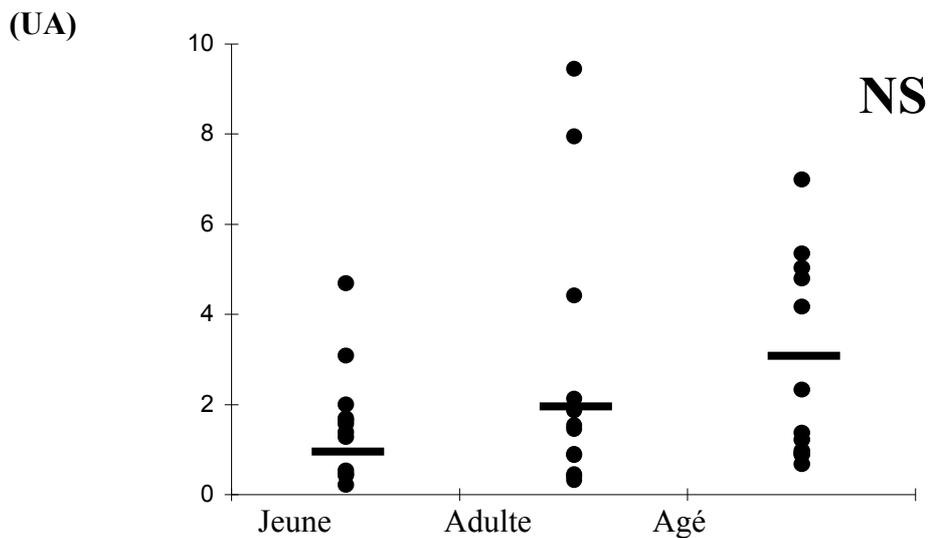
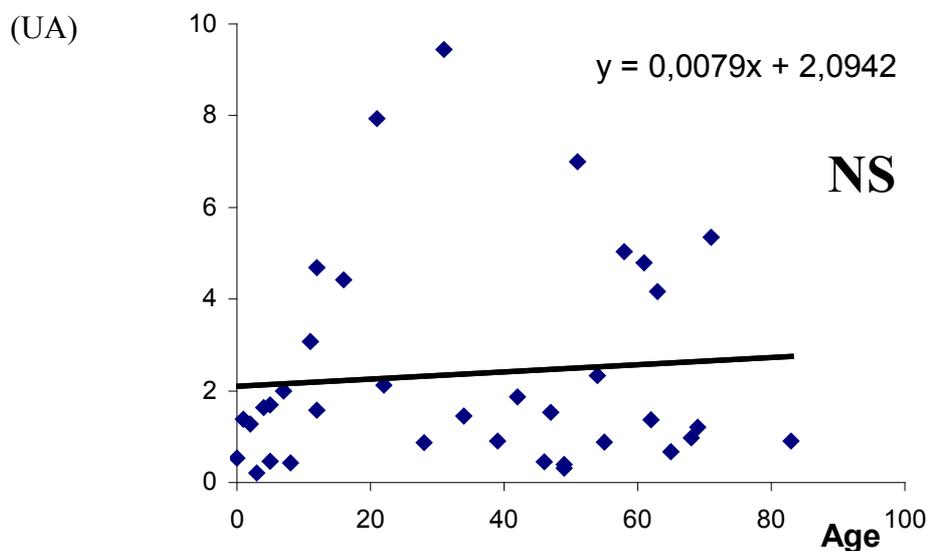
A**Rapport du taux d'ARNm de Décorine/ taux d'ARN ribosomal 18S****B**

Figure 13: Comparaison du taux d'ARNm de la décorine par rapport au taux d'ARN ribosomal 18S mesuré par Northern-blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés. Le graphique A montre la différence d'expression de la décorine entre les trois classes d'âge et le graphique B montre la courbe de corrélation de l'expression du rapport décorine sur l'ARN ribosomal 18S en fonction de l'âge.

NS : non significatif

2.2) Biglycane

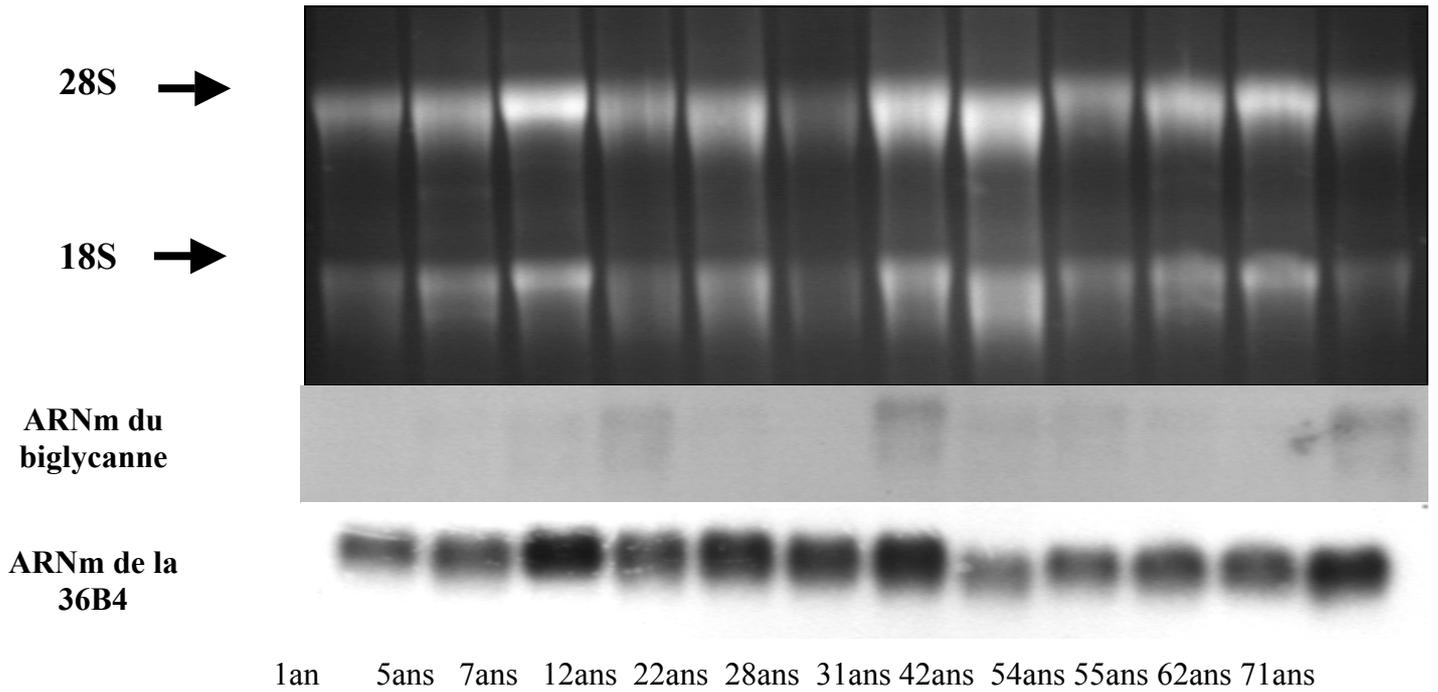
La deuxième série d'expériences montre sur la figure 14, l'hybridation des ARN extraits des cellules fibroblastiques avec une sonde d'ADNc du biglycane, qui permet de voir un transcrit de 2,8 kb. La quantification des gels a été effectuée par un analyseur d'image. Les résultats représentés sur la figure 15 A et B expriment le taux d'ARNm du biglycane sur le taux d'ARN ribosomal 18S. On peut constater qu'il n'y a aucune modification significative dans l'expression du biglycane en fonction de l'âge dans les cellules fibroblastiques.

2.3) Lumicanne

La troisième série d'expériences montre sur les figures 16 et 16 (suite), l'hybridation des ARN extraits des cellules fibroblastiques avec une sonde d'ADNc du lumicanne, qui permet de voir un transcrit de 1,9 kb. La quantification des gels a été effectuée par un analyseur d'image. Les résultats représentés sur la figure 17 A et B expriment le taux d'ARNm du lumicanne sur le taux d'ARN ribosomal 18S en fonction de l'âge. La diminution de l'expression du lumicanne, dans les cellules fibroblastiques en fonction de l'âge, est statistiquement significative. On peut voir sur la figure 17 A une diminution significative entre la classe des sujets jeunes et celles des sujets adultes de plus de 20% ($p < 0,05$) et une inhibition de plus de 50% de l'expression du lumicanne entre la classe des sujets jeunes et celles des sujets âgés ($p < 0,005$). La courbe de corrélation de l'expression du lumicanne en fonction de l'âge confirme une inhibition de la synthèse du lumicanne.

Si on compare l'expression de la synthèse de lumicanne en fonction de l'expression de la décorine (figure 18 A et B), on obtient bien une baisse de ce rapport qui est significative à $p < 0,01$ entre les sujets jeunes et adultes et à $p < 0,001$ entre les sujets jeunes et âgés.

Coloration BET



Coloration BET

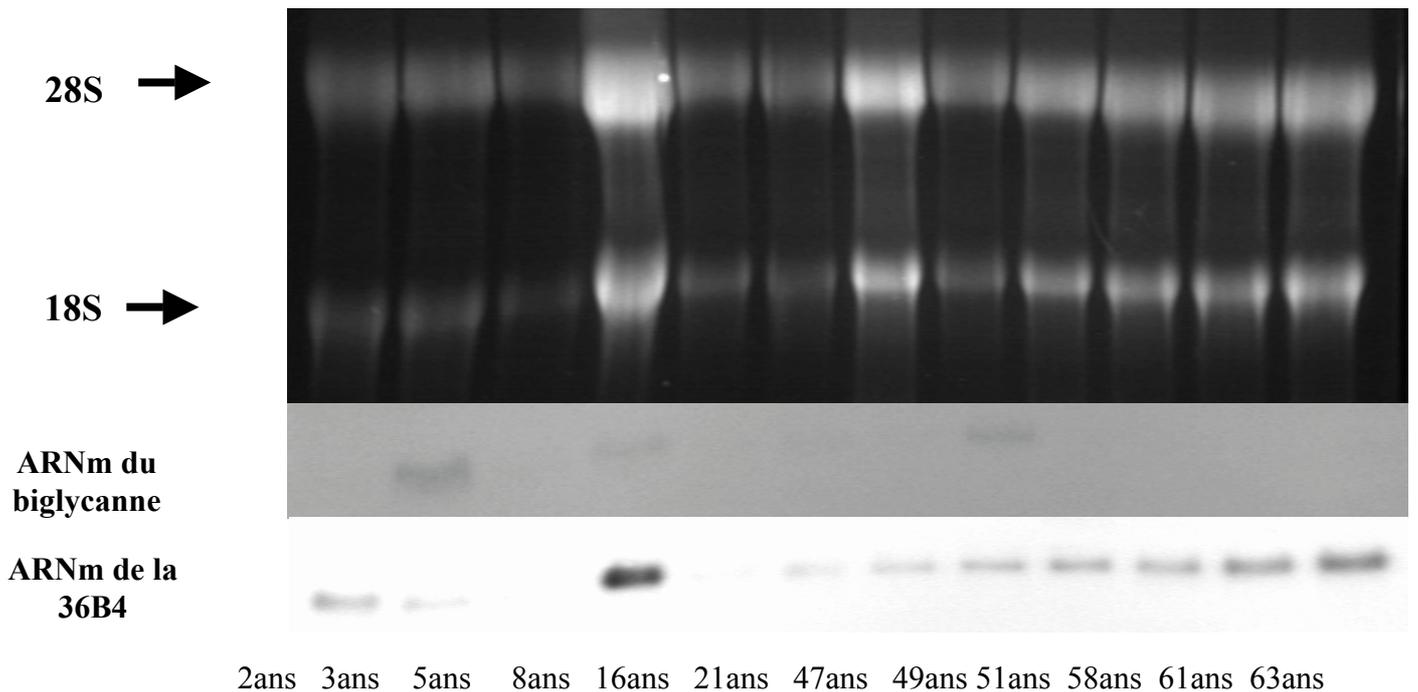


Figure 14 : Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm du biglycane et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.

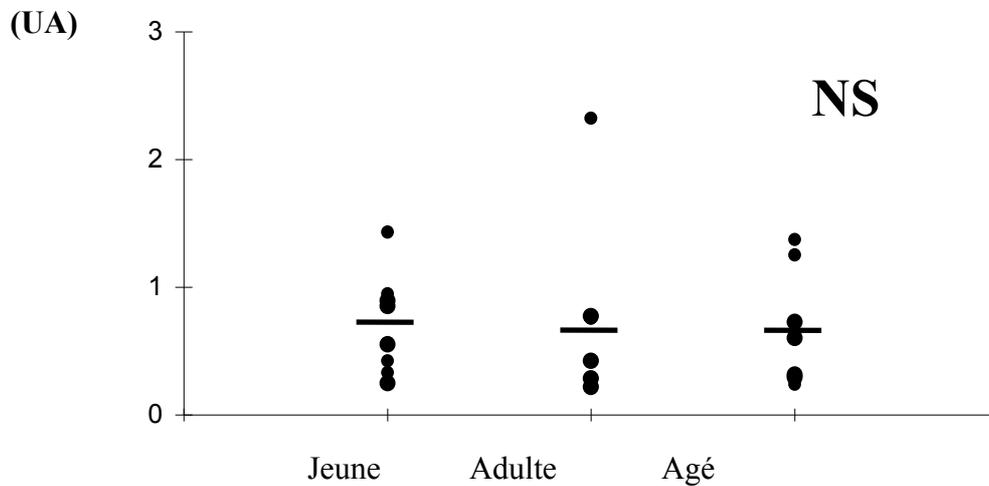
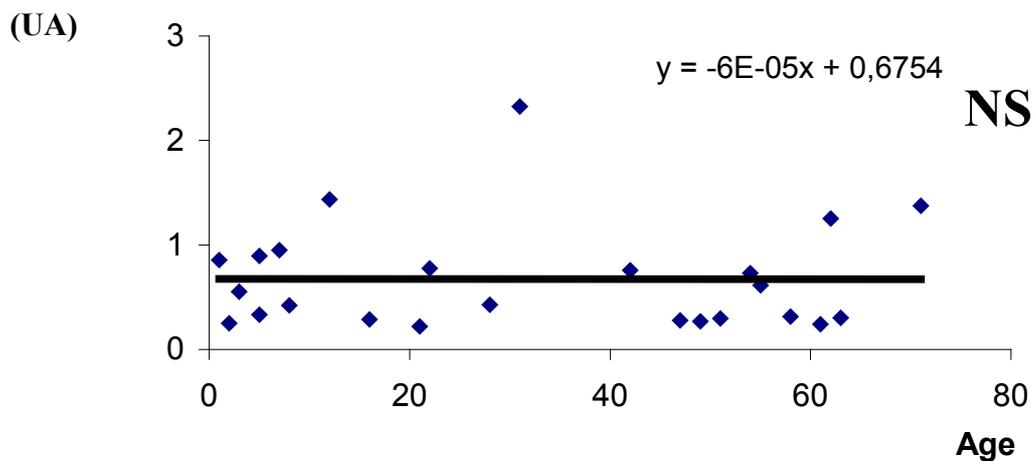
A**Rapport du taux d'ARNm de biglycane/ taux d'ARN ribosomal 18S****B**

Figure 15: Comparaison du taux d'ARNm du biglycane par rapport au taux d'ARN ribosomal 18S mesuré par Northern-blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés. Le graphique A montre la différence d'expression du biglycane entre les trois classes d'âge et le graphique B montre la courbe de corrélation de l'expression du rapport biglycane sur ribosomal 18S en fonction de l'âge.

NS : non significatif

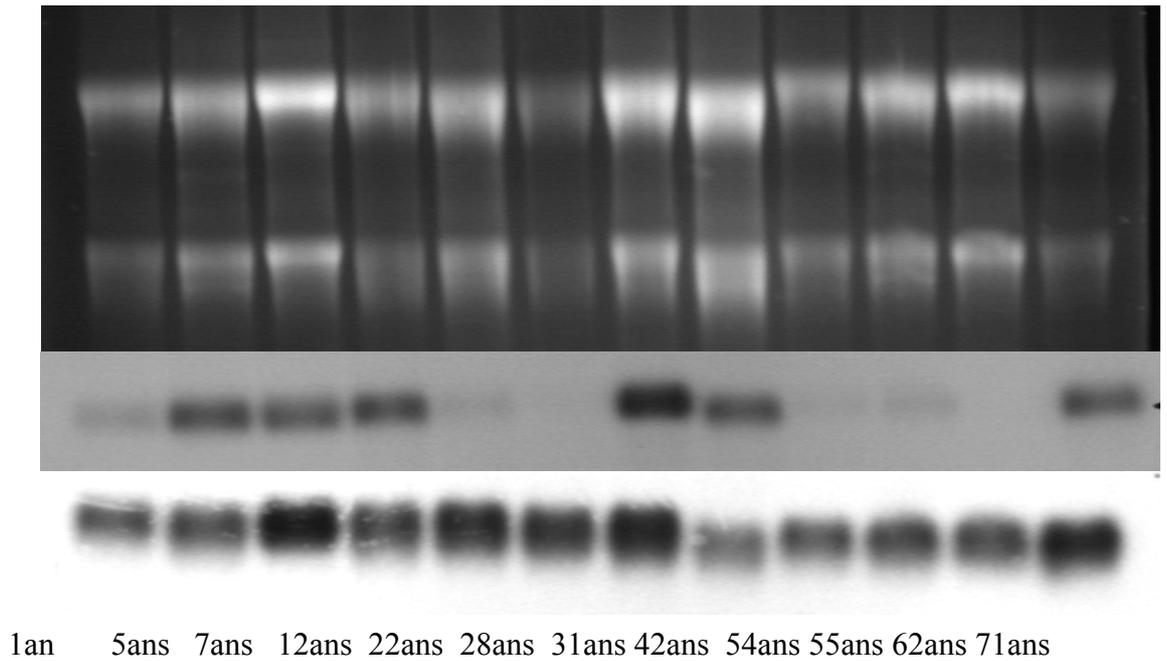
Coloration BET

28S →

18S →

ARNm du
lumicanne

ARNm de
la 36B4



Coloration BET

28S →

18S →

ARNm du
lumicanne

ARNm de la
36B4

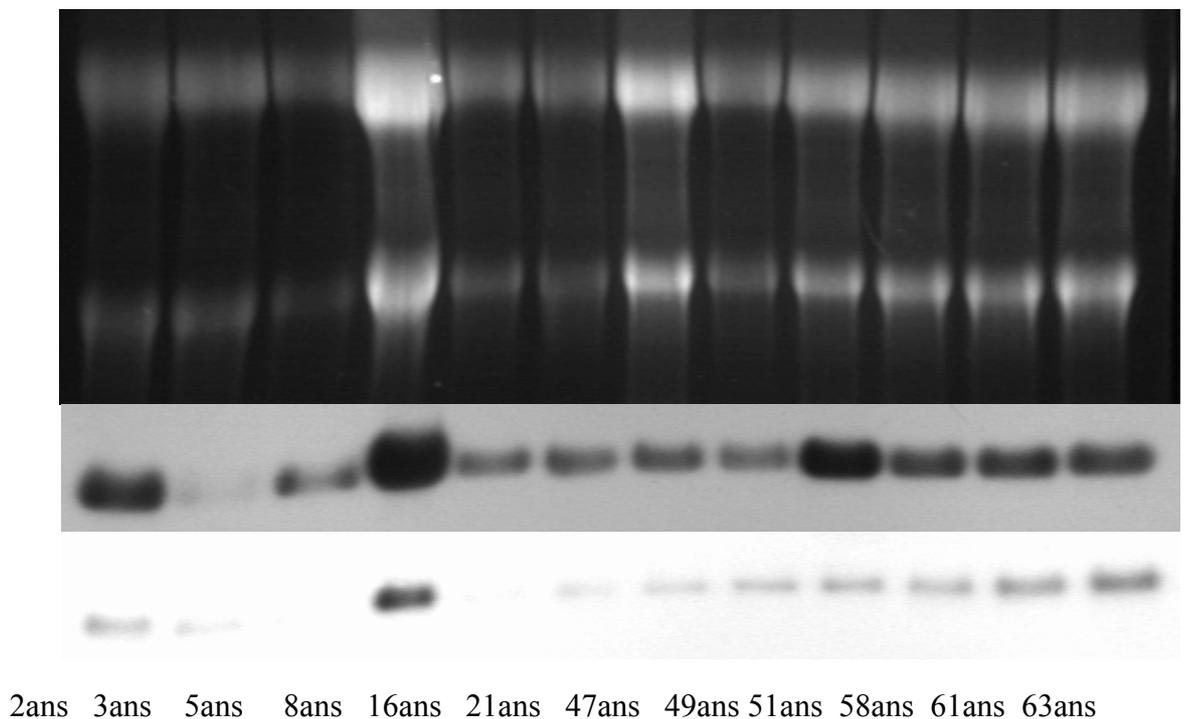


Figure 16 : Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm du lumicanne et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.

Coloration BET

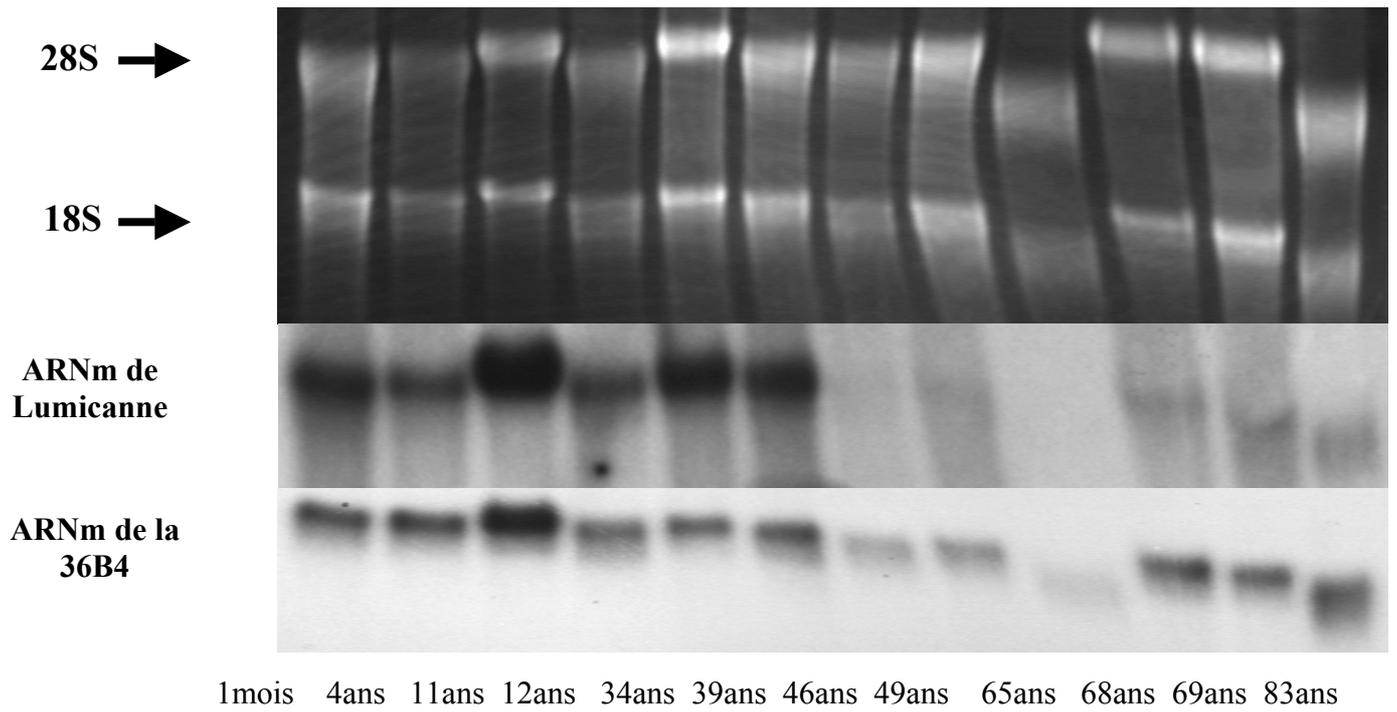
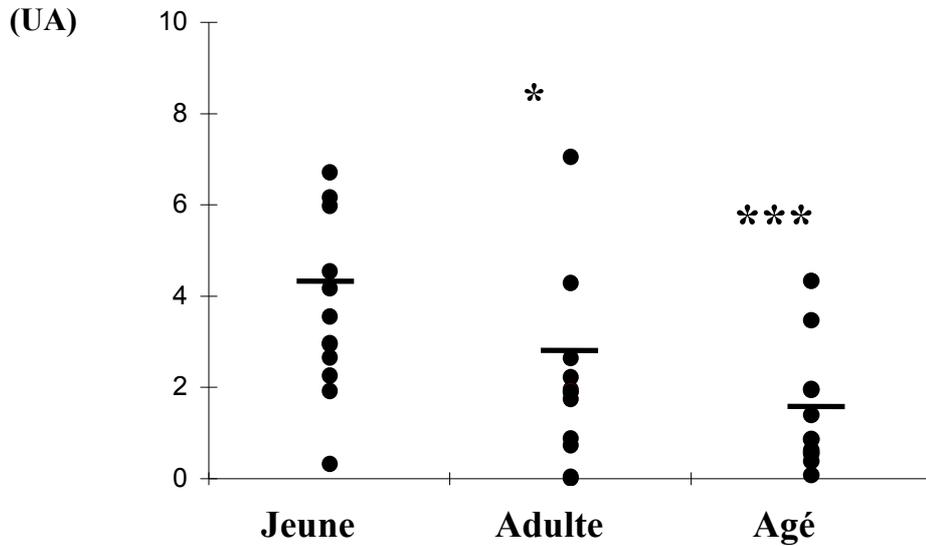


Figure 16 (suite): Mesure par Northern-blot de l'expression de l'ARNm du lumicanne et 36B4 dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents.

Rapport du taux d'ARNm de lumicanne/ taux d'ARN ribosomal 18S

A



B

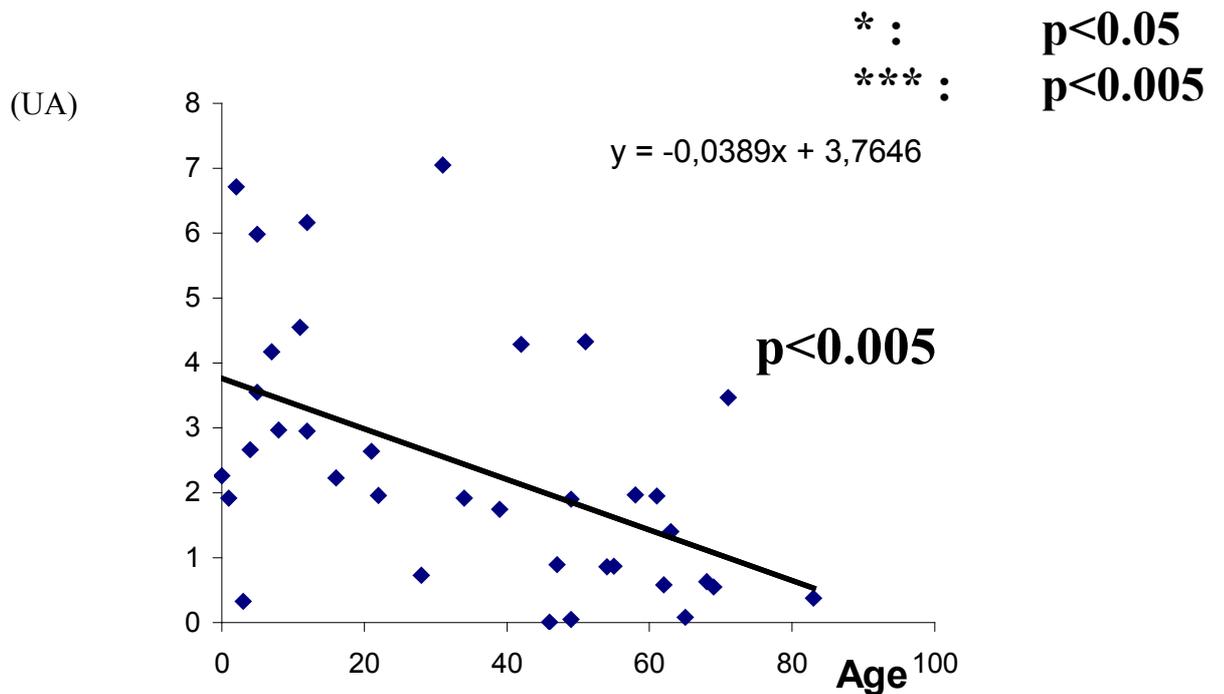


Figure 17 : Comparaison du taux d'ARNm du lumicanne par rapport au taux d'ARN ribosomal 18S mesuré par Northern-Blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés. Le graphique A montre la différence d'expression du lumicanne entre les trois classes d'âge et le graphique B montre la courbe de corrélation de l'expression du rapport lumicanne sur l'ARN ribosomal 18S en fonction de l'âge.

NS : non significatif

Rapport du taux de lumicanne/ taux de décorine

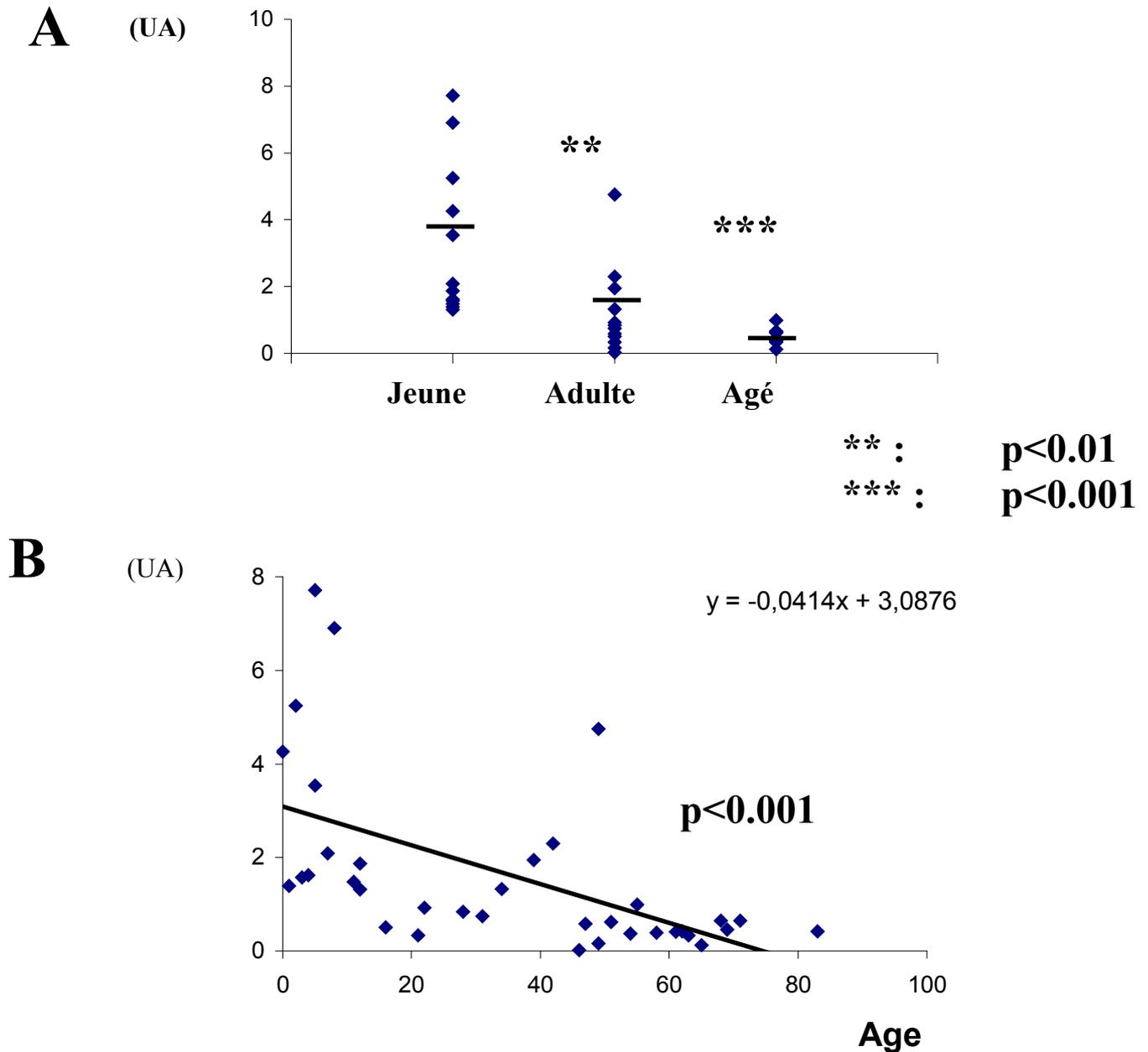


Figure 18 : Rapport des moyennes des taux d'ARNm de lumicanne par rapport au taux d'ARNm de décorine, mesurés par Northern-Blot dans les cultures de fibroblastes de sujets jeunes, adultes ou âgés. Le graphique A montre la différence d'expression du taux de lumicanne sur le taux de décorine entre les trois classes d'âge et le graphique B montre la courbe de corrélation de l'expression du taux de lumicanne sur le taux de décorine en fonction de l'âge.

3) Effet des rayonnements UVA

Une étude préliminaire, nous a permis de déterminer un effet maximal et non léthal de l'irradiation par des UVA sur des fibroblastes dermique à 7,5 Joules par cm^2 . Nous avons donc cultivé des cellules fibroblastiques des trois classes d'âge en plaques 6 puits, où à confluence, les cellules sont irradiées et après 24 heures de culture, les milieux et les ARN sont extraits.

3.1) Effet des UVA sur l'expression du taux d'ARNm de lumicanne

L'hybridation des ARN extraits des cellules fibroblastiques, traités ou non avec des UVA, avec une sonde d'ADNc du lumicanne, permet de voir un transcrite de 1,9 kb (figure 19 A). Le résultat de ce Northern-blot est représenté sur la figure 19 B, et exprime le taux d'ARNm du lumicanne sur le taux d'ARNm de la 36B4 en fonction du traitement ou non par des UVA. La diminution de l'expression du lumicanne dans les cellules fibroblastiques exposées aux UVA est retrouvée dans les cellules des trois classes d'âge (de 15 à 60%) et dans les cellules MRC5.

3.2) Effet des UVA sur l'expression de la protéine cœur du lumicanne

Après avoir étudié l'expression des ARNm de lumicanne, nous avons procédé à l'analyse, par la technique de Western-blot, des milieux des cellules MRC5 traitées ou non avec des UVA, afin de déterminer la synthèse protéique du lumicanne. Ainsi la figure 20 permet de voir une diminution de la synthèse protéique du lumicanne après un traitement par des UVA.

4) Régulation du lumicanne par différents effecteurs

Peu de choses sont connues sur la régulation du gène du lumicanne par des cytokines. Nous avons donc procédé à l'analyse de différents effecteurs comme le b-FGF, l'IGF-1 et le TNF- α sur l'expression du lumicanne. Nous avons incubé pendant 24 heures des cellules MRC5 à confluence dans un milieu à 0,5% de SVF, en présence de b-FGF à 5 et 25 ng/ml, d'IGF-1 à 12,5 et 50 ng/ml et enfin du TNF- α à 5, 25 et 100 ng/ml. Lors de cette étude, le 100% d'expression du lumicanne, correspond à l'incubation des cellules MRC5 avec 0,5% de SVF. Comme contrôle positif, nous avons cultivé les cellules MRC5 en présence de 10 ou 20 % de SVF. Après l'extraction des ARN, on a analysé l'expression du lumicanne par la technique de Northern-blot. Les résultats présentés sur la figure 21 B montre le rapport d'expression de l'ARNm de lumicanne sur celle de la 36B4.

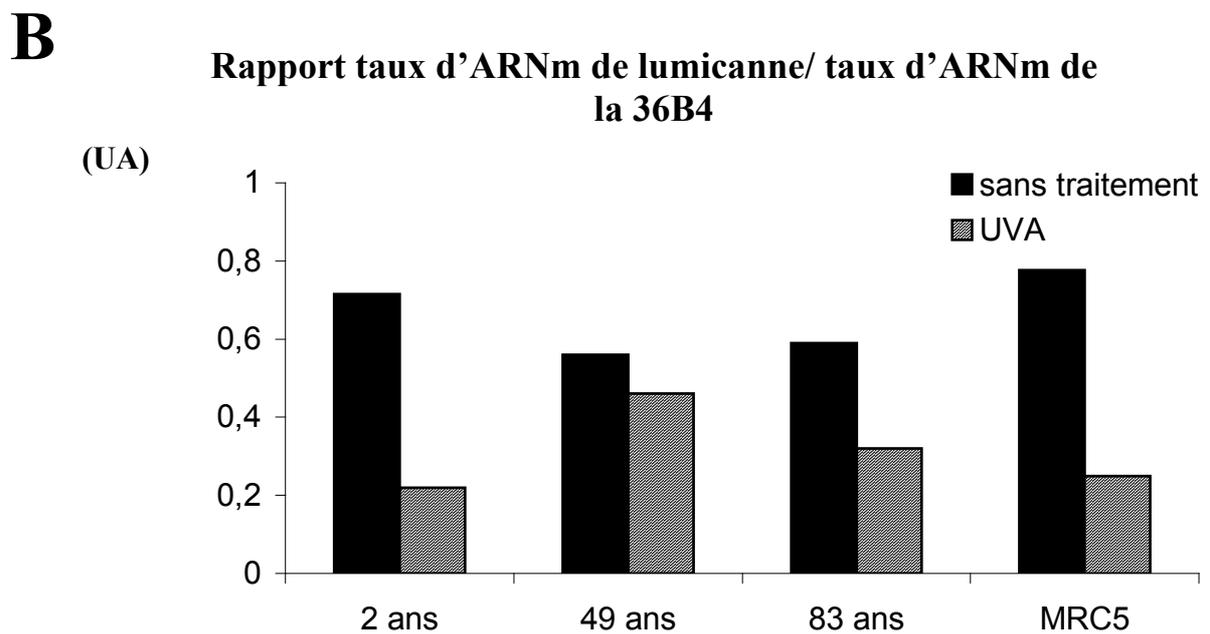
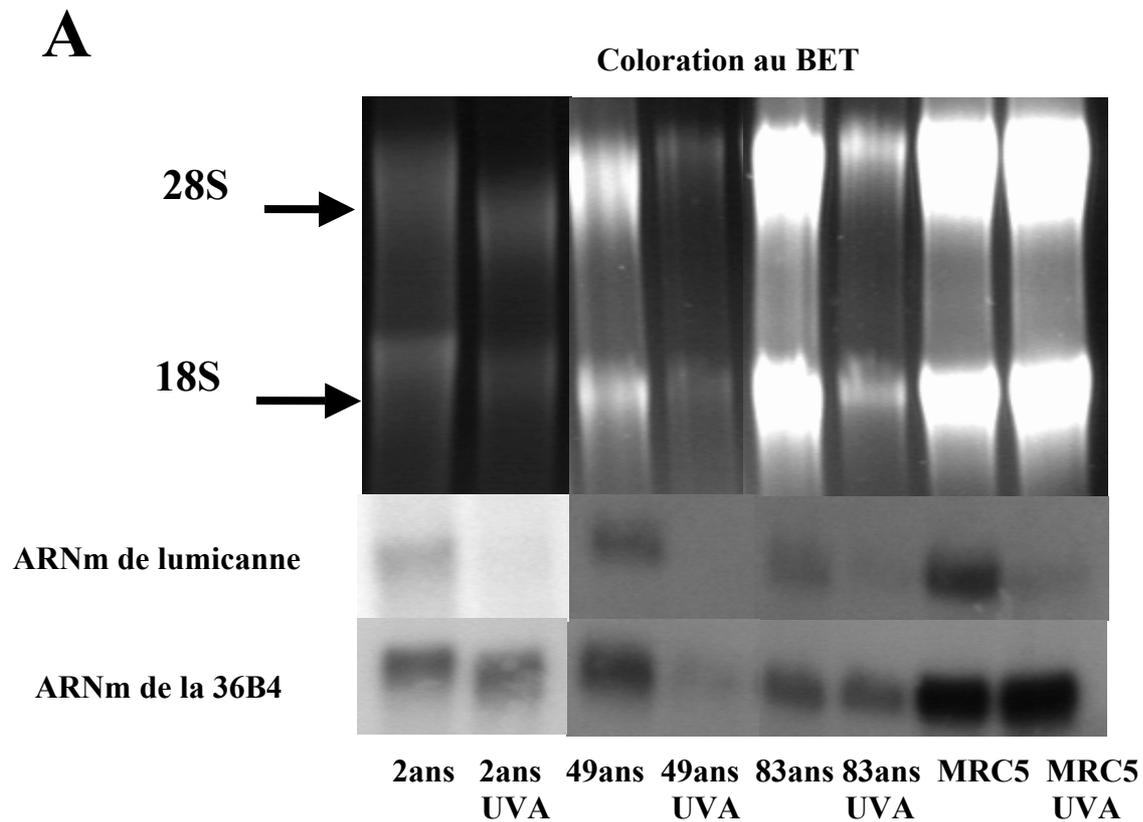


Figure 19 : Analyse par Northern-blot (A) et quantification de l'expression de l'ARNm (B) du lumicanne dans des fibroblastes de donneurs d'âges différents traités ou non avec des UVA à 7,5 J/cm².

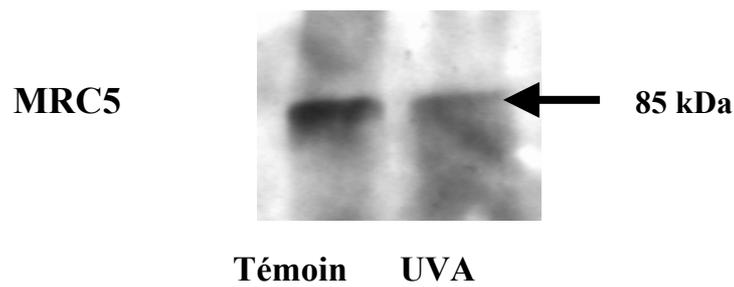
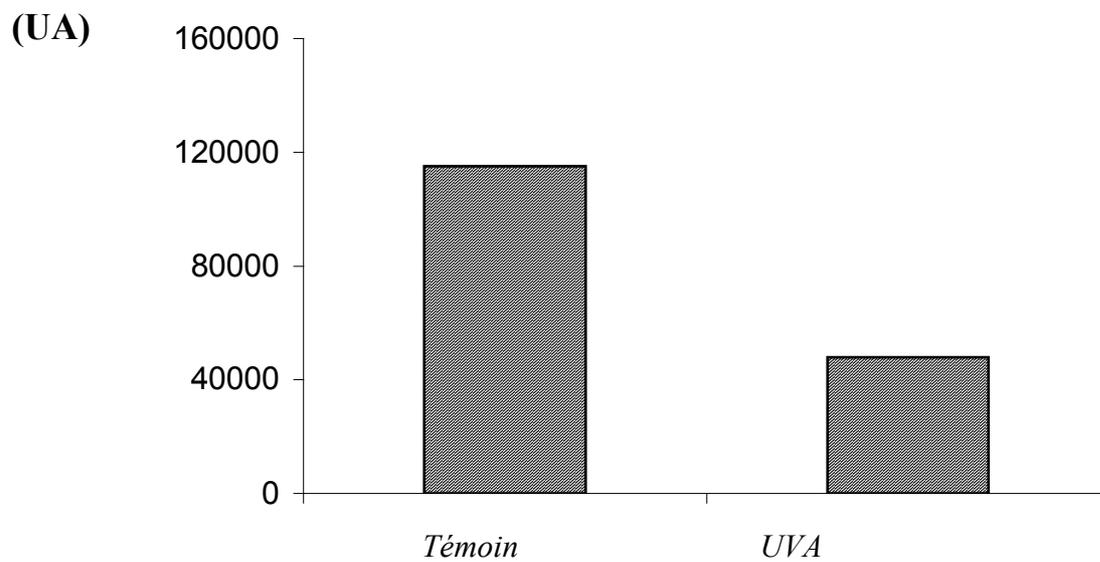
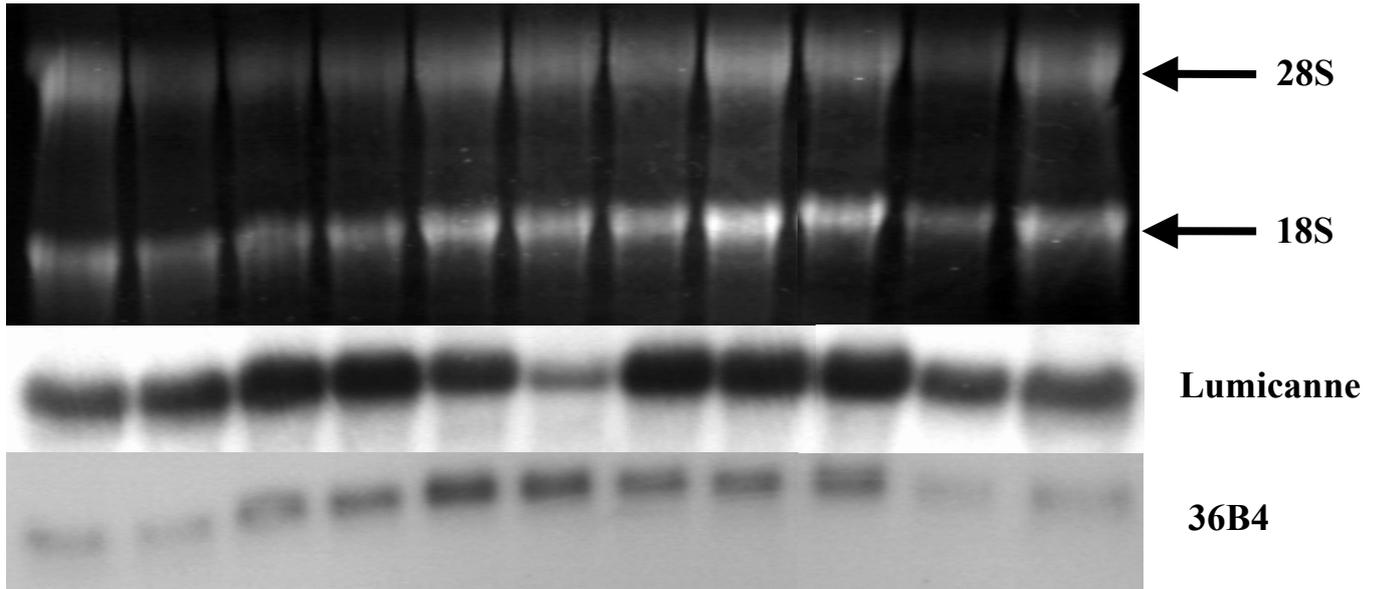
A**B**

Figure 20 : Analyse par Western-blot (A) de la synthèse du lumicanne par les cellules MRC5 après un traitement par les UVA à $7,5 \text{ J/cm}^2$. On peut voir après une quantification du Western-blot (B), que l'expression du lumicanne sous sa forme glycoprotéique est fortement inhibée (le dépôt de protéine est identique dans les deux pistes).

A**Coloration au BET**

0.5% 0.5% 10% 20% b-FGF b-FGF IGF1 IGF1 TNF α TNF α TNF α
SVF SVF SVF SVF (5ng) (25ng) (12.5ng)(50ng) (5ng) (25ng) (100ng)

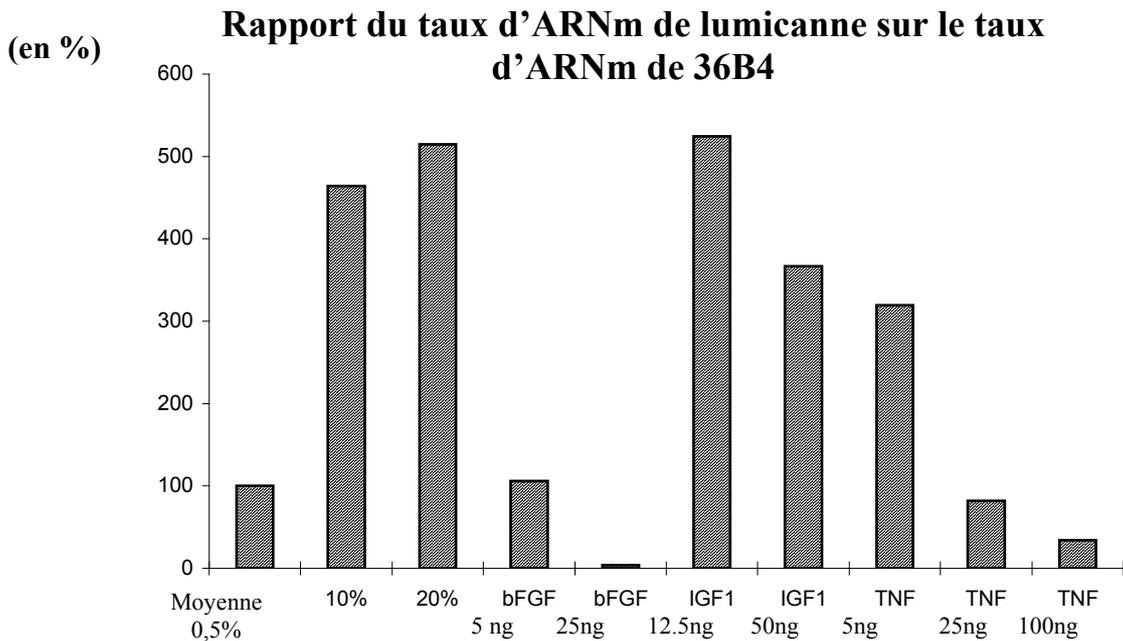
B

Figure 21 : Etude de la régulation de l'expression du taux de lumicanne par différentes cytokines sur des cellules MRC5. Northern blot (A) et analyse du taux d'ARNm du lumicanne (B), où le taux basal d'expression du lumicanne (100%) est représenté par un traitement des cellules MRC5 avec 0,5% de SVF (moyenne des deux premières pistes), le contrôle positif est constitué par un traitement avec 20% SVF.

La première colonne représente le 100% d'expression du lumicanne, elle est en fait la moyenne des deux pistes (traitement à 0,5% de SVF) que l'on peut observer sur la figure 21 A. Le taux d'expression du lumicanne est augmenté de 5 fois après un traitement de ces cellules avec 20% de SVF, de 5 fois après un traitement avec 12,5 ng/ml d'IGF-1, et de 4 fois avec du TNF- α , mais cet effet tend à disparaître avec de plus grandes concentrations (25 ng/ml) et enfin inhibe cette expression du lumicanne à une concentration de 200 ng/ml. Le b-FGF à une concentration de 10 ng/ml ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de cette protéine, mais toutefois on peut observer un effet inhibiteur pour une concentration de 50 ng/ml.

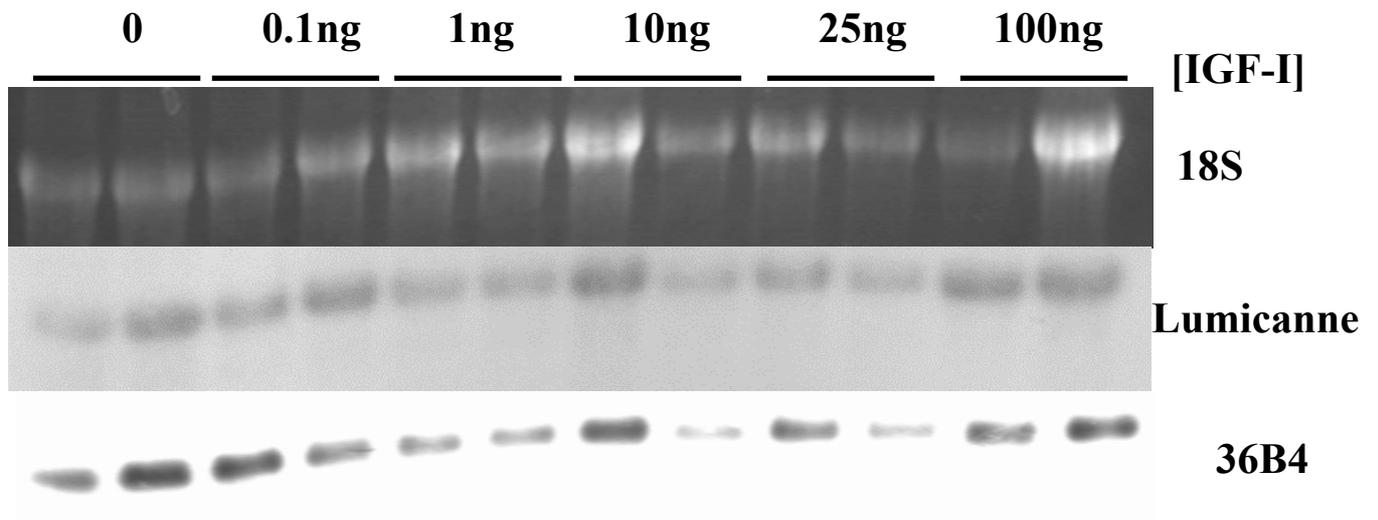
5) Effet de l'IGF-I

5.1) Effet dose de l'IGF-I sur l'expression du taux d'ARNm de lumicanne

L'effet stimulateur de l'IGF-1 a été confirmé par une nouvelle série d'expériences. Ainsi, l'analyse par Northern-blot des ARN totaux de cellules MRC5 traitées avec de l'IGF-1 en dose croissante (de 0 à 100 ng/ml), montre une augmentation de la synthèse des ARNm de lumicanne pour des doses de 0,1 à 10 ng/ml (figure 22). Cette augmentation, qui atteint au maximum 4 fois le taux basal, est dose-dépendante. Pour des doses supérieures à 10 ng/ml, c'est à dire 25 et 100 ng/ml, on observe une perte de l'effet stimulateur de l'IGF-1. A 100 ng/ml, on obtient à un effet inhibiteur sur l'expression du taux d'ARNm de lumicanne par rapport au témoin.

5.2) Effet dose de l'IGF-I sur l'expression protéique du lumicanne

L'effet stimulateur de l'IGF-1 a été confirmé par l'analyse de la technique de Western-blot des protéines présentes dans le milieu de culture, de cellules MRC5 traitées avec de l'IGF-1 en dose croissante (de 0 à 100 ng/ml). Ce Western-blot montre une augmentation de la synthèse du lumicanne sous une forme glycoprotéique, de manière dose dépendante de 0 à 100 ng/ml (figure 23). Cette augmentation atteint au maximum 3 fois le taux basal pour un traitement des cellules MRC5 avec de l'IGF-1 à 100 ng/ml. La différence observée pour la dose de 100 ng/ml d'IGF-1 entre le Northern-blot et le Western-blot peut s'expliquer par une accumulation de la protéine.



Rapport du taux d'ARNm de lumicanne/ taux d'ARNm de 36B4

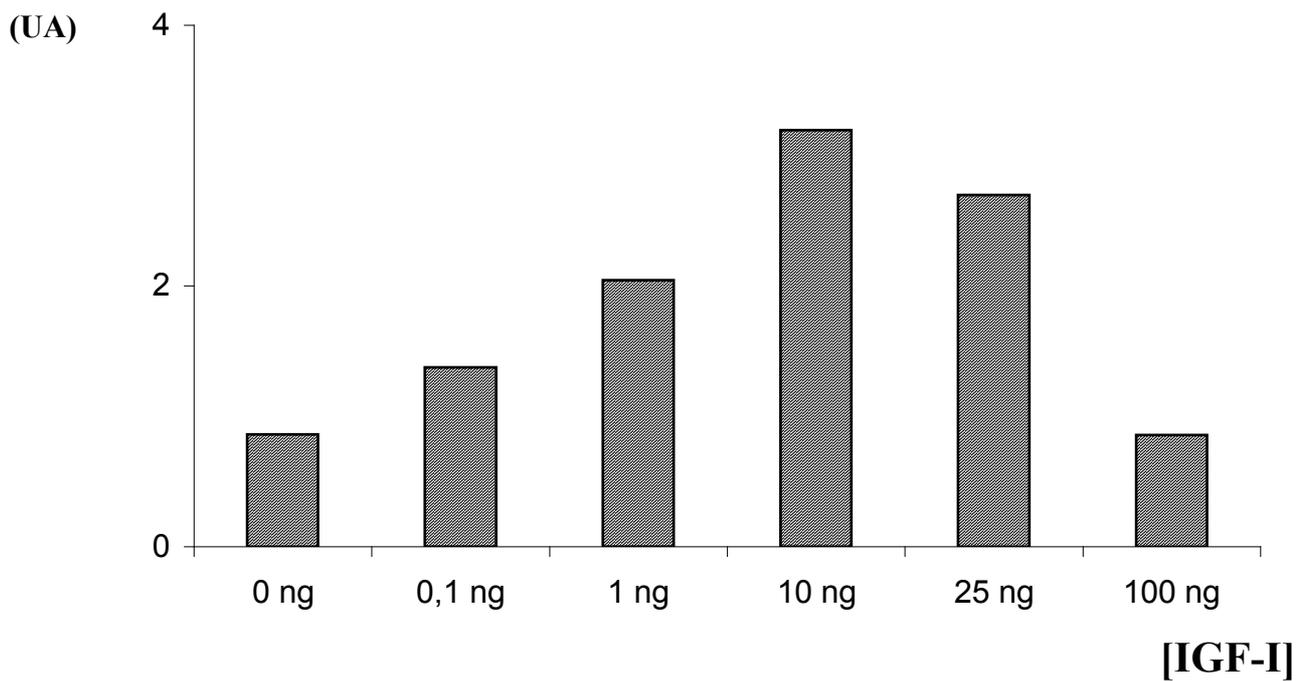


Figure 22 : Etude par la technique du Northern-blot de l'effet dose de l'IGF-I (de 0 à 100 ng/ml) sur l'expression du taux d'ARNm du lumicanne de cellules MRC5.

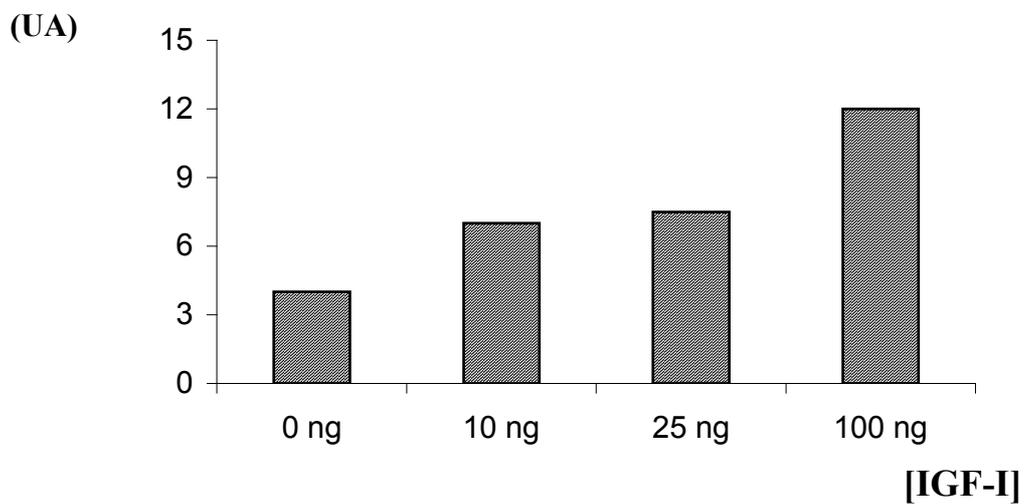
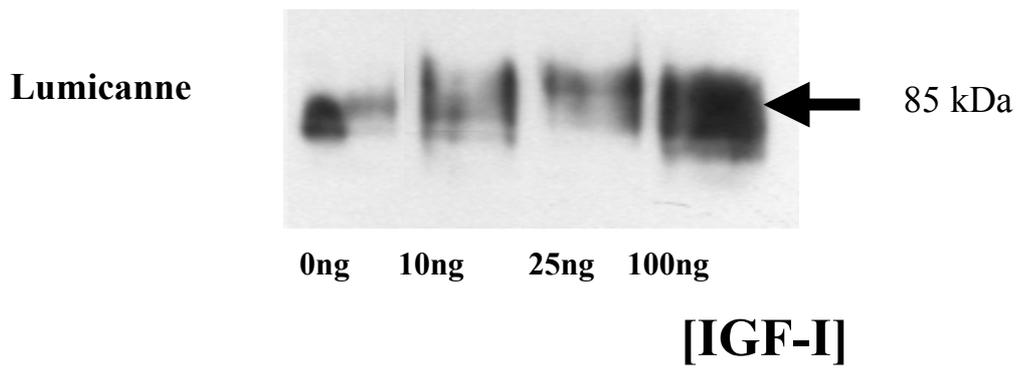


Figure 23 : Etude par la technique de Western-blot de l'effet dose de l'IGF-I (de 0 à 100 ng/ml) sur la synthèse du lumicanne présent dans les milieux de culture de cellules MRC5.

II Lumicanne et mélanome

1) Etude de l'expression du taux d'ARNm du lumicanne au sein des lignées cancéreuses et non cancéreuses.

Le Northern-blot, présenté sur la figure 24, montre l'expression ou non de l'ARNm de lumicanne dans différentes lignées cellulaires, après hybridation de ces ARN avec une sonde spécifique. La souche de cellules MRC5 (fibroblastes pulmonaires embryonnaires) est utilisée comme témoin positif. On peut voir ainsi que des cellules CHO, Mv1Lu, 3T3-swiss, HT1080, B16F10, Hecat et B16F1 cultivées en présence de 10% de SVF, n'expriment pas de lumicanne. En revanche, les cellules MG63 et HT144, qui sont respectivement des cellules d'ostéosarcome et de mélanome humain, expriment du lumicanne. Les cellules HepG2 et M3Da expriment du lumicanne en faible quantité.

2) Transfection de l'ADNc du lumicanne dans des cellules B16F1

Les cellules de mélanome de souris B16F1 ont été utilisées comme modèle d'étude d'invasion et de métastase du mélanome. Ces cellules n'expriment pas de lumicanne, cela a été montré par Northern-blot (Figure 24) et par Dot blot (Figure 25).

Pour étudier l'effet du lumicanne sur les cellules de mélanome, on a procédé à une transfection stable des cellules de mélanome de souris B16F1 avec un plasmide pcDNA3 contenant l'ADNc entier du lumicanne humain (les clones sont notés B16F1-HLum), avec un vecteur pcDNA3 vide, (les clones sont notés ici B16F1-pcDNA3 et nous serviront de contrôle négatif) et La transfection des cellules a été réalisée grâce à un kit de transfection (lipofectamine 2000) et après deux jours de culture, nous avons procédé à la sélection des clones par l'ajout de généticine (G418) à 400 µg/ml. Après 15 jours de sélection, une quarantaine de clones ont été sélectionnés et caractérisés.

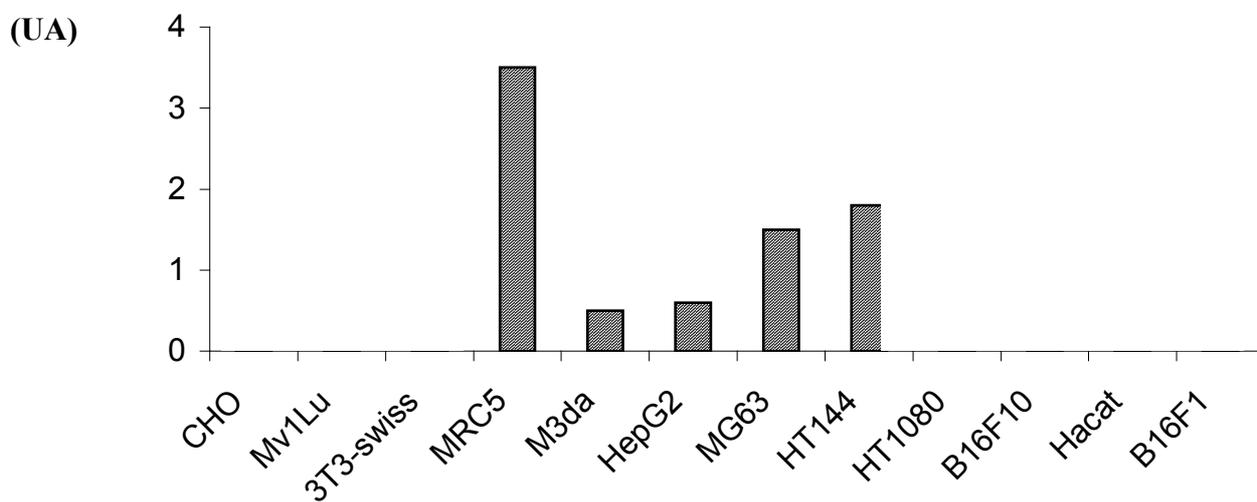
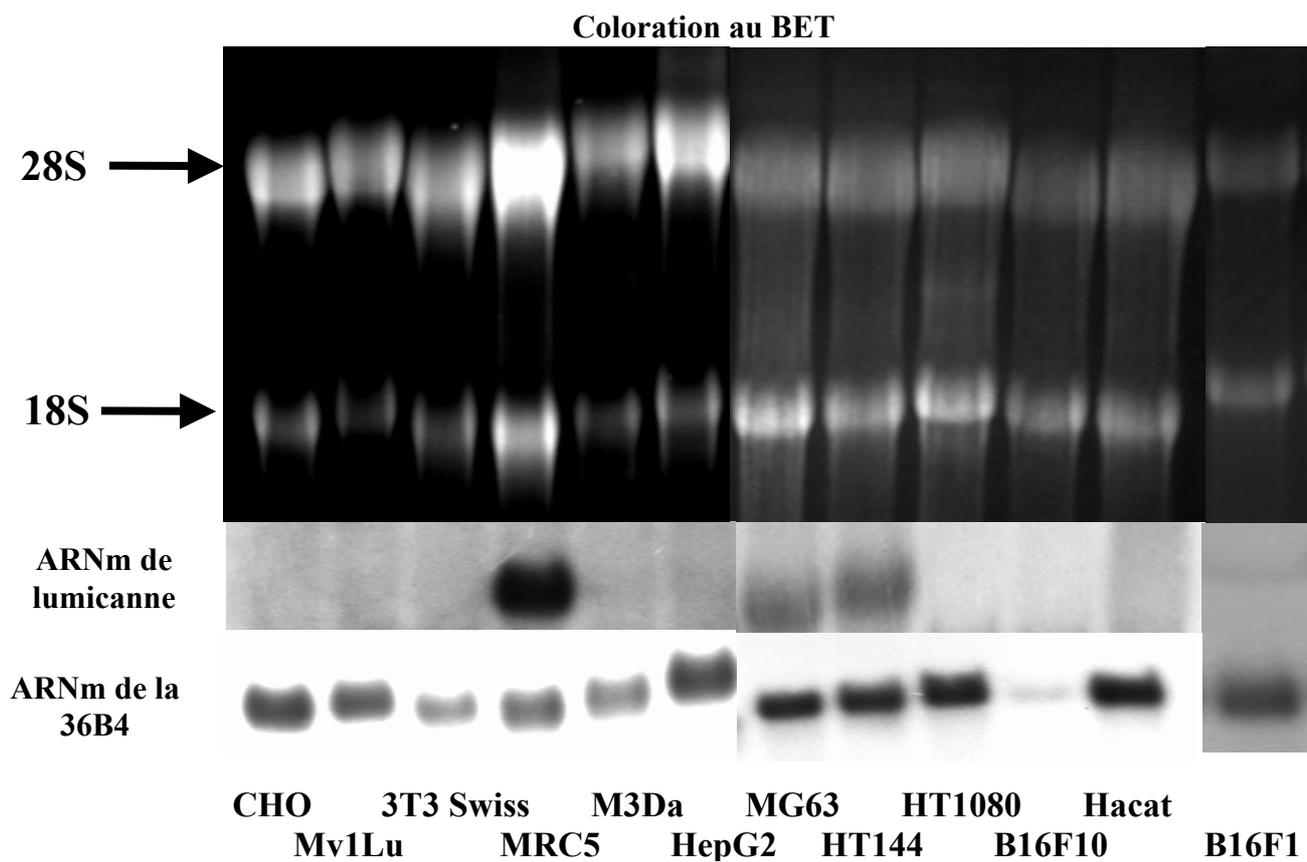
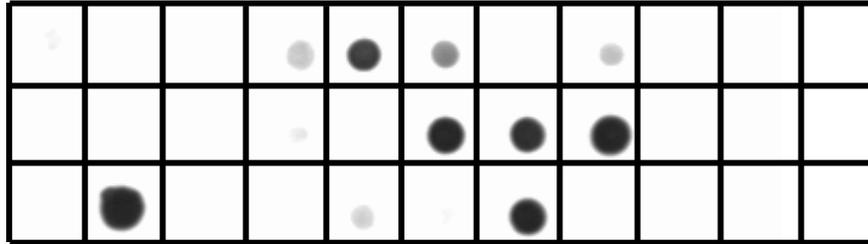


Figure 24 : Etude de l'expression du taux d'ARNm de lumicanne dans différentes lignées cellulaires. On utilise la lignée de cellules fibroblastiques MRC5 comme témoin positif.

A**B**

CHO		1	3	7	18	13	21	14	20	24
B16F1		2	5	9	8	19	36	15	22	25
B16F1-pcDNA3	MRC5	11	6	10	12	4	17	16	23	26

Figure 25: Détermination par la technique de Dot-blot (A) des clones positifs de cellules B16F1 transfectées de façon stable avec le plasmide pcDNA3 contenant l'ADNc du lumicanne humain. Le tableau (B) représente l'ensemble des échantillons qui ont été déposés sur le Dot Blot. Les milieux de cellules CHO, B16F1 sauvages et B16F1 transfectées par un plasmide pcDNA3 vide servent de contrôle négatif et les milieux de cellules MRC5 de contrôle positif. Les chiffres correspondent au numéro attribué à chaque clones transfectées par le plasmide pcDNA3-HLum. Les clones présentant une expression de lumicanne sont indiqué en jaune.

2.1) Sélection des clones transfectés par le lumicanne

2.1.a) Analyse par Dot Blot des clones transfectés

Afin de sélectionner rapidement les clones exprimant du lumicanne, nous avons cultivé l'ensemble des clones transfectés avec le plasmide pcDNA3-HLum en plaques 24 puits. A confluence cellulaire, les milieux de culture sans SVF ont été analysés par la technique de Dot blot. La membrane ainsi obtenue a été incubée avec un anticorps anti-lumicanne, une nuit à 4°C puis révélée par chimioluminescence.

Les résultats visibles sur la figure 25 nous permet de voir que 5 clones expriment fortement le lumicanne ; il s'agit des clones 4, 7, 8, 19 et 36. Les clones 3, 10, 18 et 21 expriment aussi du lumicanne, mais en plus faible quantité. Les autres clones ne présentant aucune expression du lumicanne ont été abandonnés.

2.1.b) Analyse par Northern-blot des clones transfectés

Pour vérifier si les cellules, détectées précédemment en Dot blot, expriment bien le lumicanne, nous avons procédé à l'analyse des ARNm du lumicanne sur les ARN totaux des clones positifs par la technique de Northern-blot. Ainsi, on peut observer sur la figure 26, après une hybridation des ARN des différents clones transfectés avec le plasmide pcDNA3-Hlum avec une sonde spécifique du lumicanne, un marquage positif pour l'ensemble de ces clones (clone 4, 7, 8, 19, 21 et 36). Pour cette étude, nous avons utilisé des ARN de cellules MRC5 comme témoin positif et de cellules B16F1 comme témoin négatif.

2.1.c) Analyse par Western-blot des clones transfectés

Après avoir vérifié l'expression des ARNm de lumicanne dans les clones transfectés avec le plasmide pcDNA3-HLum, nous avons observé par le biais du Western-blot la quantité et la taille du lumicanne sécrété. On peut observer sur la figure 27 une bande à 57 kDa qui confirme la synthèse protéique du lumicanne par les clones 4, 7, 8 et 36 transfectés avec le plasmide pcDNA3-Hlum et l'absence d'expression de cette protéine pour les cellules B16F1 sauvages et transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3). L'analyse des résultats permet de déduire que, pour une même quantité de protéines déposée sur chaque piste, le clone 8 exprime plus de lumicanne que les autres clones. La taille de 57 kDa correspond au lumicanne sous une forme glycoprotéique étant donné que sa forme protéoglycannique fait plus de 85kDa et son corps protéique 37 kDa.

Coloration BET

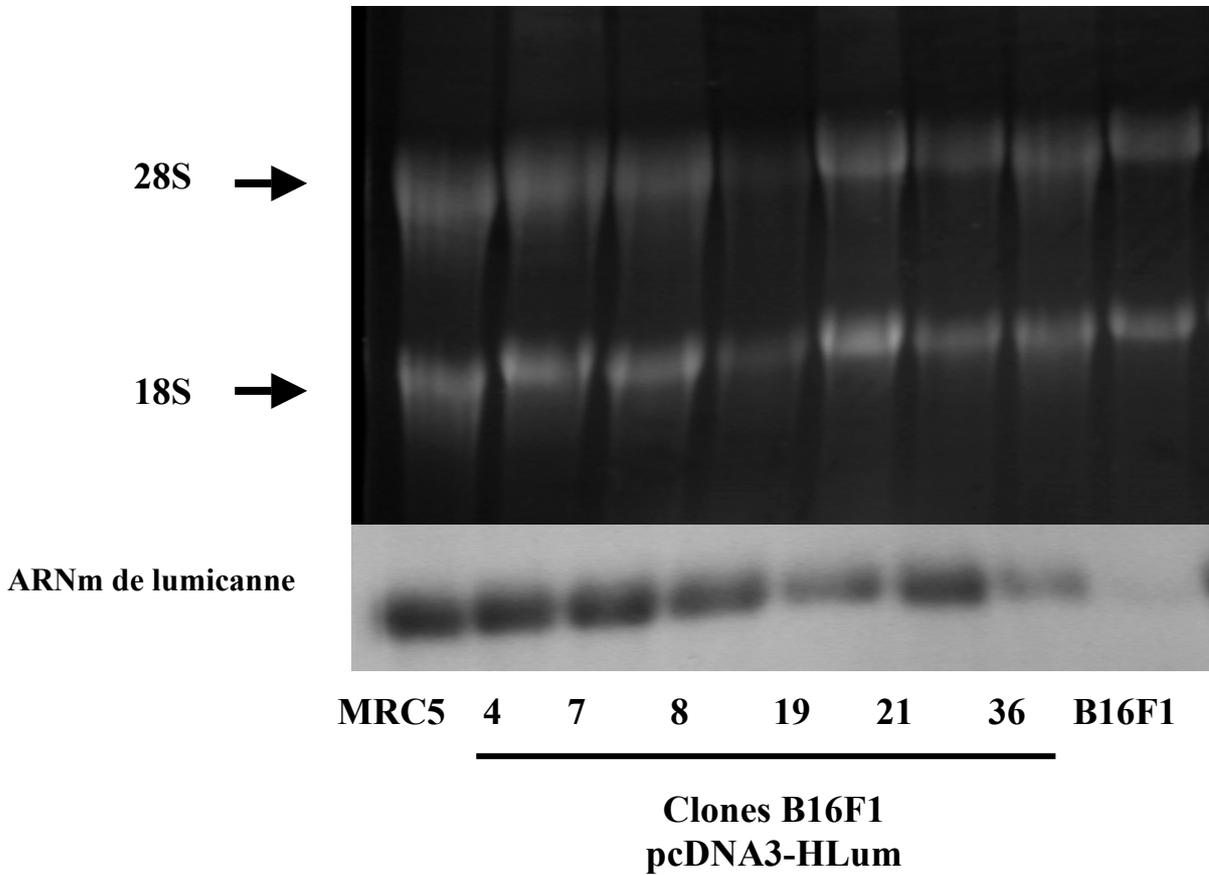


Figure 26 : Vérification de l'expression de l'ARNm de lumicanne par les clones de cellules B16F1 transfectées avec un plasmide contenant l'ADNc du lumicanne humain.

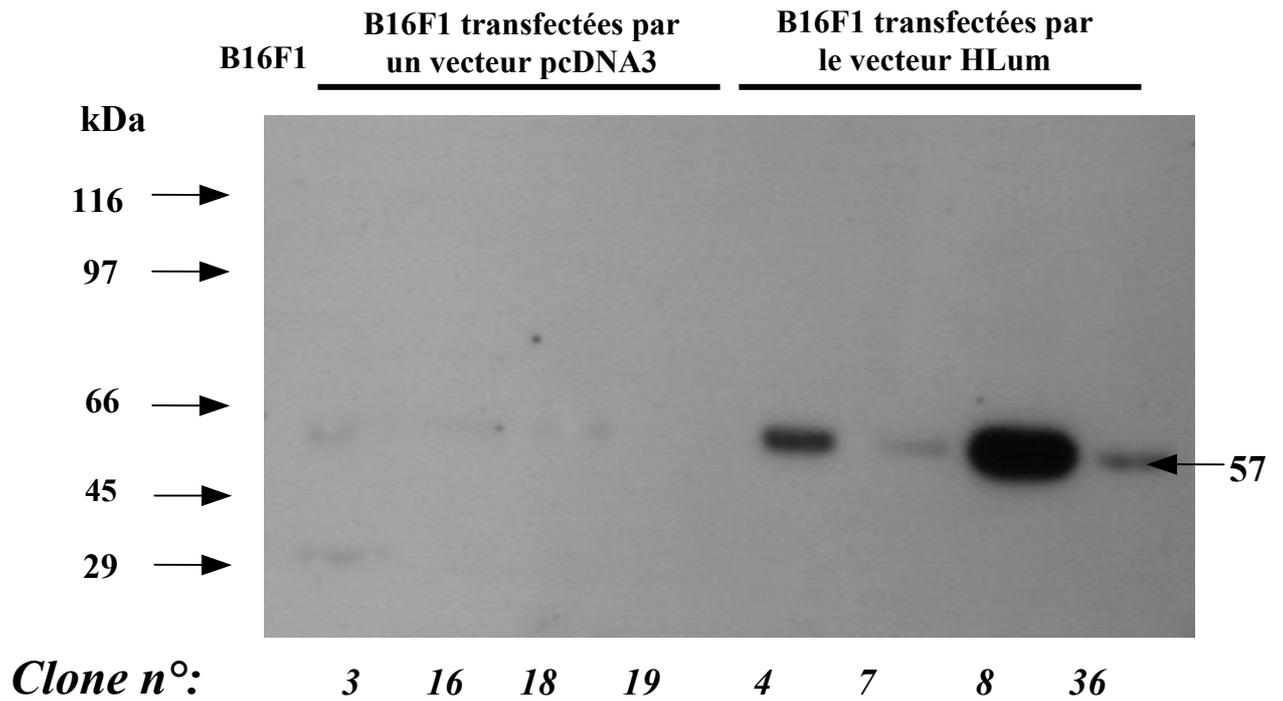


Figure 27 : Synthèse protéique du lumicanne par les clones de cellules B16F1 transfectés avec un plasmide contenant l'ADNc du lumicanne humain. Les cellules B16F1 et 4 clones de cellules B16F1-pcDNA3 servent de contrôle négatif.

2.2.d) Analyse de la synthèse des glycosaminoglycannes par dialyse CPC

Avant de poursuivre l'étude sur ces 4 clones, nous avons voulu caractériser leur synthèse de glycosaminoglycannes afin de voir s'ils n'étaient pas entièrement modifiés. Nous avons réalisé, dans un premier temps, une incorporation de précurseur radioactif comme la glucosamine tritiée et le sulfure (^{35}S). L'incorporation de glucosamine tritiée analysée par la technique de dialyse contre du CPC, met en évidence (figure 28) une synthèse des glycosaminoglycannes radiomarqués non modifiée significativement dans le milieu (A) et la couche cellulaire (B) entre les cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) et transfectées par un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum). La figure 29 montre l'incorporation totale de sulfure (^{35}S) dans les 3 types cellulaires (B16F1 sauvage, pcDNA3, pcDNA3-HLum). On peut voir ainsi qu'il n'y a pas de différence significative dans l'incorporation entre ces trois lignées cellulaires.

2.2.e) Dosage de la mélanine

Pour déterminer si l'expression du lumicanne ne change pas le taux de différenciation des mélanomes, on a mesuré la synthèse de mélanine. On a pu ainsi observer sur la figure 30 qu'il n'y pas de différence significative dans la sécrétion de mélanine entre les cellules B16F1 sauvage, B16F1 pcDNA3 et B16F1 pcDNA3-HLum. Chaque histogramme représente la moyenne de 4 clones (clones pcDNA3 3,16,18 et 19 et clones pcDNA3-HLum 4, 7, 8, 36).

2.1.f) Digestion par la N-glycosidase-F et la kératanase II des clones transfectés (figure 31).

Dans les deux premières pistes, on confirme que les cellules B16F1 n'expriment pas de lumicanne et que seules les cellules transfectées par le plasmide pcDNA3-HLum en expriment. Il a été alors nécessaire de caractériser là ou les chaînes de glycosaminoglycannes qui sont fixées sur le corps protéique de la molécule de lumicanne. On peut remarquer que la masse moléculaire du lumicanne, sécrété par les cellules B16F1 transfectées par le plasmide pcDNA3-HLum, qui est d'environ 57 kDa, n'est pas altérée après un traitement à la kératanase II, comme nous pouvons le voir sur la piste n°4 de la figure 31 en comparaison avec l'échantillon témoin présent sur la piste n°3. Ceci qui permet de conclure que le lumicanne ne présente pas de chaîne de kératane-sulfate, la kératanase II clivant spécifiquement les régions sulfatées des chaînes de kératanes-sulfates.

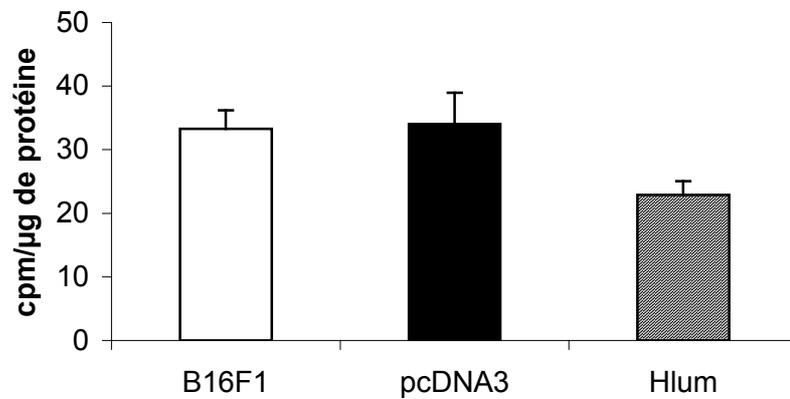
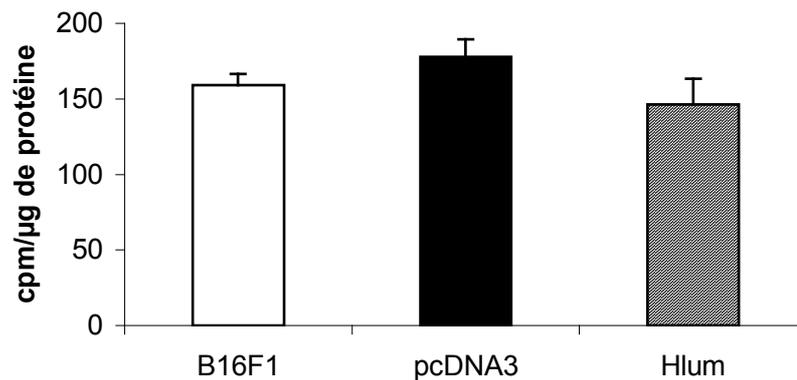
A**B**

Figure 28 : Mesure de la synthèse de glycosaminoglycannes par l'incorporation de glucosamine tritiée par analyse par la technique de dialyse CPC du milieu (A) et de la couche cellulaire (B) de cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par le plasmide pcDNA3 (4 clones) et des cellules B16F1 transfectées par le plasmide pcDNA3 contenant du lumicanne humain (4 clones).

Chaque expérience est réalisée en triplicata.

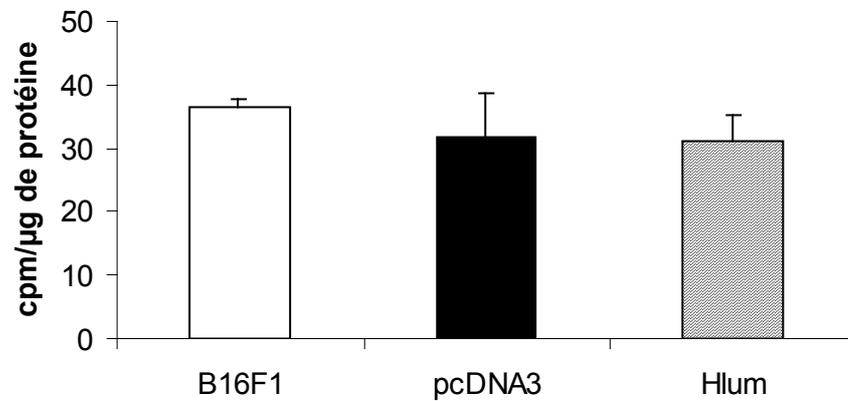
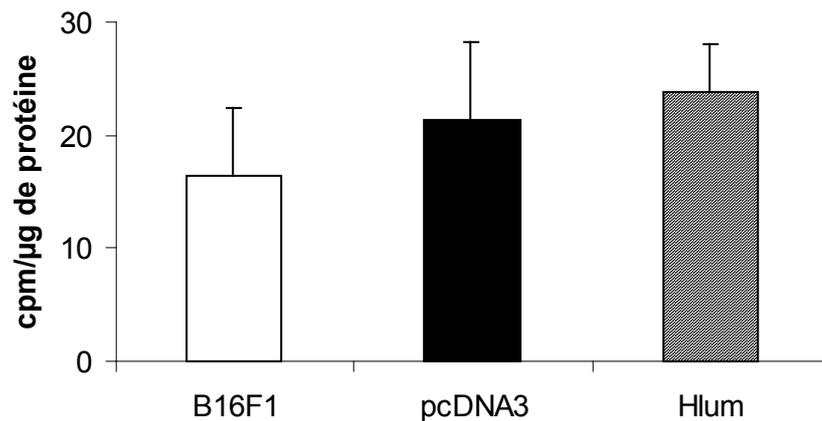
A**B**

Figure 29 : Mesure de la synthèse de glycosaminoglycannes par l'incorporation de sulfure (^{35}S) par analyse par la technique de dialyse CPC du milieu (A) et de la couche cellulaire (B) de cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par le plasmide pcDNA3 (4 clones) et des cellules B16F1 transfectées par le plasmide pcDNA3 contenant du lumicanne humain (4 clones).

Chaque expérience est réalisée en triplicata.

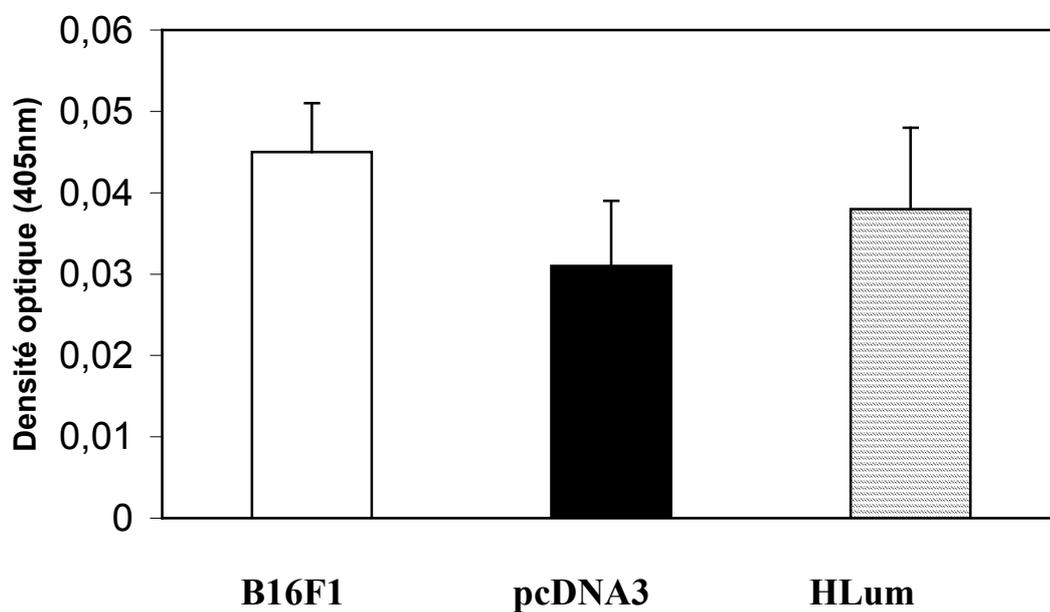


Figure 30 : Mesure de la quantité de mélanine sécrétée par les cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un plasmide pcDNA3 et B16F1 transfectés par un plasmide pcDNA3 contenant l'ADNc de lumicanne humain. Les histogrammes représentent la moyenne de 4 clones de deux manipulations indépendantes réalisées en triplicata.

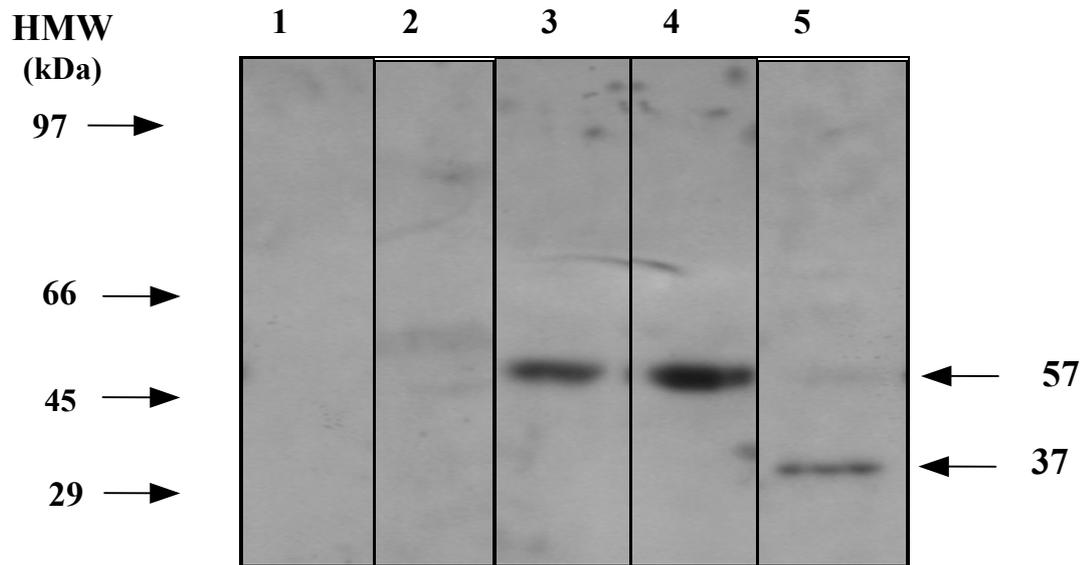


Figure 31 : Détermination par Western blot de la forme glycoprotéique du **lumicanne** présent dans le milieu de cellules B16F1 transfectées ou non avec un plasmide contenant l'ADNc du lumicanne par digestion à la N-glycosidase-F et à la kératanase II. Sur la piste 1, on trouve les protéines du milieu de culture des cellules B16F1, la piste 2 les protéines présentes dans le milieu de cellules B16F1-pcDNA3, pour les piste 3 et 4 : les protéines présentes dans le milieu de cellules B16F1-HLum et les protéines présentes dans le milieu de cellules B16F1-HLum, traitées à la kératanase II respectivement et enfin la piste 5 montre les protéines du milieu de culture des cellules B16F1-HLum, traitées à la N-glycosidase F. (La bande de 57 kDa correspond à la forme glycoprotéique du lumicanne et la bande présente à 37 kDa correspond elle, à la forme protéique de ce SLRP)

Sur la piste n°5, on peut voir une diminution de la masse moléculaire du lumicanne, qui passe ainsi de 57 kDa à 37 kDa après un traitement par la N-glycosidase F. Ce résultat permet de confirmer que la molécule de lumicanne sécrétée par les cellules B16F1 transfectées par le plasmide pcDNA3-Hlum est N-glycosylé.

2.2) Prolifération cellulaire en monocouche des cellules B16F1

L'effet du lumicanne sur la prolifération cellulaire est déterminé, soit par une coloration au cristal violet, soit par comptage manuel (cellules de thoma). Nous avons vérifié que les deux méthodes de mesure de la prolifération donnaient des résultats similaires. La prolifération cellulaire est mesurée après 0, 3 et 5 jours de culture.

Sur la figure 32, on observe les courbes de prolifération des cellules sauvages B16F1, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne (pcDNA3-HLum) après une coloration des cellules au cristal violet. On voit ainsi qu'il n'existe aucune différence significative de prolifération entre ces trois types cellulaires. Chaque type cellulaire représente la moyenne des 4 clones sélectionnés (clones pcDNA3 3,16,18 et 19 et clones pcDNA3-HLum 4, 7, 8, 36).

2.3) Culture en agar mou des cellules B16F1

Au contraire de la culture en monocouche (figure 34 A, B et C) où l'on n'observe aucun effet de l'expression du lumicanne sur la morphologie et la croissance cellulaire, on peut voir que le lumicanne entraîne sur des cellules B16F1 une diminution de la croissance indépendante de l'adhésion. Ainsi le nombre et la taille des colonies formées par les cellules transfectées par un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum) diminuent significativement en comparaison avec les colonies formées par les cellules B16F1 sauvages et les cellules B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) (figure 34 D, E et F). En plus, on peut remarquer que les colonies présentent une structure à la fois irrégulière et beaucoup plus petite que les cellules témoins. La capacité à former des colonies dans de l'agar mou est calculée par le rapport entre le nombre de colonies observées et le nombre de cellulesensemencées. Ce rapport diminue significativement ($p < 0,01$) en passant de $6,7 \pm 1,4$ et $5,4 \pm 1,0$ pour les cellules B16F1 et B16F1-pcDNA3 respectivement à $0,9 \pm 0,3$ pour les cellules exprimant le lumicanne (pcDNA3-HLum).

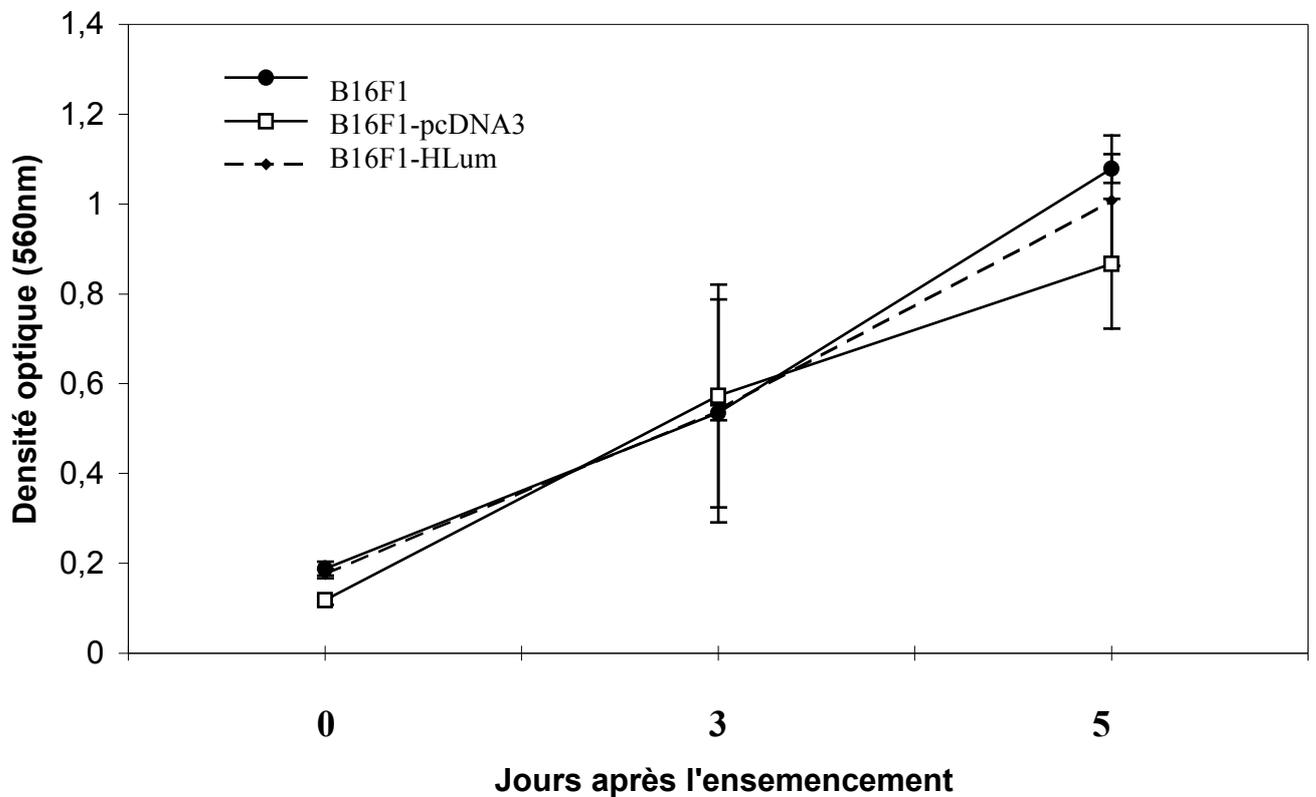


Figure 32 : Détermination de l'activité proliférative en monocouche des cellules de mélanome B16F1. Les cellules B16F1 sauvages, transfectées avec un vecteur vide ou avec un plasmide contenant l'ADNc du lumicanne humain, sont ensemencées en plaques 24 puits. La quantité de cellules est déterminée au premier, troisième et cinquième jour de culture par une coloration au cristal violet (réalisation en triplicata).

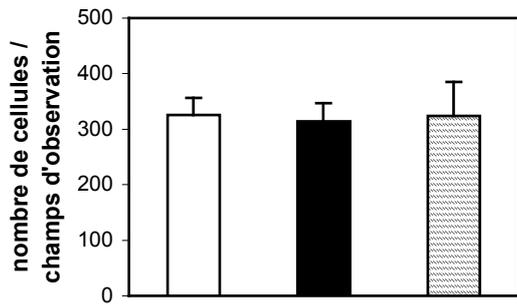
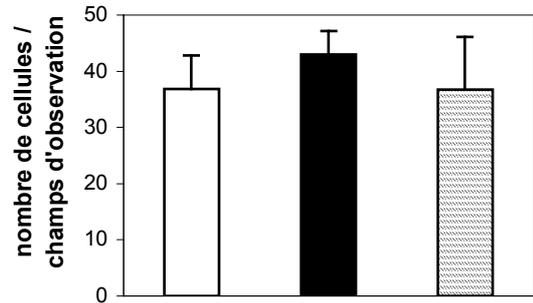
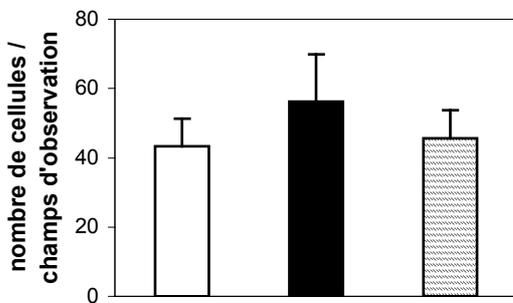
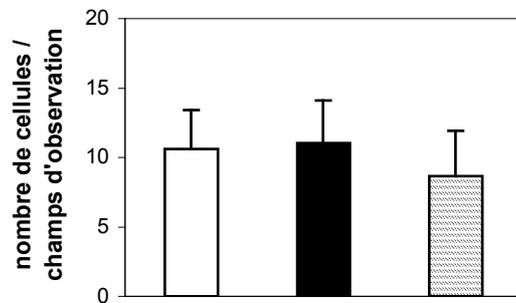
A**B16F1 pcDNA3 HLum****B****B16F1 pcDNA3 HLum****C****B16F1 pcDNA3 HLum****D****B16F1 pcDNA3 HLum**

Figure 33 : Adhésion et étalement des cellules de mélanome de souris B16F1

sur différents substrats. Les cellules sauvages B16F1, transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou exprimant du lumicanne (HLum) sont ensemencées sur des disques recouverts de Matrigel® (A, C) ou sur du collagène de type I (B, D). Après quatre heures d'incubation, les cellules sont fixées, colorées par la technique du May-Grundvald-Giemsa et comptées pour déterminer l'adhésion cellulaire (A, B) ou l'étalement (C, D). Les histogrammes représentent la moyenne des quatre clones dans deux expériences indépendantes réalisées en triplicata.

2.4) Adhésion et étalement cellulaire des cellules B16F1

Pour déterminer l'influence du lumicanne sur la physiologie cellulaire, l'adhésion et l'étalement des cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum) ont été examinés. Ainsi l'adhésion a été testée sur tapis de collagène de type-I et de Matrigel®, le collagène de type-I étant un constituant important du stroma et le Matrigel® permettant de reproduire un équivalent de membrane basale. On peut voir que le nombre de cellules qui ont adhéré après 4 heures de culture ne diffère pas significativement entre les différents clones (figure 33 A et B). Cela indique que l'expression de lumicanne par les cellules B16F1 n'influence pas l'adhésion sur le Matrigel® ni le collagène de type-I. Si on regarde la figure 33 C et D, on peut remarquer que le pourcentage de cellules étalées n'est pas modifié. L'ensemble de ces résultats indiquent que les cellules transfectées conservent la morphologie et la croissance des cellules B16F1 sauvages.

2.5) Migration des cellules B16F1

Pour estimer la capacité migratoire des cellules de mélanome *in vitro*, des cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum) ont été observées dans des chambres de migration de type Transwell®. Les cellules migrent à travers une membrane de polyvinylpyrrolidone.

Les cellules sont déposées sur la partie supérieure de la membrane et après 24 heures d'incubation à 37°C, celles qui ont traversé la membrane sont fixées avec du méthanol, puis colorées par la technique de May-Grundvald-Giemsa et enfin comptées au microscope sur 5 champs d'observation différents. Ainsi, les cellules exprimant le lumicanne présentent une inhibition de leur capacité à migrer à travers un filtre de Transwell® (nombre de cellules ayant migré de 49 ± 40) par rapport aux cellules B16F1 sauvages (400 ± 60) et aux cellules B16F1 transfectées avec un plasmide pcDNA3 vide (340 ± 90) (Figure 35). Les cellules transfectées par un vecteur vide ne présentent donc pas d'altération de leur migration à travers la membrane du Transwell® par rapport aux cellules sauvages. Ce résultat indique que la transfection et l'acquisition de la résistance à la néomycine ne modifient en rien le potentiel migratoire des cellules B16F1-pcDNA3 alors que l'expression de lumicanne l'inhibe fortement. Les histogrammes présents sur la figure représentent la moyenne de 4 clones B16F1-pcDNA3 et B16F1 pcDNA3-HLum.

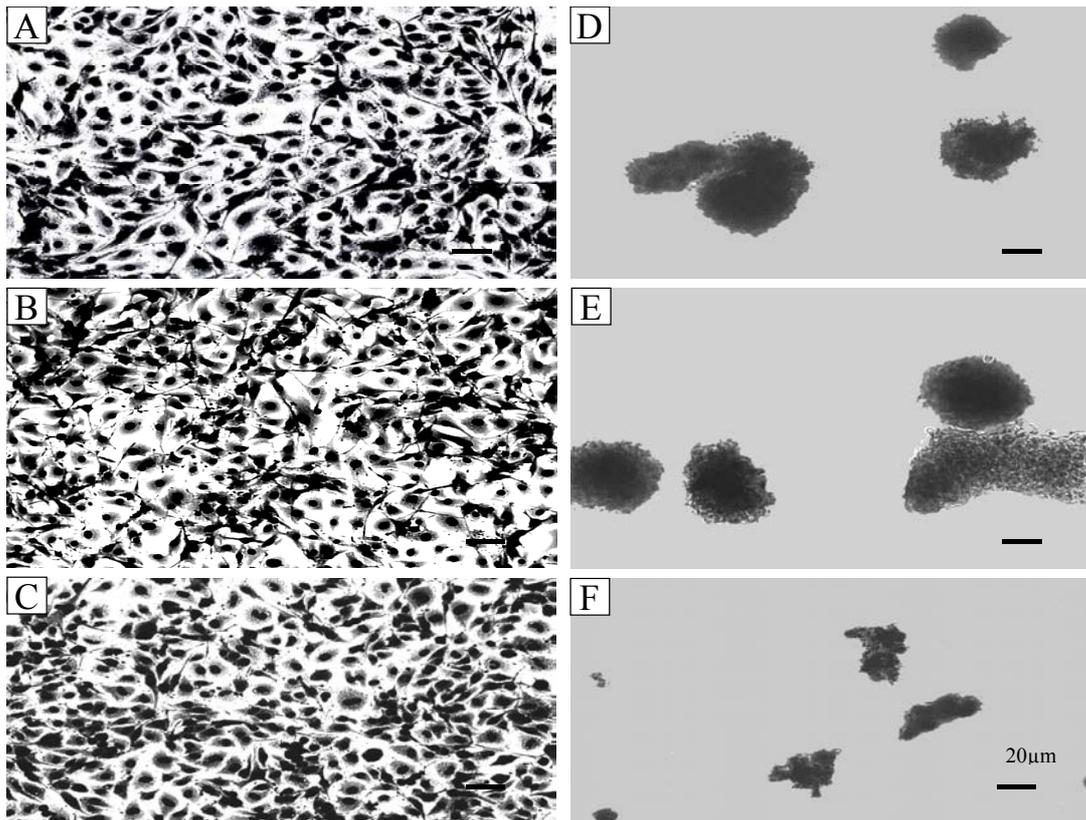
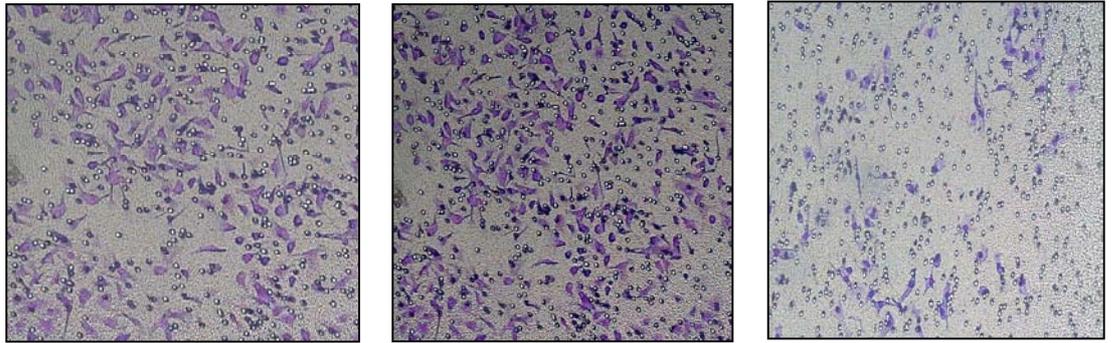


Figure 34 : L'expression de lumicanne par les cellules B16F1 inhibe la croissance indépendante du support. Les cellules sont ensemencées en monocouche (A, B, C) ou dans de l'agar mou (D, E, F). La partie supérieure montre des photographies de cellules sauvages (A, D), transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) (B, E) et des cellules transfectées avec un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne (pcDNA3-HLum) (C, F) après 10 jours de culture. La partie inférieure de la figure représente la capacité de ces cellules à former des colonies. Les histogrammes représentent la moyenne des quatre clones dans deux expériences indépendantes réalisées en triplicata.

A



B

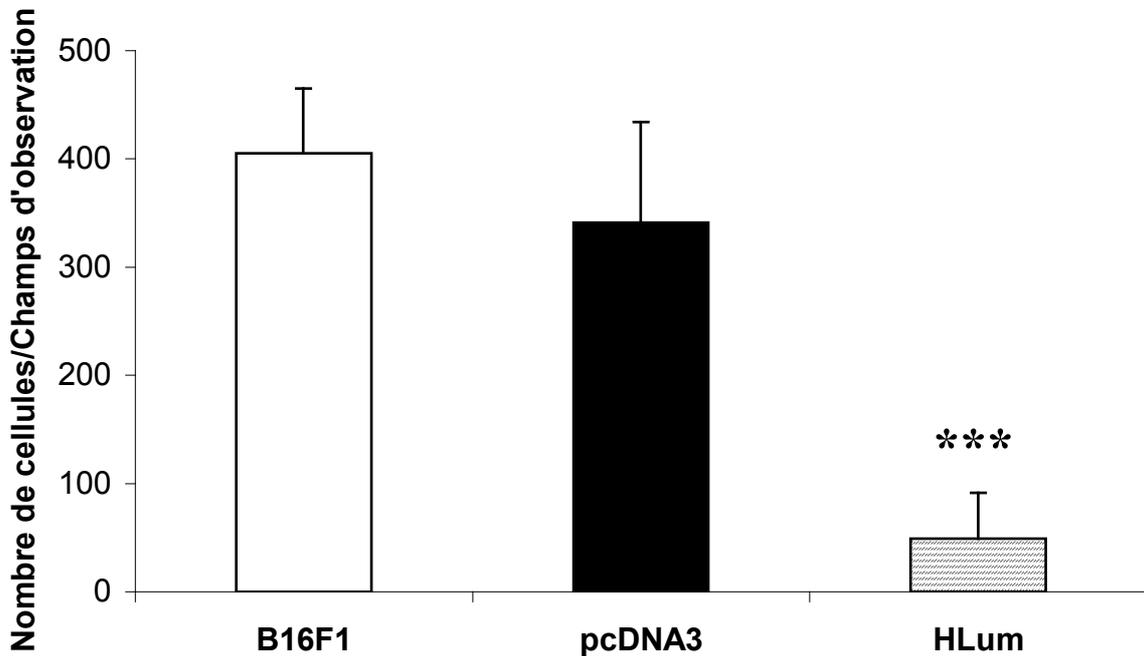


Figure 35 : L'expression du lumicanne inhibe la migration des cellules de mélanome de souris B16F1 à travers un filtre Transwell®. Les cellules sauvages B16F1 transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou exprimant du lumicanne (HLum), sont ensemencées dans la partie supérieure de la chambre du Transwell®. Après 24 heures d'incubation à 37°, les cellules qui ont traversé le filtre du Transwell®, sont colorées par la technique de May-Grundvald-Giemsa (A) et comptées sur cinq champs d'observation à un grossissement x200. Chaque histogramme (B) représente la moyenne des quatre clones dans deux expériences indépendantes réalisées en triplicata.

*** : $p < 0.001$.

2.6) Invasion du Matrigel® par les cellules B16F1

Les capacités invasives *in vitro* des cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum) ont été mesurées dans un modèle de type Transwell® en présence de Matrigel®. Les cellules migrent à travers une membrane de polyvinylpyrrolidone recouverte de Matrigel®, permettant de reproduire un équivalent de membrane basale. Les cellules ont été déposées sur le dessus de cette membrane. Les cellules traversant la membrane ont été fixées au méthanol, colorées par la technique de May-Grundvald-Giemsa puis comptées au microscope.

Ainsi, les cellules exprimant le lumicanne présentent une inhibition hautement significative ($p < 0,001$) de leur capacité à traverser un filtre de Transwell® recouvert de Matrigel® ($24,5 \pm 25$) par rapport aux cellules B16F1 sauvages ($142,5 \pm 36,5$) et aux cellules B16F1 transfectées avec un plasmide pcDNA3 vide ($142 \pm 15,5$) (Figure 36). Ces résultats indiquent que l'expression de lumicanne par les cellules de mélanome de souris B16F1 inhibe fortement leur caractère invasif alors que la transfection par le vecteur vide n'a pas d'effet. Les histogrammes présents sur la figure représentent la moyenne de 4 clones B16F1 pcDNA3 et B16F1-HLum.

3) Production de lumicanne recombinant

Le corps protéique du lumicanne humain a été produit par des bactéries *Escherichia Coli* (JM109 DE3) et purifié par colonne de chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA. La figure 37 A représente la révélation au bleu de Coomassie d'un gel SDS-PAGE où l'on peut voir un lysat de bactéries JM109 DE3 transformées avec un plasmide pQE30 vide (piste 1), avec le plasmide pQE30 contenant l'ADNc du lumicanne humain (pQE30-HLum) (piste 2) et d'une fraction de lumicanne purifié sur une colonne d'affinité Ni-NTA (piste 3). La figure 37 B montre le Western-blot obtenu à partir du gel SDS-PAGE de la figure 37 A après un transfert sur une membrane de nitrocellulose et révélation par un anticorps anti-lumicanne. On peut observer ainsi une bande d'une taille de 37 000 Da correspondant au corps protéique du lumicanne sous sa forme non-glycosylée.

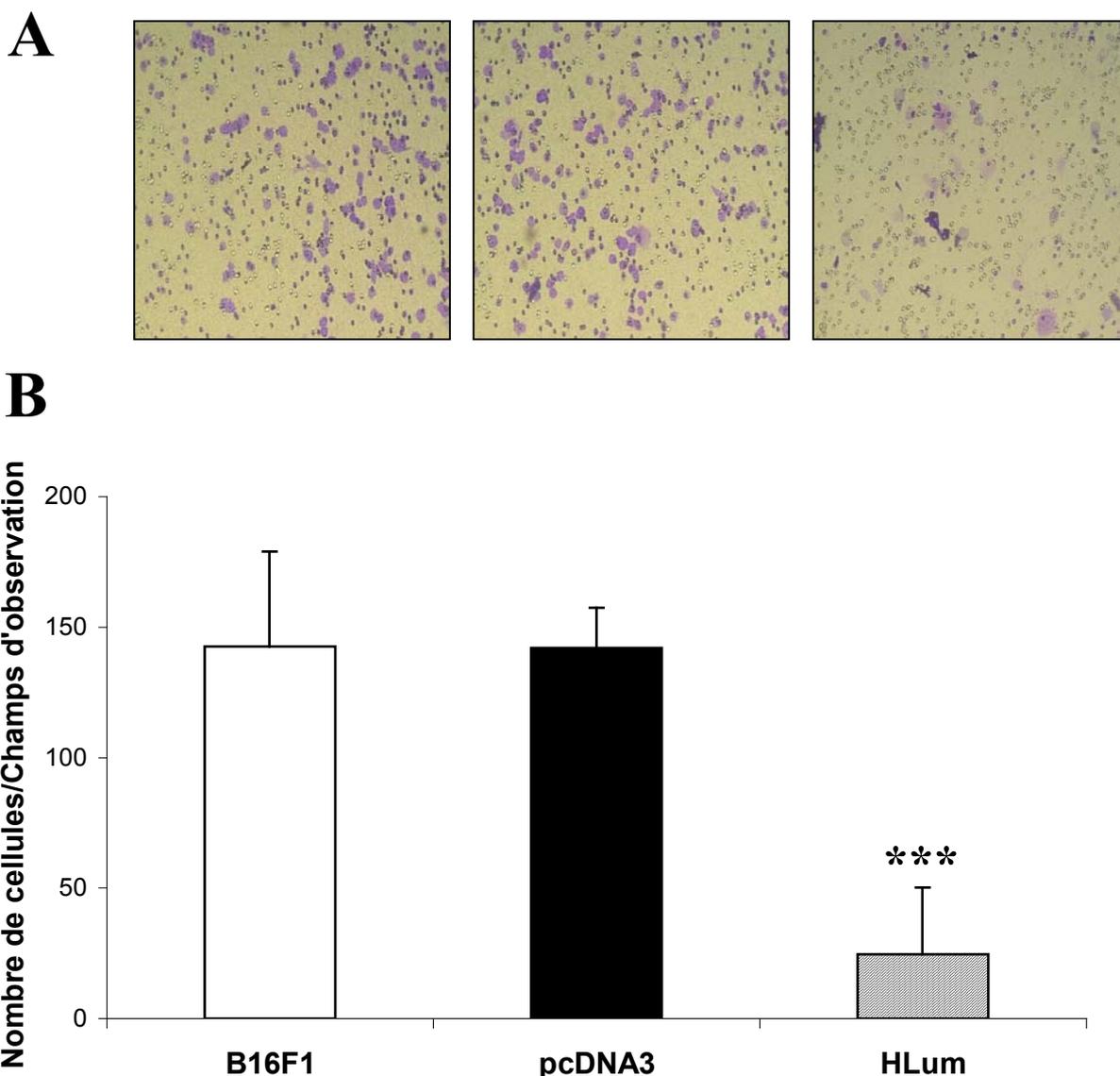


Figure 36 : L'expression du lumicanne inhibe la capacité des cellules de mélanome de souris B16F1 à envahir un filtre de Transwell® recouvert par du Matrigel®. Les cellules sauvages B16F1 transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou exprimant du lumicanne (HLum), sont ensemencées dans la partie supérieure de la chambre du Transwell®. Après 24 heures d'incubation à 37°, les cellules qui ont traversé le filtre du Transwell® recouvert de Matrigel®, sont colorées par la technique de May-Grundvald-Giemsa (A) et comptées sur cinq champs d'observation à un grossissement x200. Chaque histogramme (B) représente la moyenne des quatre clones dans deux expériences indépendantes réalisées en triplicata.

*** : $p < 0.001$.

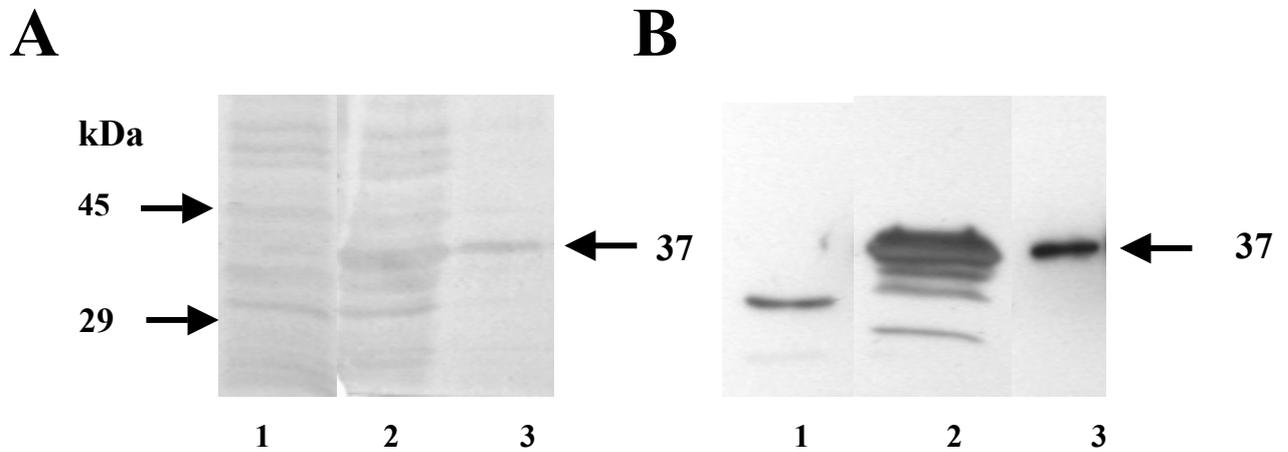


Figure 37 : Production et purification de lumicanne humain recombinant.

Coloration au bleu Coomassie (A) ou révélation par un anticorps anti-lumicanne (B) d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE d'un lysat d'*Escherichia coli* transfectées avec un plasmide pQE30 vide (piste 1), ou avec un plasmide pQE30-HLum (piste 2) et une préparation purifiée obtenue après une chromatographie sur colonne Ni-NTA (piste 3). Les flèches indiquent la position de migration du corps protéique du lumicanne (37 kDa).

4) Etude *In vivo*

Nous avons étudié, *in vivo*, la croissance tumorale des cellules de mélanome de souris B16F1. Pour cela nous avons utilisé un modèle de souris C57BL6 syngénique. Une injection de cellules de mélanome de souris B16F1 en sous-cutané ou dans la veine de la queue a été réalisée chez ses souris, et après 14 jours, les souris ont été sacrifiées, la taille de la tumeur mesurée et le nombre de métastases pulmonaires déterminé. Nous avons testé dans ce modèle les différents clones de cellules B16F1 (B16F1 sauvage, pcDNA3 et pcDNA3-HLum)

4.1) Formation de tumeur sous cutanée

Au temps 0, nous avons injecté en sous cutané sur le flanc gauche de souris syngéniques C57BL6, 100 000 cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum). Au 14^{ème} jour, les souris sont sacrifiées et la taille de la tumeur mesurée. Ainsi, on peut voir sur la figure 38 que le volume des tumeurs formées par les cellules pcDNA3-HLum est diminuée très significativement ($p < 0,01$). Le volume passe de plus de 0,45 cm³ pour les tumeurs témoins (B16F1 sauvage et B16F1-pcDNA3) à 0,15 cm³ pour les cellules exprimant le lumicanne.

Aucune métastase pulmonaire ni hépatique n'a pu être mise en évidence dans ce modèle expérimental.

4.2) Formation de métastases pulmonaires

Au temps 0, nous avons injecté dans la veine de la queue de souris syngéniques C57BL6, 250 000 cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou par un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum). Au 14^{ème} jour, les souris ont été sacrifiées et les poumons prélevés. Le nombre de métastases pulmonaires a été évalué sous une loupe binoculaire (figure 39). Nous avons comptabilisé les métastases ayant une taille comprise entre 1 et 3 mm de diamètre.

Le nombre de métastases formées par les cellules exprimant le lumicanne (pcDNA3-HLum) est diminué significativement ($p < 0,001$) par rapport aux cellules B16F1-pcDNA3. Il passe ainsi de plus de 45 métastases en moyenne pour les cellules témoins à environ 5 métastases pour les cellules exprimant le lumicanne.

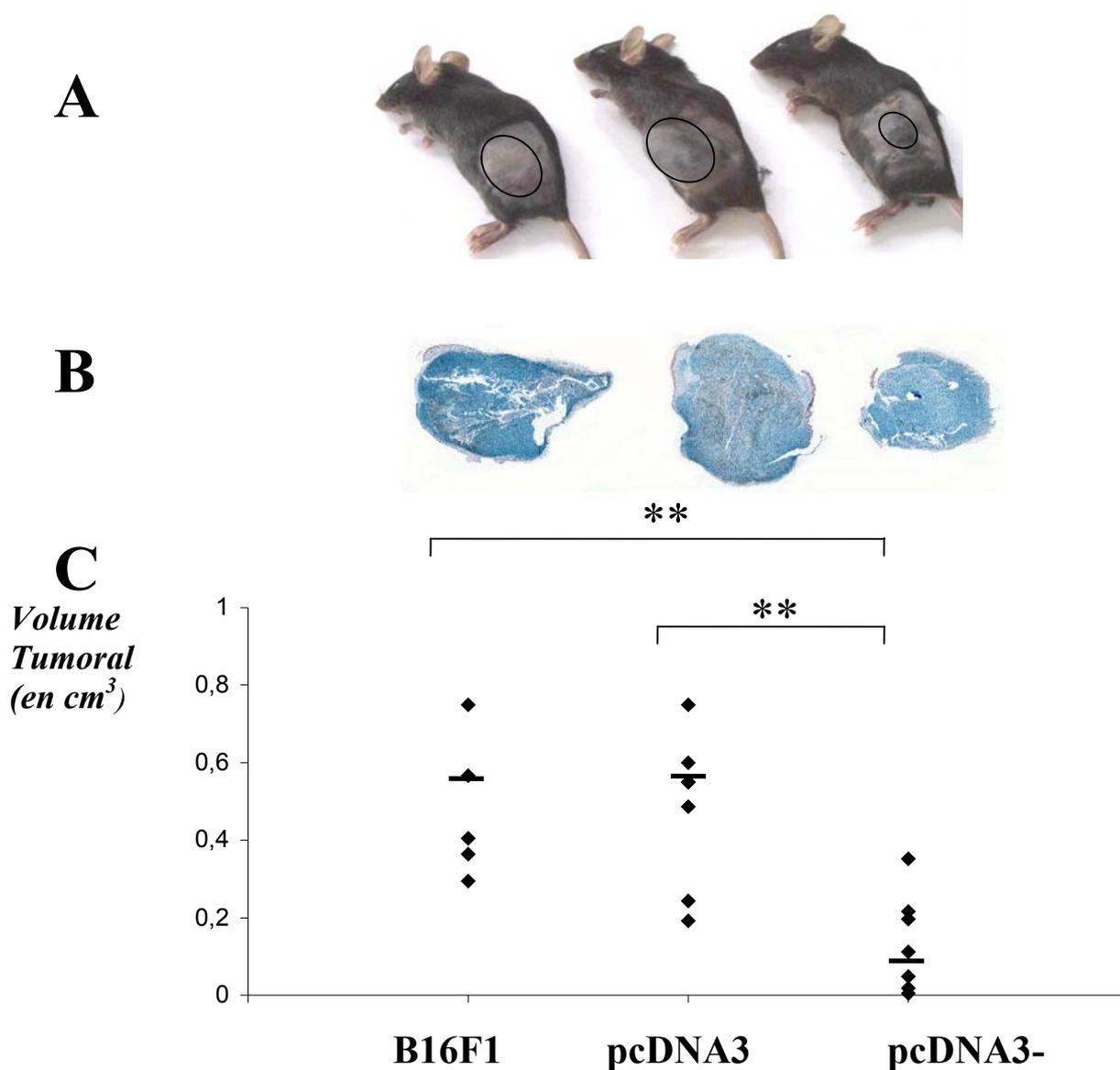


Figure 38 : L'expression du lumicanne par des cellules de mélanome inhibe la tumorigénicité de ces cellules *in vivo*. Les tumeurs sont obtenues par des injections sous-cutanées de 10^5 cellules sauvages, transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou avec un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne humain, dans le flanc gauche de souris syngéniques C57BL6 (A), comme décrit dans le chapitre matériel et méthodes. Le volume tumoral est mesuré 14 jours après l'injection (C). La photo B représente une coloration HPS des coupes de tumeur (B16F1, pcDNA3, pcDNA3-HLum).

** : $p < 0.01$

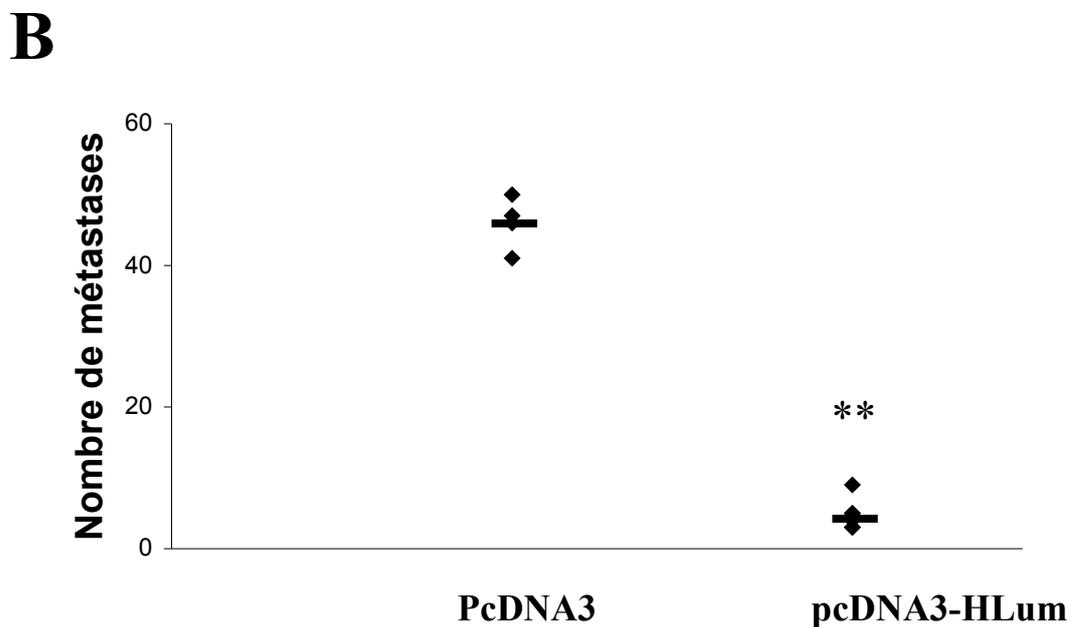
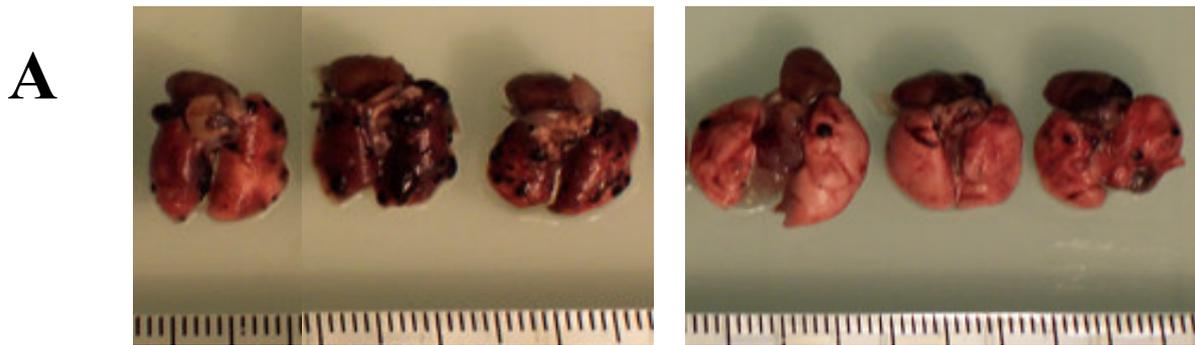


Figure 39 : Inhibition du potentiel métastatique des cellules de mélanome de souris B16F1 transfectées avec du lumicanne. Les métastases pulmonaires sont obtenues par des injections sous-cutanées de $2,5 \times 10^5$ cellules transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou avec un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-Hlum) dans l'une des veines de la queue de souris C57BL6. Le nombre de métastases est déterminé 14 jours après l'injection (A) et analysé graphiquement (B).

**** : $p < 0.001$**

5) Immunohistochimie des tumeurs

Après la mesure macroscopique de leur taille, les tumeurs ont été pour une partie extraites par dissection et fixées dans du formol afin d'immobiliser les constituants tissulaires et cellulaires dans un état le plus proche possible du vivant. Nous avons mis en évidence *in situ* des antigènes (lumicanne et la cycline D1) à l'aide d'anticorps marqués. La révélation de ce marquage se fait grâce à une réaction enzymatique.

5.1) Expression du lumicanne au sein de la tumeur

Afin de confirmer l'expression du lumicanne dans les tumeurs *in vivo*, les tumeurs générées par l'injection de cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum) ont été étudiées par immunohistochimie. Ainsi, on peut voir sur la figure 40 un très faible marquage du lumicanne au sein de tumeurs générées par des cellules B16F1 sauvages ou transfectées par un vecteur vide. On peut remarquer que ce marquage est un plus intense au niveau du derme. Pour les tumeurs développées à partir de cellules transfectées par un plasmide pcDNA3-HLum, on trouve un marquage spécifique et intense par les anticorps anti-lumicanne au sein de la tumeur.

5.2) Expression de la cycline D1 au sein de la tumeur

Pour préciser l'effet du lumicanne sur la prolifération tumorale, nous avons étudié l'expression de la cycline D1, protéine jouant un rôle majeur dans le cycle cellulaire. Ainsi on peut voir sur la figure 41, l'expression de la cycline D1 au sein des tumeurs générées par les cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum). On peut constater sur les photos que le marquage de la cycline D1 est nucléaire et est présent dans les 3 types de tumeurs induites. La quantification des cellules marquées se fait par un comptage manuel par deux personnes différentes au microscope sur un total de 2 x 1000 cellules. On observe ainsi, $40,3 \pm 2,8\%$, $41 \pm 3,0\%$ et $29,6 \pm 1,4\%$ de noyaux marqués pour les tumeurs B16F1, pcDNA3 et pcDNA3-HLum respectivement. Ceci correspond à une inhibition significative de l'expression de cycline D1 de l'ordre de 20% ($p < 0,001$). Ce résultat laisse donc présumer que le lumicanne inhibe en partie la croissance du mélanome en inhibant le cycle cellulaire.

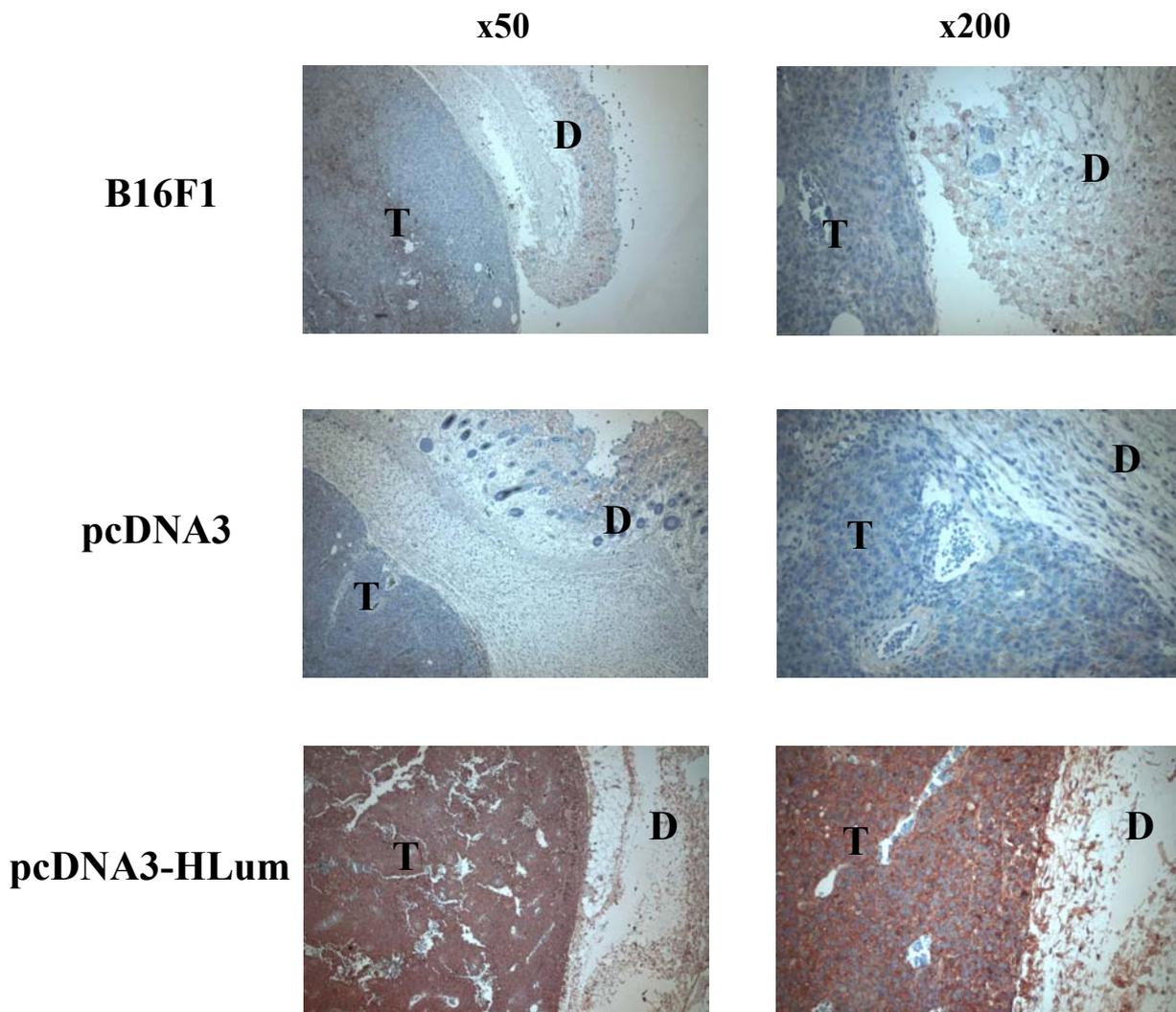


Figure 40 : Coupe histologique du derme (D) et de la tumeur (T) générées par les cellules de mélanome de souris exprimant pas ou peu de lumicanne. Les tumeurs sont générées par l'injection de 10^5 cellules B16F1 sauvages, transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne (pcDNA3-HLum) dans le flanc de souris C57BL6. L'étude immunohistochimique est réalisée avec un anticorps polyclonal dirigé contre le lumicanne. Un marquage rouge apparaît intense dans la tumeur (T) des cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3-HLum et faible dans le derme normal (D) et le stroma des tumeurs issues de cellules sauvages et pcDNA3.

Grossissement x50 (1^{ère} colonne) , Grossissement x200 (2nd colonne)

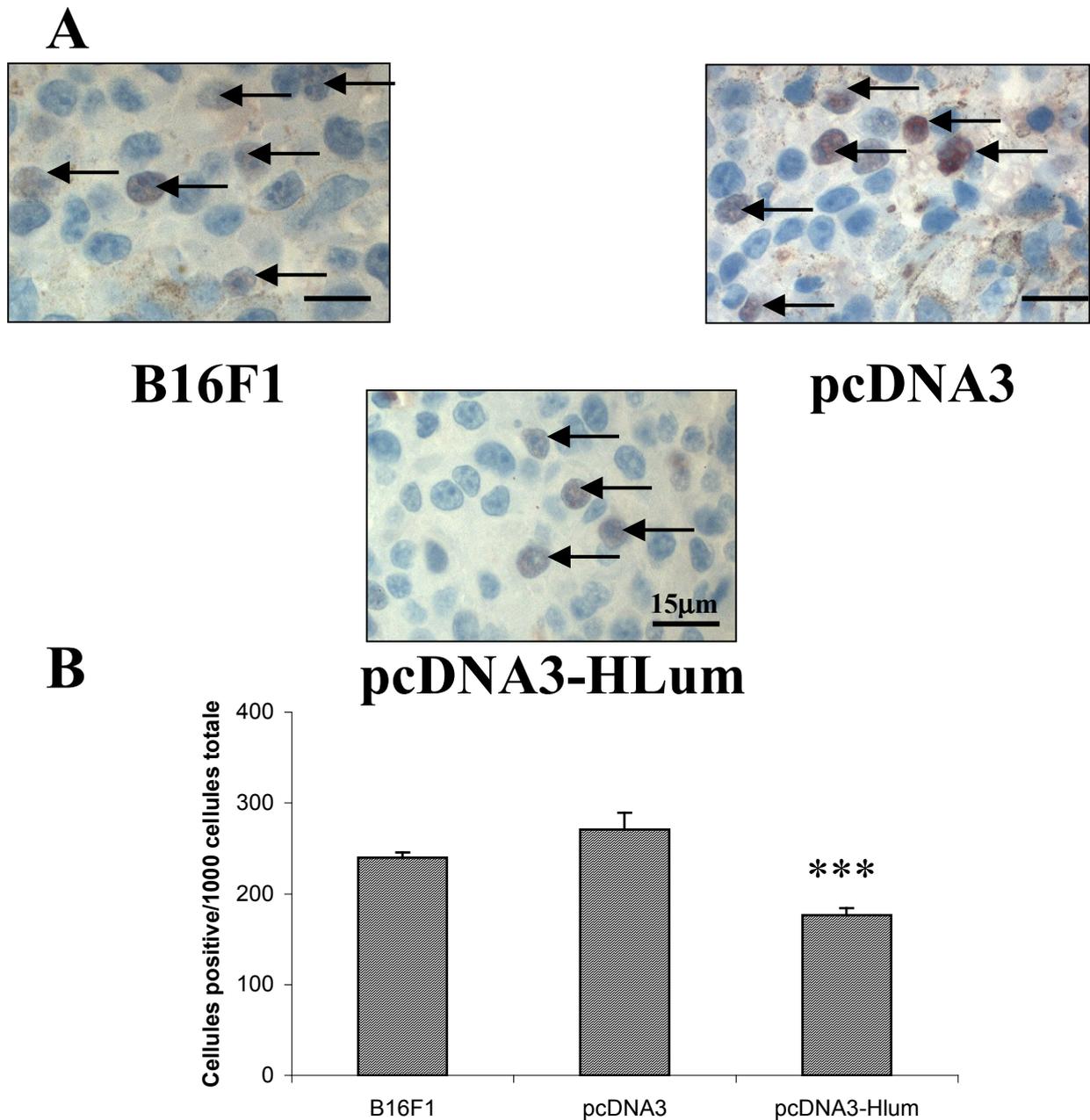


Figure 41 : Expression de la cycline D1 dans les tumeurs (A). Les tumeurs sont générées par l'injection sous cutanée de 10^5 cellules B16F1 sauvages, transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne (pcDNA3-HLum) dans le flanc de souris syngéniques C57BL6. Le nombre des noyaux positifs pour la cycline D1 (marqués par une flèche) est plus élevé dans les cellules tumorales témoins (B16F1 et pcDNA3), en comparaison des cellules exprimant le lumicanne (pcDNA3-HLum) (B).

*** :

p<0,001

6) Induction de l'apoptose par le lumicanne

Pour préciser l'effet du lumicanne l'inhibition de la croissance tumorale, nous avons étudié son rôle dans l'induction de l'apoptose.

6.1) Coloration au Hoechst-33342

En premier lieu, nous avons détecté les cellules qui sont engagées dans une voie apoptotique par une coloration au Hoechst-33342. Cette coloration a été effectuée sur des coupes de tumeurs de souris induites par l'injection de cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum) (Figure 42). On peut constater que dans les trois cas de tumeurs, des cellules positives au marquage de Hoechst ont été détectées. Ce résultat ne nous permet pas de conclure quant à l'effet de l'expression du lumicanne par les cellules B16F1 sur l'apoptose.

Nous avons donc cultivé des cellules B16F1 sauvages en plaque 24 puits, jusqu'à 50% de confluence cellulaire. Les cellules sont alors traitées avec 0, 10 et 50 µg/ml de lumicanne recombinant humain (Figure 43). Après 16 heures d'incubation les cellules sont colorées au Hoechst-33342 et observé en microscopie à fluorescence. Ainsi, on peut voir que les cellules B16F1 non traitées ne présentent pas de marquage positif après une coloration au Hoechst-33342. Par contre, lors d'un traitement avec du lumicanne recombinant, les cellules B16F1 présentent des morphologies caractéristiques de cellules en apoptose comme la fragmentation et la condensation de la chromatine.

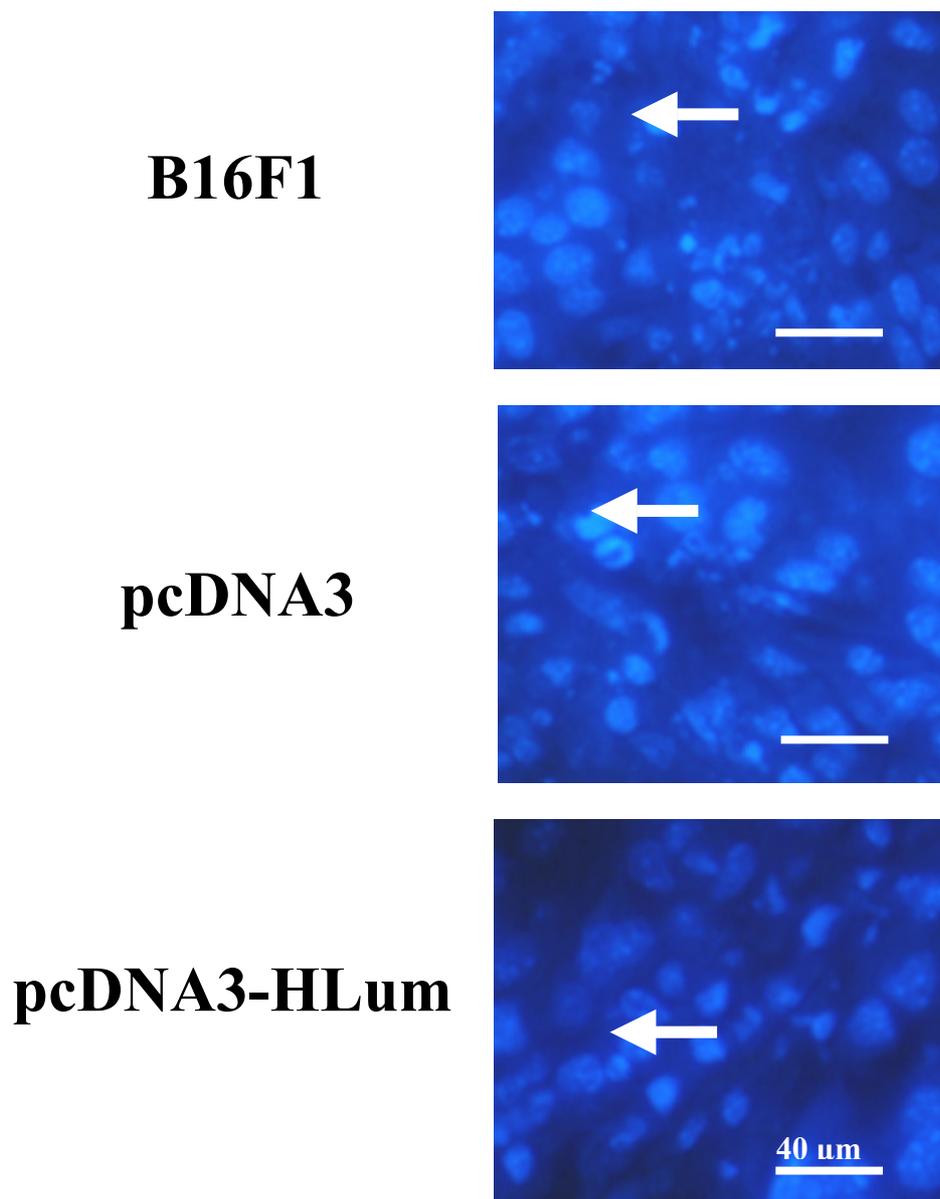


Figure 42 : Présence de cellules en apoptose au sein de tumeurs de mélanome **B16F1**. Les tumeurs sont générées par l'injection de 10^5 cellules B16F1 sauvages, transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne (pcDNA3-HLum) dans le flanc de souris C57BL6. On colore les coupes de ces tumeurs au Hoechst 33342. On peut noter que dans les trois cas, on retrouve des cellules présentant une condensation de la chromatine et une fragmentation des noyaux (noté par une flèche).

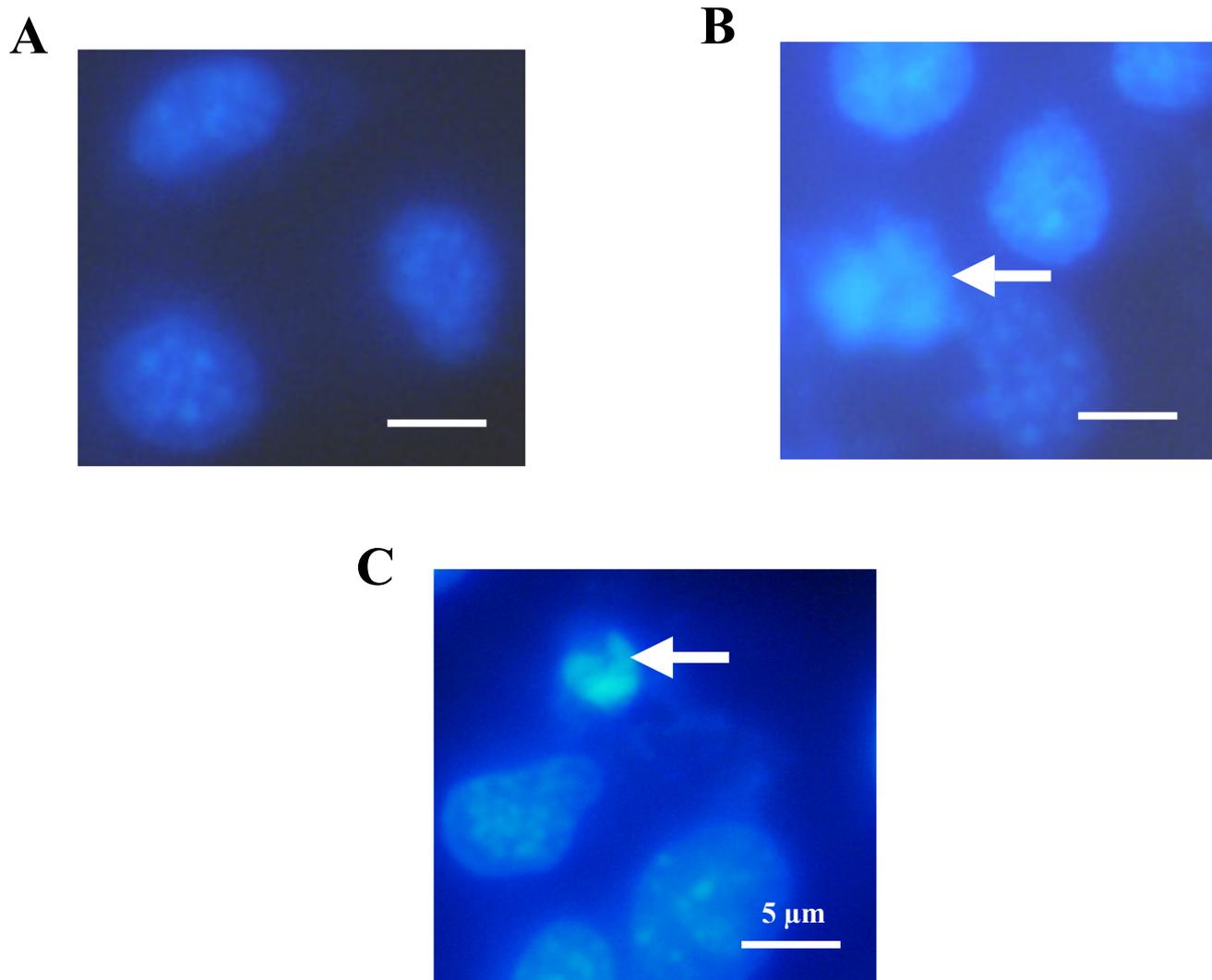


Figure 43 : Le lumicanne recombinant induit l'apoptose des cellules B16F1. Des cellules sauvages (B16F1) sont ensemencées dans une plaque 24 puits, incubées à 37°C durant 16 heures en présence ou non de lumicanne recombinant et enfin marquées au Hoechst-33342. (A) Cellules B16F1 non traitées (contrôle). On peut voir une distribution homogène de la chromatine dans le noyau. (B et C) Cellules B16F1 traitées avec du lumicanne recombinant (B : 10 µg/ml et C : 50 µg/ml). On peut noter une condensation de la chromatine à la périphérie des noyaux et une fragmentation des noyaux (notés par une flèche).

6.2) Analyse par Western-blot des facteurs pro- ou anti-apoptotiques

Pour explorer plus en profondeur les effets du lumicanne recombinant humain lors de l'induction de l'apoptose, nous avons procédé à l'analyse par Western-blot de facteurs pro- et anti-apoptotiques comme la p53, Bax, Caspase 3 et 9 et PARP clivé.

6.2.a) In vivo (p53, Bax, caspase 9, 3 et PARP)

Pour cette étude, nous avons broyé les tumeurs de souris induites par l'injection de cellules B16F1 sauvages, B16F1 transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (pcDNA3-HLum). L'analyse des protéines extraites a été réalisée par Western-blot. La figure 44 nous permet de voir que l'expression de la p53 phosphorylée est augmentée dans les tumeurs exprimant le lumicanne par rapport aux tumeurs témoin (B16F1 et pcDNA3). On trouve aussi une forte augmentation de la protéine pro-apoptotique Bax dans ces tumeurs. Par contre, on ne voit aucune différence dans l'expression de la caspase 3 clivée et de PARP clivé. Ces résultats indiquent donc que le lumicanne serait capable d'induire l'apoptose par le biais de la protéine pro-apoptotique Bax et de la protéine p53.

6.2.b) In vitro (p53, Bax, caspase 9, 3 et PARP) (Figure 45)

Pour confirmer les résultats précédemment obtenus, nous avons cultivé des cellules B16F1 sauvages pendant 16 heures dans des plaques à 6 puits avec des doses croissantes de lumicanne recombinant (0, 10 et 50 µg/ml). L'étude des protéines de la couche cellulaire par Western-blot, nous permet de voir qu'il ne semble pas y avoir de modification dans l'expression de la protéine p53 totale, mais que l'expression de la protéine p53 phosphorylée est augmentée pour un traitement des cellules avec 50 µg/ml de lumicanne. Comme nous l'avons constaté dans l'expérience précédente, l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax est fortement augmentée par un traitement avec du lumicanne recombinant (50 µg/ml). Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression de la caspase 9 qui est connue comme étant régulée par la protéine Bax et régulant elle même la caspase 3. On peut voir une augmentation de l'expression de la caspase 9 dès 10 µg/ml. On constate de plus, une diminution de la caspase 3 non clivée pour 50 µg/ml (la caspase 3 clivée n'étant pas détecté) et finalement une augmentation de PARP clivé dès 10 µg/ml. L'ensemble de ces résultats démontre que l'inhibition de la croissance tumorale par le lumicanne pourrait être due à l'induction de l'apoptose des cellules tumorales.

In vivo

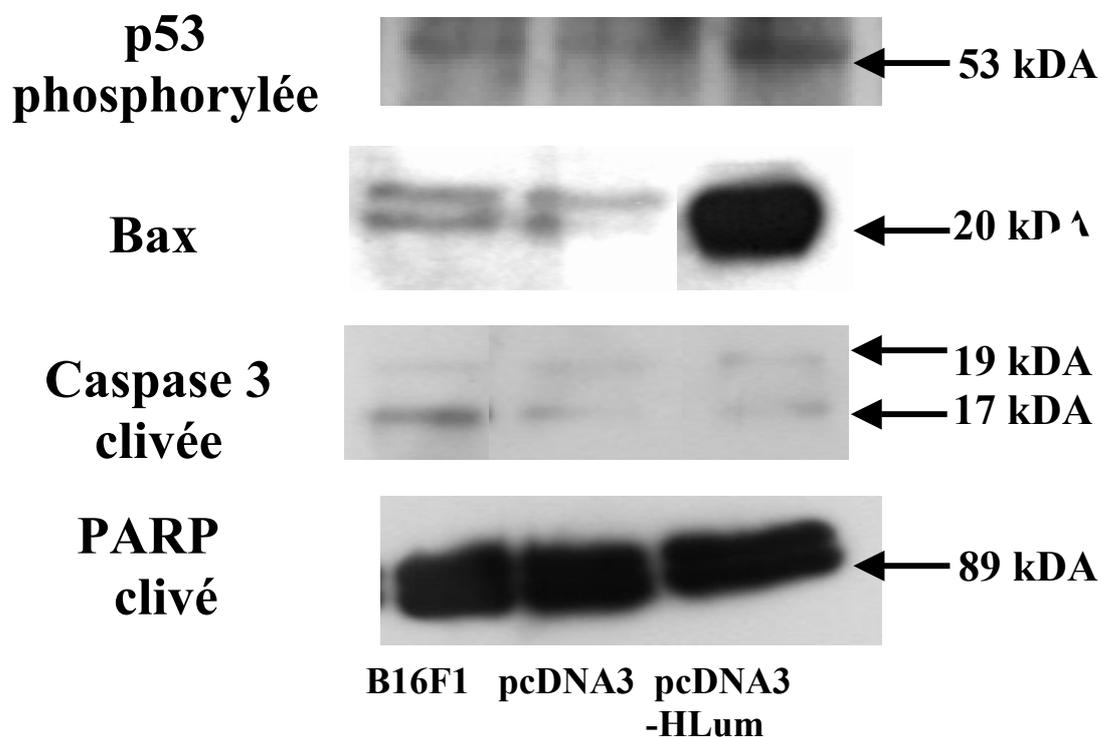


Figure 44 : Effets de l'expression du lumicanne sur la synthèse de p53 phosphorylée, Bax, Caspase 3 clivée, et de PARP dans les tumeurs formées par les cellules B16F1, B16F1 transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne (pcDNA3-HLum). Les tumeurs sont broyées et l'expression de p53, de Bax, de la caspase 3 clivée et de PARP clivé est évaluée par Western-blot.

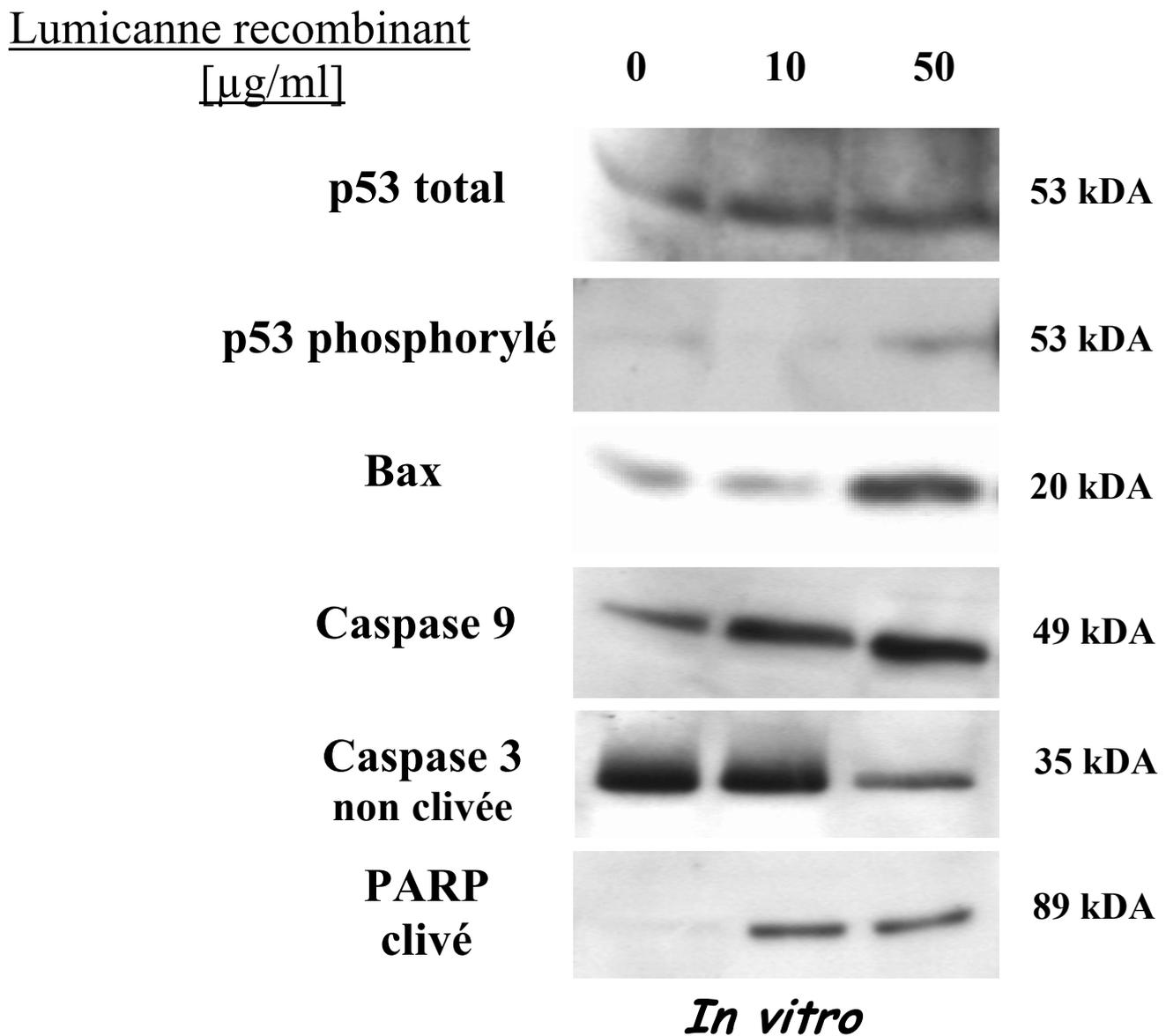


Figure 45 : Effets du lumicanne recombinant sur l'expression de p53, Bax, PARP, et des Caspases 9 et 3 dans les cellules B16F1. Les cellules B16F1 sauvages sont incubées durant 16 heures sans (contrôle) ou avec 10 ou 50 $\mu\text{g/ml}$ de lumicanne recombinant. A la fin de l'incubation, les cellules sont collectées et l'expression de p53, Bax, des Caspases 9 et 3 et PARP clivées évaluée par Western-blot.

7) Effet du lumicanne sur l'expression des MMPs

Pour expliquer les différences de migration et d'invasion des cellules de mélanome de souris B16F1, nous avons étudié plusieurs cascades protéolytiques comme la voie de la MMP2 et le système plasminogène/plasmine.

7.1) Activité MMPs des cellules B16F1 sauvages et B16F1 transfectées

7.1.a) Zymographie en gel de gélatine

La zymographie en gel de gélatine permet d'étudier les deux principales métalloprotéinases impliquées dans de nombreux cancers : la MMP2 et la MMP9. Ainsi on peut voir sur la figure 46 A, que dans le surnageant de culture de cellules de mélanome de souris incubé 24 heures dans un milieu RPMI sans SVF, il y a présence de MMP2 sous sa forme latente (pro-MMP2) et une plus faible expression de la pro-MMP9. La sécrétion par les cellules B16F1 de la pro-MMP2 et de la pro-MMP9 n'est pas modifiée par la transfection avec un vecteur pcDNA3 vide (B16F1-pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne (B16F1-HLum).

Il est à noter que dans la couche cellulaire des cellules B16F1, on trouve très peu de pro-MMP2 et de la pro-MMP9.

7.1.b) Zymographie en gel gélatine-plasminogène

La zymographie en gel gélatine-plasminogène permet d'étudier l'expression de deux activateurs du plasminogène que sont le tPA et de l'uPA. Ainsi, on cultive des cellules de mélanome de souris B16F1 dans un milieu RPMI sans SVF pendant 24 heures. Après cette incubation, les milieux sont déposés à quantité égale de protéine. On peut voir sur le figure 46 B que les cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (B16F1-HLum) expriment à un taux constant du tPA et de l'uPA.

Il est à noter que dans la couche cellulaire des cellules B16F1 on trouve très peu de tPA et uPA.

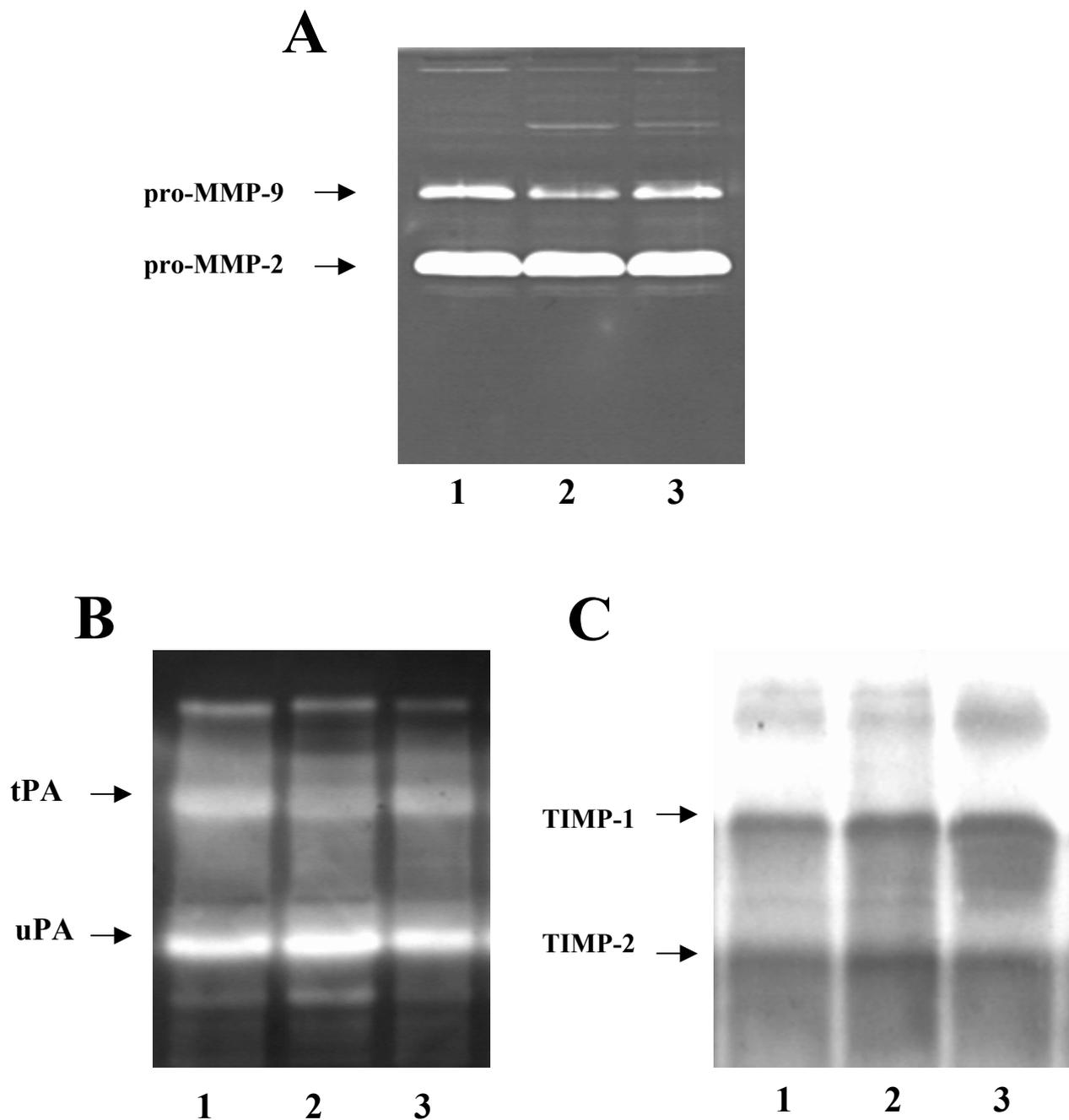


Figure 46 : Zymogrammes montrant l'activité de la pro-MMP2, pro-MMP9 (A), tPA, uPA (B), des TIMPs-1 et -2 (C) dans le milieu de culture de cellules B16F1 sauvages (1), transfectées avec un vecteur vide (2) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (3).

7.1.c) Zymographie inversée

La zymographie inversée permet d'étudier la sécrétion du TIMP-1 et 2. Ainsi on cultive des cellules de mélanome de souris B16F1 dans un milieu RPMI sans SVF pendant 24 heures. Après cette incubation, les milieux sont déposés à quantité égale de protéines. On peut voir sur la figure 46 C que ces cellules expriment à la fois le TIMP-1 et le TIMP-2. De plus, on peut observer que cette sécrétion n'est pas altérée par la transfection avec un vecteur pcDNA3 vide (B16F1-pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne (B16F1-HLum).

Il est à noter que dans la couche cellulaire des cellules B16F1, on trouve peu de TIMP -1 et de TIMP-2 (qui est la forme majoritaire).

7.1.d) Dosage de l'activité tPA et uPA

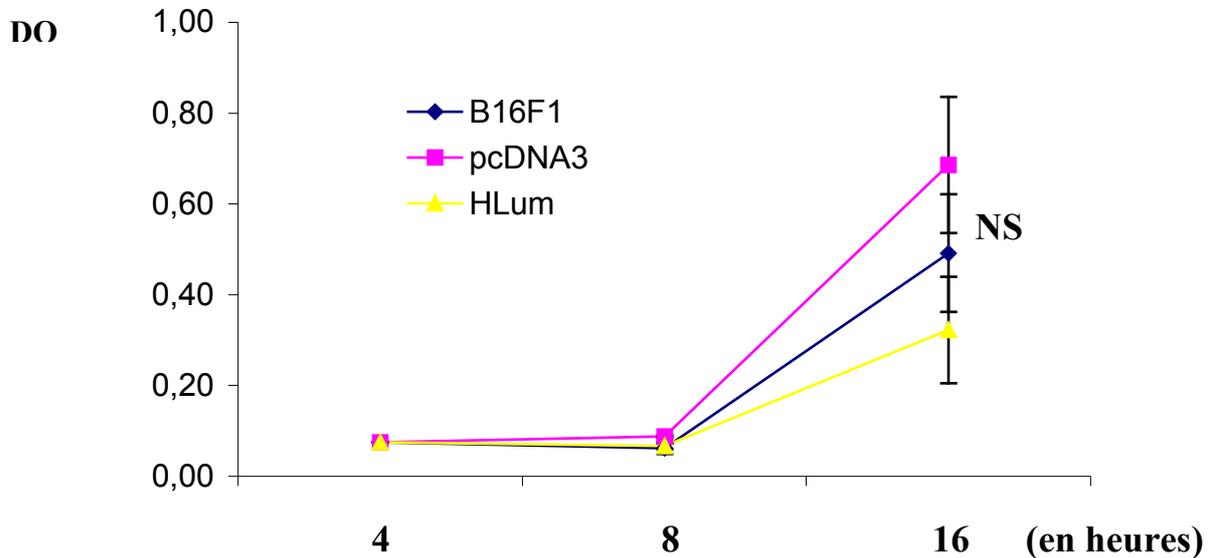
L'activité plasmine générée est mesurée grâce à un substrat spécifique qui est le S2251 sur la couche cellulaire. Alors que l'activité de l'uPA se mesure avec du substrat S2244. Après la mesure colorimétrique effectuée sur la couche cellulaire des cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou par un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne humain (B16F1-HLum), on peut voir que l'activité tPA et uPA n'est pas modifiée entre ces différents clones (figure 47).

7.2) Activité des MMPs présentes dans les tumeurs B16F1

La zymographie en gel gélatine permet d'étudier les deux principales métalloprotéinases impliquées dans de nombreux cancers : la MMP2 et la MMP9. Ainsi, on peut voir sur la Figure 48, que l'expression de la pro-MMP2, de la MMP2 active et de la pro-MMP9 au sein de tumeur induite par l'injection de cellules B16F1 sauvages et transfectées par un vecteur vide (B16F1-pcDNA3) ou un vecteur contenant l'ADNc du lumicanne (B16F1-HLum) varie selon la localisation au sein même de cette tumeur. Comme indiqué sur la figure 48, les tumeurs témoins (B16F1 et B16F1-pcDNA3) n'expriment aucune MMP en leur centre. En périphérie de la tumeur, on trouve de la pro-MMP2 et de la MMP2 active, ainsi que de la pro-MMP9 en faible quantité. Enfin, au sein du tissu sain péri-tumoral, il y a une quantité de pro-MMP2, MMP2 forte et une faible quantité de pro-MMP9.

Pour les tumeurs exprimant du lumicanne, on observe une faible quantité de la pro-MMP2 au centre de la tumeur, une forte quantité de la pro-MMP2 et MMP2 active ainsi que de pro-MMP9 en périphérie tumorale. On observe, aussi une activité métalloprotéinasique nul dans les tissus sains entourant ce type de tumeur (figure 48-3).

A



B

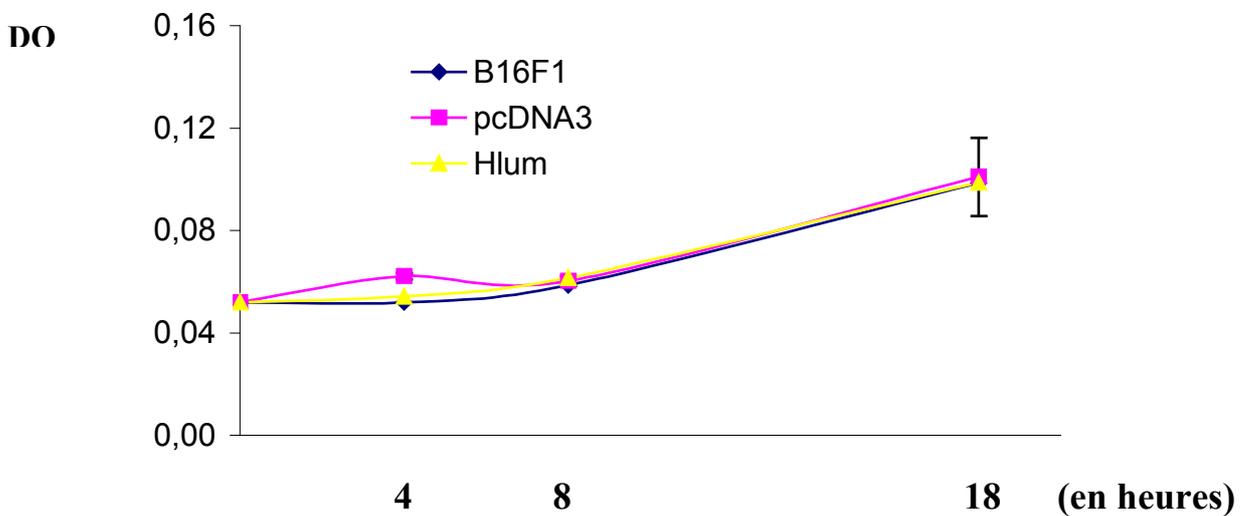


Figure 47 : Dosage de l'activité tPA (A) et uPA (B) sur la couche cellulaire de cellules B16F1 sauvages, transfectées avec un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (HLum). L'activité tPA et uPA n'est pas modifiée entre les 3 clones étudiés.

Chaque courbe correspond à la moyenne de 3 clones.

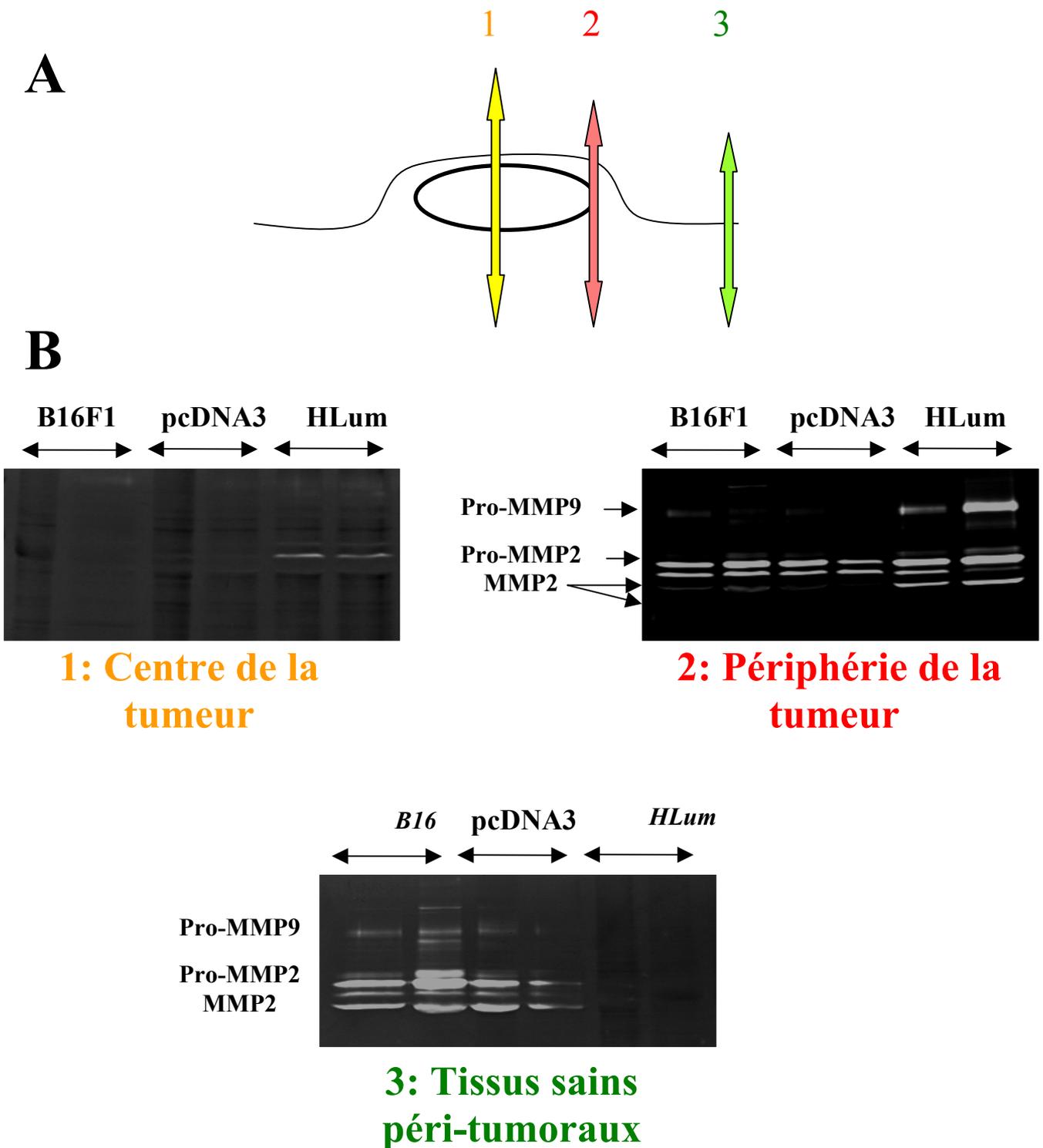


Figure 48 : Analyse par la technique de zymographie gélatine de l'activité pro-MMP2, MMP2 et MMP9 au sein et autour des tumeurs (B) générées par l'injection de cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (HLum). La figure A est une représentation schématique de la tumeur avec les différentes coupes effectuée (*centre de la tumeur-1, périphérie de la tumeur-2 et tissus sains péri-tumoraux-3*).

DISCUSSION

DISCUSSION

Les glycosaminoglycannes et les protéoglycannes constituent un groupe de macromolécules de la matrice extra-cellulaire, qui jouent un rôle majeur dans la fonction et l'organisation du tissu conjonctif. La synthèse des protéoglycannes commence dans le réticulum endoplasmique granuleux, où les oligosaccharides sont ajoutés sur la protéine naissante au cours de la traduction lors d'une étape que l'on nomme la N-glycosylation. Ensuite, dans l'appareil de Golgi, des oligosaccharides riches en mannose sont liés au corps protéique par une liaison O-osidique. L'addition de chaînes de glycosaminoglycannes commence dans la lumière du réticulum endoplasmique. Ces chaînes de glycosaminoglycannes vont ainsi définir la classe des protéoglycannes et leur conférer un certain nombre de propriétés.

Dans un premier temps, le but de notre travail a été d'étudier l'expression du lumicanne au niveau du derme. Nous avons recherché les agents endogènes, exogènes capables de moduler l'expression de cette glycoprotéine.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au mélanome et à aux effets anti-tumoraux du lumicanne dans ce cancer cutané.

I Lumicanne et vieillissement cutané chronologique et photo-induit

La distribution et la structure des glycosaminoglycannes et protéoglycannes ont été montrées comme modifiées avec l'âge dans un grand nombre de tissus et d'organes. Par exemple, le rapport kératane-sulfate / chondroïtine-sulfate paraît augmenté avec l'âge du donneur au sein des disques intervertébraux lombaires (Adams et coll. 1977).

On a rapporté une baisse de la synthèse des glycosaminoglycannes présents dans la peau de sujet adulte par rapport à la peau de fœtus (Breen et coll. 1970). De même, dans un autre modèle d'étude, on a trouvé une diminution du taux d'acide hyaluronique et de dermatane-sulfate dans la peau âgée. Cette baisse d'acide hyaluronique est toutefois probablement due à une mauvaise extractabilité de ce glycosaminoglycane chez les sujet âgés (Bernstein et coll. 1995). On a aussi observé des changements dans la distribution au cours du processus de vieillissement, comme par exemple l'acide hyaluronique présent dans la peau, particulièrement au niveau de l'épiderme (Bernstein et coll. 1995).

L'analyse de la synthèse des protéoglycannes par les fibroblastes dermiques *in vitro* a aussi montré des différences en fonction de l'âge. Ainsi, on a observé une baisse globale du taux de

protéoglycannes, selon les donneurs, en fonction de l'âge (Winkler et coll. 2001). D'autres études, qui ont utilisé comme modèle les fibroblastes vieilliss *in vitro* (modèle de Hayflick (Hayflick 1974)), ont montré une diminution du rapport entre gros et petits protéoglycannes pour les cellules plus âgées. Il a aussi été montré que le ratio biglycane sur décorine synthétisée *in vitro* était plus important dans les fibroblastes dermiques de sujets jeunes (Schonherr et coll. 1993). De plus, une étude portant sur des fibroblastes gingivaux de patients âgés de 12 à 68 ans a montré une baisse des gros protéoglycannes, une augmentation de l'héparane-sulfate et une baisse de la totalité des protéoglycannes synthétisés (Bartold et coll. 1986).

Lors de notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés aux rôles des petits protéoglycannes riches en leucine car ceux-ci présentent des fonctions importantes dans la régulation et le maintien de l'homéostasie et l'organisation dermique.

Ainsi, Chakravarti et coll (Chakravarti et coll. 1995) ont pu mettre en évidence que le lumicanne, membre de la famille des SLRPs, était généralement colocalisé avec les fibres de collagène dans les tissus conjonctifs, et que l'inactivation de ce gène entraînait, chez la souris, une diminution significative de la résistance du tissu dermique, liée à une altération du tissu conjonctif (Chakravarti et coll. 1998). Les résultats ainsi observés sont similaires à ceux constatés lors de l'inactivation du gène de la décorine (Danielson et coll. 1997).

Dans un premier temps, nous avons étudié la synthèse du taux d'ARNm des petits protéoglycannes la décorine, biglycane et lumicanne au sein de fibroblastes dermiques issus de donneurs d'âges différents. Le taux d'ARNm de ces SLRPs a été rapportés au taux global d'ARN déposé sur le gel. En effet, nous avons constaté que le taux d'ARNm de la 36B4 qui code une protéine ribosomale, semble être modulé en fonction de l'âge. Nous avons donc comparé les ARNm des SLRPs avec le taux d'ARN ribosomal 18S. Nous avons observé ainsi une tendance à l'augmentation, toutefois statistiquement non significative, du taux d'ARNm de la décorine chez les sujets âgés par rapport aux sujets jeunes. Ces résultats correspondent aux données retrouvées dans la littérature, qui montrent une augmentation de la protéine décorine avec l'âge et cela dans de nombreux modèles d'étude (Roughley et coll. 1994; Carrino et coll. 2000; Del Santo et coll. 2000). De plus, nous avons observé que l'expression du taux d'ARNm de biglycane n'est pas modifiée. Des résultats similaires ont été rapportés dans l'étude de Carrino et coll. (Carrino et coll. 2000). En ce qui concerne l'expression du lumicanne, rien n'était connu jusqu'à présent quant à sa régulation en fonction de l'âge. Dans notre étude, nous avons constaté une diminution significative de l'expression de son ARNm entre les sujets jeunes et adultes et les sujets jeunes et âgés.

Le fait que nous n'ayons pas retrouvé d'augmentation significative de l'expression du taux d'ARNm de la décorine au cours du vieillissement, montré dans des études ultérieures (Roughley et coll. 1993; Passi et coll. 1997; Del Santo et coll. 2000; Ito et coll. 2001; McAlinden et coll. 2001; Kuwabara et coll. 2002), pourrait s'expliquer soit par une augmentation trop faible de la synthèse des ARNm en fonction de l'âge, soit par une augmentation portant essentiellement sur la protéine qui s'accumulerait au sein du tissu dermique en raison d'une diminution de sa dégradation, soit par une augmentation de synthèse des ARNm couplée à une diminution de leur durée de vie.

Nous nous sommes intéressés à la synthèse des ARNm des SLRPs des fibroblastes dermiques humains issus de trois classes d'âge. Une étude comparable avait été réalisée que par Carrino et coll., mais sur un nombre restreint de lignées (seulement 4 lignées de cellules issues de patients d'âge différents) (Carrino et coll. 2000) alors que l'on sait qu'il subsiste une grande hétérogénéité entre les donneurs. Les principales études précédentes ont utilisé comme modèle des cellules vieillis par repiquages *in vitro* (modèle de Hayflick) qui représente un modèle de vieillissement non physiologique et controversé. Des études ont également été effectuées par des dosages portant directement sur la peau, ce qui implique des problèmes d'extractabilité des protéines.

Dans notre étude, la grande hétérogénéité des échantillons présente un problème majeur, nos échantillons proviennent de sites anatomiques différents, comme par exemple du prépuce, du sein, de la peau abdominale ou même de la paupière, et de plus, ils sont issus de donneurs de sexes différents. Ainsi, il est possible que les différences observées dans l'expression des taux d'ARNm des SLRPs soient spécifiques non pas de l'âge, mais de la localisation anatomique et du sexe des différents échantillons. En effet, une grande partie des échantillons de la classe des sujets âgés proviennent de donneurs de sexe féminin qui sont tous ménopausées. La difficulté de cette étude repose donc sur l'impossibilité de se procurer un grand nombre d'échantillons de peaux humaines appartenant à différents groupes d'âge et présentant une localisation identique. Nous n'avons cependant pas observé de biais systématique entre les différents sites de prélèvements cutanés ni entre les différents groupes de donneurs.

Nos résultats sont confortés par le fait que les données obtenues dans notre modèle d'étude pour la décorine et le biglycane sont semblables à celles obtenues dans d'autres modèles comme celui de Hayflick. En ce qui concerne le lumicanne, une étude menée en collaboration avec le Dr

Contet-Audonneau (LS&RD, Pulnoy, Nancy) nous a permis de confirmer par immunohistochimie une diminution du lumicanne au sein de la peau issue des sujets âgés (voir article n°2 de l'annexe).

L'ensemble des données obtenues lors de cette étude suggère qu'il existe bien des changements importants en fonction de l'âge dans l'expression des petits protéoglycannes riches en leucine, par les fibroblastes dermiques humains. Les propriétés physiologiques de la peau changent fortement en fonction de l'âge (Daly et coll. 1979) avec notamment des changements dans l'association macromolécules-eau et dans la morphologie des fibres de collagènes.

Les modifications physiques et physiologiques observées au sein de la peau sont, comme nous venons de le dire, provoquées à la fois par des altérations liées au processus intrinsèque de vieillissement mais aussi par l'intervention d'autres facteurs, comme par exemple les rayonnements ultraviolets. Une exposition chronique excessive de la peau humaine à des radiations solaires entraîne en effet des changements dans sa composition, comme une baisse du taux de collagène de type I, une accumulation du matériel élastique, une augmentation du marquage des glycosaminoglycannes et une augmentation de l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMPs) de type 1, 2 et 3. Ceci entraîne par la suite une dégradation plus rapide du derme (Herrmann et coll. 1993). De nombreuses études ont démontré qu'une exposition chronique d'UV altère le métabolisme des protéoglycannes, entraînant des changements à la fois qualitatifs et quantitatifs. Récemment Podskochoy et coll. ont observé que le taux de biglycane augmentait après une exposition aux UV et que ce phénomène pourrait intervenir dans le processus de réparation tissulaire (Podskochoy et coll. 2004). Par ailleurs, Bernstein et coll. ont démontré que le taux d'ARNm de décorine était diminué au sein de la peau photo-âgée (Bernstein et coll. 1995).

Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des rayonnements UV sur l'expression du taux d'ARNm du lumicanne au sein de fibroblastes dermiques humains. Pour cette recherche, nous avons étudié les effets des UVA et non des UVB qui ne présentent pas un indice de pénétration suffisant pour avoir des effets majeurs sur les cellules dermiques de type fibroblastique.

Nous avons utilisé comme modèle d'étude des fibroblastes dermiques. Nous les avons exposés pendant 30 min à température ambiante à un rayonnement UVA, à raison de 7,5 joules par cm². L'analyse par Northern-blot a montré une diminution de l'expression de 15% à 60% du taux d'ARNm de lumicanne dans les trois lignées de fibroblastes dermiques étudiées et dans la lignée de cellules fibroblastiques embryonnaires pulmonaires humaines (MRC5). Ce résultat a été confirmé par une étude en Western-blot où nous avons observé une diminution de la synthèse de la protéine

du lumicanne. De même, l'équipe de Tasheva et coll. a mis en évidence, par la technique de RT-PCR, une diminution de l'expression du gène du lumicanne par des kératocytes humains après une exposition aux UVC. Les auteurs expliquent ce résultat par la présence dans le promoteur du gène du lumicanne d'une moitié de site de liaison p53, comme celui présent dans le promoteur du gène du mimecanne qui diminue l'expression de celui-ci lors d'une exposition aux UVC (Tasheva et coll. 2003).

L'ensemble des résultats précédemment obtenus nous laisse supposer que la diminution de l'expression des ARNm de lumicanne en fonction de l'âge et après une exposition chronique aux UV entraînerait une altération majeure du tissu dermique au cours du vieillissement. Nous avons donc recherché des effecteurs capables de réguler positivement la synthèse du lumicanne et susceptibles de palier à la diminution de ce dernier au cours du processus de vieillissement ou lors des expositions prolongées au soleil.

Ne disposant que de peu de données concernant la régulation du gène du lumicanne, nous avons recherché dans la littérature les facteurs de croissance capables de réguler positivement ou non la synthèse des membres de la famille des SLRPs.

Des travaux de Sonal ont démontré un effet stimulateur de l'IGF-1 sur l'expression de la décorine et du biglycane dans des chondrocytes articulaires en culture, avec un effet maximal compris entre 10 et 100 ng/ml (Sonal 2001). La suite de ce travail a démontré que le b-FGF (ou FGF-2) ne présentait pas d'effet sur l'expression de biglycane, mais présentait un effet inhibiteur sur la synthèse de décorine (Sonal 2001). L'effet stimulateur de l'IGF-1 sur la régulation du gène de la décorine a été confirmé dans un modèle de cellules d'ostéoblastes par l'étude de D'Avis et coll. (D'Avis P et coll. 1997). Enfin, l'étude de Dodge et coll. a mis en évidence un effet négatif du TNF- α sur l'expression de biglycane et un effet positif sur celle de la décorine dans des cultures de chondrocytes humains (Dodge et coll. 1998). Le travail de Tufvesson et coll. a montré un effet régulateur positif sur ces deux SLRPs dans un modèle de cellules pulmonaires humaines, et mis en évidence une interaction directe de ce facteur de croissance avec le cœur protéique de la décorine et du biglycane (Tufvesson et coll. 2000; Tufvesson et coll. 2002).

Dans notre étude, nous avons testé trois facteurs de croissance que sont le b-FGF, l'IGF-1 et le TNF- α sur la synthèse de lumicanne dans un modèle de cellules fibroblastiques humaines embryonnaires (MRC5). Ainsi, nous avons mis en évidence dans un premier temps un effet inhibiteur du b-FGF sur la synthèse du taux d'ARNm de lumicanne pour une dose de 50 ng/ml.

Ceci laisse penser que le lumicanne serait régulé de la même façon que la décorine. Dans un deuxième temps, nous avons constaté que l'IGF-1 présentait un effet stimulateur sur l'expression du gène du lumicanne, effet identique à celui retrouvé sur l'expression de la décorine et du biglycane. Enfin, nous avons montré que le TNF- α qui, comme nous l'avons vu précédemment, possède un pouvoir stimulateur sur la synthèse de décorine et inhibiteur de la synthèse de biglycane, exerce sur l'expression du gène du lumicanne un effet stimulateur pour une dose de 10 ng/ml et inhibiteur pour une dose de 100 ng/ml.

L'effet retrouvé avec l'IGF-1 nous est apparu très intéressant. Nous avons donc testé cet effecteur à des doses croissantes (de 0 à 100 ng/ml) et nous avons observé un effet stimulateur dose-dépendant à des concentrations d'IGF-1 comprises entre 0 et 10 ng/ml ; pour des doses plus importantes, on peut voir une diminution de l'effet stimulant pour revenir à un taux basal à 100 ng/ml d'IGF-1.

On peut envisager qu'IGF-1 ou un facteur stimulant sa production pourrait rétablir une synthèse de lumicanne normale chez les sujets âgés. Il faut cependant remarquer que les effets de l'IGF-1 sur la synthèse des protéoglycannes semblent atténués chez les chondrocytes de donneurs âgés par rapport à ceux issus de sujets jeunes (D'Avis P et coll. 1997).

II Lumicanne et développement tumoral

Au cours de la croissance de la tumeur primaire ou lors de l'établissement du caractère métastatique, la matrice extracellulaire présente un remodelage permanent caractérisé par d'importants processus de synthèses et dégradations. Les protéoglycannes sont des constituants importants de la matrice extracellulaire et paraissent capables de moduler la croissance des cellules cancéreuses et leur invasion (Iozzo 1985). Ainsi, le syndécanne-1 induit la prolifération des cellules cancéreuses mammaires humaines (Maeda et coll. 2004), alors que le syndécanne-2, exprimé par les cellules colorectales, induit la différenciation et la migration des cellules (Contreras et coll. 2001). Au cours du développement tumoral, on trouve aussi des altérations au niveau de l'expression des glycosaminoglycannes, comme par exemple l'augmentation des chaînes de chondroïtine-sulfate (Sampaio et coll. 1977).

La morphologie des cellules directement adjacentes au carcinome peut être influencée par des facteurs de croissances paracrines dérivant de la tumeur et peut aussi entraîner des altérations moléculaires (Deng et coll. 1996) qui peuvent influencer localement l'expression de gènes. Ainsi, des études sur le cancer du sein, par immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre la chondroïtine-sulfate et le dermatanne-sulfate, ont montré une diminution du marquage de la décorine autour de la tumeur en comparaison avec un tissu stromal sain (Nara et coll. 1997). De plus, la décorine a été montrée comme pouvant jouer un rôle important dans le processus de tumorigénèse. En effet, on a trouvé une diminution de sa synthèse dans de nombreux types de cellules tumorales (Iozzo et coll. 1993), et une augmentation dans le stroma du cancer de colon (Adany et coll. 1990).

La première étude s'intéressant à l'influence de l'expression du lumicanne lors du développement tumoral date de 1998. Dans de cette étude, Leygue et coll. se sont intéressés à l'expression de ce protéoglycanne sous sa forme glycoprotéique dans les tissus sains et tumoraux mammaires. Ils ont ainsi démontré qu'un taux d'expression du lumicanne plus important était associé à un mauvais pronostic tumoral (Leygue et coll. 1998). Lors d'une autre étude, ils ont pu constater une augmentation du taux de lumicanne et une diminution du taux de décorine. Le lumicanne et le décorine apparaissent donc inversement régulés dans la tumorigénèse mammaire (Leygue et coll. 2000).

Pour expliquer cela, Leygue s'appuie sur l'étude de Funderburgh et coll. (Funderburgh et coll. 1997) qui ont montré que le lumicanne sous sa forme glycoprotéique se fixait plus facilement aux macrophages et augmentait leur étalement. Ainsi, le lumicanne pourrait favoriser l'adhésion et la localisation des macrophages au sein de la tumeur. Cette augmentation des macrophages pourrait ainsi influencer l'angiogénèse et la production de cytokines favorable au processus tumoral.

Par la suite, Lu et coll. ont montré que le lumicanne sous sa forme non sulfatée, était faiblement exprimé dans le tissu colorectal sain mais que cette expression était fortement augmentée dans les fibroblastes adjacents à la tumeur. Ils concluaient que l'accumulation de lumicanne pourrait contribuer à la croissance des cellules squameuses tumorales ou à l'invasion du tissu stromal adjacent (Lu et coll. 2002). Cette hypothèse a été reprise par Naito et coll., qui ont mis en évidence une expression de lumicanne toujours sous sa forme glycoprotéique, au niveau des tissus tumoraux et non dans les tissus sains. Cette expression est principalement localisée en périphérie de la tumeur (Naito et coll. 2002).

Très récemment, les travaux menés séparément par Ischiwata et coll. ainsi que par Vij et coll. ont mis en évidence une augmentation de la croissance cellulaire en absence de lumicanne (Ischiwata et coll. 2004; Vij et coll. 2004). Ceci nous fait penser que le lumicanne ne jouerait pas un rôle « pro-tumoral » comme l'avaient suggéré les premières études mais en fait un rôle « anti-tumoral », comme la décorine et le biglycane.

L'ensemble de ces données nous montre qu'il serait intéressant de connaître le rôle apporté par les modifications d'expressions des SLRPs au cours de la phase précoce du développement tumoral. Certaines données suggèrent que l'induction du lumicanne et la baisse d'expression de la décorine dans le stroma des fibroblastes entourant une tumeur invasive, pourraient induire la désorganisation du réseau de collagène autour de la tumeur, en favorisant la localisation des macrophages (Funderburgh et coll. 1997) et pourraient également inhiber la croissance des cellules épithéliales cancéreuses à travers une augmentation des facteurs de croissance inhibiteurs de la prolifération des cellules épithéliales (Santra et coll. 1995). Ces altérations peuvent représenter des points de contrôle négatif, lors de la phase précoce du développement tumoral. Ainsi, l'augmentation de l'expression des ARNm du lumicanne serait soit la réponse à une augmentation locale de la protéolyse, soit due à une altération du dépôt de la protéine qui entraînerait une désorganisation du réseau collagénique du stroma tumoral, et pourrait ainsi faciliter l'invasion des cellules tumorales. Ces effets s'exerceraient simultanément à une baisse de l'expression de la

décorine et à un effet sur la croissance des cellules épithéliales cancéreuses à travers une répression de p21.

Pour étudier les effets du lumicanne sur l'invasion tumorale, nous avons utilisé comme modèle d'étude des cellules de mélanome de souris B16F1. Les mélanomes sont des tumeurs malignes cutanées développées à partir des mélanocytes transformés de la couche basale de l'épiderme et représentent la première cause de mortalité des cancers cutanés. Nous avons choisi ces cellules comme modèle d'étude pour plusieurs raisons : un des facteurs de risques de ce cancer cutané est en tout premier lieu un facteur externe, la sur-exposition au soleil qui, comme nous l'avons démontré précédemment, est un répresseur de la synthèse du lumicanne. Cependant, d'après l'étude de McLeod (McLeod GR 1985), les sujets âgés présenteraient un risque plus élevé de développer n'importe quel type de mélanome. La seule exception retrouvée dans cette étude concerne le mélanome à extension superficielle, qui présente chez la femme un pic d'incidence dans la tranche d'âge de 40 à 49 ans, alors que chez les hommes, le pic d'incidence est observé dans le groupe des 60 à 69 ans. Le mélanome sur mélanose de Dubreuilh et le mélanome acro-lentigineux (Tournillac et coll. 1999) touchent principalement les sujets âgés. De plus, le développement du mélanome apparaît différent selon l'âge ; ainsi dans l'étude de Loggie (Loggie et coll. 1991), qui compare des sujets de plus de 70 ans (âgés) par rapport à des sujets de 35 ans (jeunes), il a été observé que la moyenne de l'épaisseur du mélanome (index de gravité) passe de 3,95 mm dans le groupe des sujets âgés à 2,02 mm dans le groupe des sujets jeunes. Donc les niveaux d'invasion de Clark sont plus profonds chez le sujet âgé. Les niveaux II et III sont plus fréquents chez le sujet jeune et les niveaux IV et surtout V (de mauvais pronostic) plus fréquents chez le sujet âgé.

Les résultats que nous avons obtenus (figure 24) montrent que certaines lignées de cellules de mélanome (M3Da et HT144) sont capable d'exprimer le lumicanne. D'autres au contraire, n'en expriment pas (B16F1 et B16F10). Le lumicanne observé est sous forme de glycoprotéine. Il va être sécrété par la cellule et, comme de nombreuses macromolécules matricielles, être capable de moduler et contrôler l'activité cellulaire dans la plupart des processus physiopathologiques.

Les cellules B16F1, membres de la famille (B16) dont chaque membre possède des caractéristiques différentes en matière d'invasion. La souche B16F1 est réputée peu invasive, mais nos études sur des filtres recouverts de Matrigel® montrent que ces cellules sont tout à fait capables de traverser une membrane basale reconstituée *in vitro*. L'utilisation de cellules de souris nous a permis une plus grande facilité d'étude dans un modèle *in vivo* puisqu'il existe des souris C57BL6. L'utilisation de cellules tumorales humaines aurait nécessité des souris athymiques.

Comme nous l'avons montré précédemment, la lignée de cellules B16F1 n'expriment pas de lumicanne. Nous avons donc testé l'effet que produit sur cette lignée une expression de lumicanne après transfection stable par un plasmide d'expression (pcDNA3) contenant l'intégralité de l'ADNc du lumicanne humain. Ainsi, les cellules sauvages B16F1 nous ont servi de contrôle négatif par rapport aux cellules exprimant du lumicanne. Afin de vérifier si le plasmide d'expression n'intervient pas directement dans la morphogénèse cellulaire, nous avons transfecté ces cellules B16F1 avec un plasmide d'expression pcDNA3 vide.

Au total, nous avons testé plus de 40 clones de cellules B16F1 transfectées par le plasmide pcDNA3-HLum par la technique de Dot-blot, ce qui nous a permis de détecter une douzaine de clones exprimant le lumicanne. L'analyse par Western-blot nous permet de conclure que les cellules B16F1 transfectées sécrètent du lumicanne dans le milieu de culture. L'absence de modification de la migration électrophorétique après digestion par la kératanase II indique l'absence de chaîne de kératane-sulfate. Au contraire, la migration accrue après digestion par la N-glycosidase F indique que le lumicanne sécrété par les cellules B16F1 représente la forme glycoprotéique de 57 kDa. Ces résultats correspondent à la forme habituelle du lumicanne des cellules cancéreuses au sein d'une tumeur.

Nous avons pu observer dans un premier temps que le lumicanne exprimé par les cellules B16F1 ne semble pas altérer leur prolifération dépendante de l'adhésion ainsi que leur adhésion et étalement sur un tapis de collagène de type I ou de Matrigel®. Notons que la décorine est capable de moduler négativement la prolifération cellulaire et positivement l'étalement de cellules CHO (Chinese hamster ovary) (Yamaguchi et coll. 1990), alors que des cellules ostéogéniques invalidées en biglycane présentent une baisse de la prolifération cellulaire (Chen et coll. 2002). Les résultats obtenus avec le lumicanne, ne correspondent pas à ceux observés dans la littérature, puisque il a été signalé une inhibition de la prolifération cellulaire de cellules (HEK) 293 et de kératocytes de souris en présence de lumicanne (Ishiwata et coll. 2004; Vij et coll. 2004). Les différences que nous observons dans notre modèle d'étude pourraient résulter d'une trop faible expression du lumicanne

par nos cellules. Ainsi, en cinq jours de culture, la quantité de lumicanne sécrétée par les cellules B16F1 serait insuffisante pour pouvoir observer une diminution significative de la prolifération cellulaire. De même, cette faible expression de lumicanne pourrait ne pas altérer l'adhésion qui s'effectue à des temps très courts.

Par la suite, nous avons pu constater que les quatre clones de cellules B16F1 exprimant du lumicanne que nous avons étudiées présentent une inhibition de la croissance indépendante de l'adhésion dans un modèle de culture en agar mou, par rapport aux cellules n'exprimant pas le lumicanne. Nous avons pu aussi observer que ces clones présentent une diminution de plus de 70% de leur pouvoir migratoire et invasif dans un modèle de filtre Transwell. Pour la décorine, également membre des SLRPs, on a rapporté une action à distance sur les cellules cancéreuses, avec une inhibition de leur croissance et de leur migration (Tralhao et coll. 2003). D'après nos résultats, on constate un effet majeur du lumicanne lorsque les cellules sont cultivées dans un modèle de culture tridimensionnelle.

Pour vérifier que les résultats précédemment obtenus sur la migration et les propriétés invasives des cellules B16F1 étaient bien dus à l'expression par ceux-ci de lumicanne, au sein du laboratoire des cellules sauvages (B16F1) on été cultivé sur des filtres de Transwell® recouverts par un tapis de lumicanne recombinant ou d'un mélange de lumicanne recombinant avec du Matrigel®. Nous avons alors pu constater au bout de 18 heures de culture, un résultat similaire à celui obtenu avec les cellules transfectées par le lumicanne. Ceci nous permet de conclure que le lumicanne est bien responsable de l'altération du pouvoir migratoire et invasif des cellules B16F1. La protéine recombinante utilisée pour ces expériences correspondait à la partie protéique du lumicanne (37 kDa), ce qui nous permet de dire que la majorité des effets observés précédemment est due non pas à la partie glycanique mais bien à la partie protéique du lumicanne.

Dans la suite de ce travail, nous avons souhaité savoir si les effets du lumicanne sécrété par les cellules de mélanome de souris observés *in vitro* pouvaient être reproduits *in vivo*. Nous avons alors utilisé comme modèle d'étude, l'injection sous cutanée de cellules de mélanome B16F1 dans des souris syngéniques. L'expérience a consisté à injecter 100 000 cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide (pcDNA3) ou contenant l'ADNc du lumicanne humain (HLum) dans le flanc de souris syngénique C57BL6. Après 14 jours, les souris ont été sacrifiées et le volume tumoral mesuré. Nous avons observé une très forte diminution du volume tumoral qui passe de 0,6 à 0,1 cm³, ce qui est en concordance avec l'effet inhibiteur observé *in vitro* lors de la croissance de

cellules B16F1 dans de l'agar mou. On peut donc conclure que le lumicanne est capable d'induire l'inhibition de la croissance tumorale. Dans d'autres expériences, nous avons observé l'effet du lumicanne sur le potentiel métastatique des cellules B16F1 en injectant des cellules dans la veine de la queue des souris. Nous avons observé alors après 14 jours une forte différence dans le nombre de métastases développées à la surface du poumon. Ces résultats nous permettent de conclure que le lumicanne peut diminuer le volume tumoral et est aussi capable d'agir sur le potentiel métastatique de ces cellules.

L'effet inhibiteur du lumicanne sur la croissance tumorale peut s'expliquer par un certain nombre de facteurs. Lors de notre étude nous avons étudié l'effet de celui-ci sur trois paramètres qui sont la régulation du cycle cellulaire, l'induction du phénomène d'apoptose dans les cellules cancéreuses et la régulation de l'expression des métallo-protéinases matricielles. En effet, il a été démontré que le biglycane était capable de bloquer la prolifération cellulaire de cellules cancéreuses de pancréas en phase G1 par induction de la protéine p27 et de la cycline A (Weber et coll. 2001). De même, la décorine interfère dans le cycle cellulaire en bloquant celui-ci en phase G1 via l'induction de p21^{WAF1/CIP1} qui est un inhibiteur des cyclines kinases (Santra et coll. 1995). Pour répondre à cette hypothèse, nous avons observé par immunohistochimie sur des coupes de tumeurs exprimant ou non le lumicanne l'expression d'une protéine régulatrice du cycle cellulaire qui est la cycline D1. Nous avons pu montrer par comptage des noyaux marqués une diminution significative de plus de 20% du nombre de noyaux exprimant la cycline D1 dans les tumeurs exprimant le lumicanne. Ce résultat laisse à penser que le lumicanne, comme la décorine et le biglycane, serait un modulateur du cycle cellulaire, mais cet effet ne peut être responsable en totalité de l'inhibition de la croissance tumorale observée (car l'inhibition de la cycline D1 est de seulement 20%). L'action du lumicanne est supportée par l'étude de Vij et coll. qui ont mis en évidence la régulation du cycle cellulaire par le lumicanne, avec une diminution de l'expression de Ki67, (Vij et coll. 2004), qui est un marqueur spécifique de la phase G1 (Zieske et coll. 2001) et de PCNA (proliferating cell nuclear antigen) qui intervient dans la réplication de l'ADN (Celis et coll. 1987). De plus, ces auteurs ont constaté une augmentation des cyclines A, D1 et E dans les cellules déficientes en lumicanne, qui serait provoquée par une baisse de l'expression de P21^{WAF1/CIP1} (Harper et coll. 1993) et par une augmentation de l'expression de MDM2, qui est une E3-ubiquitine ligase et un régulateur négatif de p53 (par blocage de l'activité transcriptionnelle de p53 et induction de la dégradation médiée par le protéasome).

Nous avons ensuite étudié l'effet du lumicanne sur le processus d'apoptose. En effet, une étude de Chen et coll. a montré que ce processus était induit chez des souris déficientes en biglycane (Chen et coll. 2002). De même, une étude de Schönherr et coll. a montré que la présence de décorine, soit sécrétée par des fibroblastes, soit produite par des cellules endothéliales transfectées par un adénovirus exprimant la décorine, inhibe l'apoptose de ces cellules de 20 à 60% dans un lattis de collagène à 12 jours de culture (Schönherr et coll. 1999). Au contraire, Tralhao et coll. ont montré une induction de l'apoptose des cellules cancéreuses par l'expression de décorine à l'aide d'un adénovirus (Tralhao et coll. 2003).

Lors de notre étude, nous avons démontré *in vivo*, dans des extraits de tumeurs, que la présence de lumicanne induisait l'expression de protéines dites pro-apoptotiques comme p53 et Bax, mais n'influçait pas l'expression de la caspase 3 et de PARP clivé. Nous avons pu observer après coloration au Hoechst-3342 de coupes de tumeur exprimant ou non du lumicanne, des condensations chromatiniennes intracellulaires caractéristiques de l'apoptose. La présence de cellules en apoptose également dans les tumeurs témoins ne nous a toutefois pas permis de conclure dans ces expériences *in vivo* quant à l'effet du lumicanne sur l'induction de l'apoptose. Pour résoudre cette question, nous avons donc étudié l'effet du lumicanne sur le processus d'apoptose dans des cultures de cellules transfectées. Ainsi, nous avons pu observer après coloration au Hoechst 3342, la présence de corps apoptotique dans les cellules traitées avec du lumicanne recombinant, alors que les cellules témoin (B16F1) ne présentaient aucun signe d'apoptose. L'analyse par Western-blot du lysat de ces cellules nous a permis de voir une induction de p53, de Bax et de la caspase 9 et une diminution de la caspase 3 non clivée ainsi que de PARP clivé (figure 50). Nos résultats sont confirmés par une étude très récente de Vij et coll., mettant en évidence une augmentation de l'activité des caspases 3 et 7 dans les fibroblastes embryonnaires exprimant du lumicanne en comparaison avec ces mêmes cellules déficientes en lumicanne (Vij et coll. 2004). Ces auteurs ont également mis en évidence une voie d'activation de l'apoptose qui passerait par l'induction des récepteurs Fas (CD95) par leur ligand FasL (CD95L) mécanisme qui, d'après Griffith serait une voie majeure de l'apoptose (Griffith et coll. 1995). Nos résultats tendraient à montrer que cette induction passerait par la voie mitochondriale (figure 50). Car nous pouvons voir par notre analyse en Western-blot que l'expression de Bax et de la caspase 9 sont induite. Il est tout à fait possible que l'induction se fasse par ces deux voies et, avant de conclure, il nous faudrait étudier l'activité de la caspase 8 ainsi que l'expression de la protéine t-Bid pour voir s'il existe une relation directe entre les deux.

La troisième hypothèse que nous avons étudiée concerne la régulation des MMPs par le lumicanne. En effet, il est connu que les différentes étapes de la progression tumorale sont étroitement liées à la dégradation de la matrice extracellulaire par différentes cascades protéolytiques. Dans la progression du mélanome, on trouve deux classes de protéinases qui peuvent jouer un rôle crucial, la famille des MMPs et le système d'activation de la plasmine (uPA et tPA). Après la dégradation de la membrane basale par le biais de protéases, les cellules peuvent se mouvoir dans la matrice extracellulaire modifiée par la protéolyse. Ce déplacement cellulaire est un événement clef du processus métastatique et une corrélation entre motilité cellulaire et potentiel métastatique a été démontrée pour plusieurs types cellulaires (Raz et coll. 1989).

Nous avons pu constater que les cellules de mélanome de souris (B16F1) sécrètent majoritairement de la pro-MMP-2 et plus faiblement de la pro-MMP-9. Ces résultats corroborent ceux de la littérature qui montrent que les cellules de mélanomes sécrètent majoritairement ces deux types de MMPs (Hofmann et coll. 2000). Nous avons observé par la suite que l'expression de lumicanne après transfection ne modifie pas la sécrétion de la MMP-2 et de la MMP-9 dans le milieu de culture des cellules B16F1. Cependant, comme nous l'avons dit précédemment, il est possible que la quantité de lumicanne sécrétée par les cellules soit insuffisante pour moduler l'expression des MMPs. Nous avons donc cultivé les cellules B16F1 sauvages sur un tapis de lumicanne recombinant avec des doses croissantes allant de 0 à 10 µg/ml. Nous avons alors constaté que la sécrétion de pro-MMP-2 et de Pro-MMP-9 n'est pas altérée en présence de revêtement de lumicanne. Cela laisse supposer soit que le lumicanne n'interviendrait pas directement dans la régulation des MMPs, soit que son action, si elle existe, pourrait nécessiter la présence des glycanes, absents sur la protéine recombinante. Cette dernière hypothèse apparaît toutefois peu probable, car comme nous l'avons dit dans l'introduction, un autre SLRP, la décorine, est capable de réguler positivement l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9, sans l'intervention de sa chaîne de glycosaminoglycannes (Huttenlocher et coll. 1996). On peut aussi supposer que l'action du lumicanne ne se fait pas directement sur la synthèse des MMPs, mais en modulant l'expression et l'activité de certains facteurs de croissance comme par exemple le TGF-β1 et l'IL1-β. Ceux-ci sont en effet régulés positivement par la décorine. Ces phénomènes expliqueraient les effets modulateurs de la décorine sur la synthèse de MMP-2, MMP-1 et MMP-3 (Al Haj Zen et coll. 2003).

Afin de valider cette dernière hypothèse, nous avons étudié l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 au sein et en périphérie des tumeurs exprimant ou non du lumicanne. Nous avons observé au centre de la tumeur une absence totale de pro-MMP-2 et de pro-MMP-9 pour les tumeurs n'exprimant pas de lumicanne (B16F1 et pcDNA3) et la présence de pro-MMP-2 en très faible quantité dans les tumeurs exprimant du lumicanne. Ce résultat peut s'expliquer par la différence de croissance qui existe entre ces deux types de tumeurs : les tumeurs n'exprimant pas de lumicanne présentent un volume tumoral très important et donc une zone centrale nécrotique où toute expression de MMPs est fortement diminuée voire totalement abolie, alors que les tumeurs exprimant du lumicanne présentent un volume tumoral plus petit et donc une zone nécrotique moins développée.

En périphérie tumorale, on constate que l'expression des MMPs est fortement induite ; ainsi les tumeurs témoins obtenues avec les cellules B16F1 sauvages et pcDNA3 expriment de la pro-MMP-2 et de la MMP-2 active, alors que les tumeurs exprimant du lumicanne présentent une expression de pro-MMP-2 et de MMP-2 induite par rapport aux témoins et surtout une importante expression de pro-MMP-9. D'après ces résultats, on peut supposer que le lumicanne serait un activateur de la synthèse de MMP-2 et de la MMP-9, ce qui apparaît comme un facteur « pro-tumoral » plutôt que « anti-tumoral ». Pour comprendre le mode de régulation du lumicanne sur l'expression des MMPs, il faut se rappeler l'étude de Funderburgh et coll. (Funderburgh et coll. 1997) mettant en évidence une augmentation de l'adhésion des macrophages sur un tapis de lumicanne recombinant. On peut supposer que comme la concentration de lumicanne autour de la tumeur issue des cellules transfectées est plus importante que dans celle issue des cellules sauvages, il pourrait y avoir un nombre plus important de cellules intervenant dans le processus inflammatoire. Cela expliquerait la présence de la MMP-9, qui est la MMP sécrétée majoritairement par les cellules inflammatoires comme les macrophages et les monocytes. L'augmentation de la synthèse et de l'activation de la pro-MMP-2 pourrait quant à elle s'expliquer par une synthèse accrue de facteurs de croissance comme le TNF- α , qui augmenteraient son expression.

Pour terminer, nous avons observé l'expression des deux MMPs (MMP-2 et -9) dans des zones « saines » périphériques à la tumeur, afin de voir si le lumicanne est capable de réguler à distance la synthèse de la MMP-2 et de la MMP-9. Pour les tumeurs témoin (B16F1 et pcDNA3) une expression de la MMP-2, ainsi qu'une faible expression de MMP-9 ont été trouvées. Dans les tumeurs exprimant du lumicanne, on remarque une absence totale d'expression de la MMP-2 et de la MMP-9. Pour expliquer cela, nous proposons comme hypothèse que le lumicanne serait un

régulateur puissant des facteurs de croissance par exemple en séquestrant le TNF- α et pourrait donc inhiber totalement l'expression des MMPs par un mécanisme indirect.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de la première partie de notre étude, nous avons mis en évidence la régulation de la synthèse des SLRPs au sein des cellules fibroblastiques du derme humain au cours du vieillissement et lors d'une exposition aux ultraviolets. Ainsi, nous avons montré une augmentation de l'expression de la décorine, une diminution significative du lumicanne et aucune modification du biglycane dans le derme des sujets âgés. L'exposition de ces mêmes fibroblastes aux UVA démontre une régulation négative de la synthèse de l'ARNm et de la protéine cœur du lumicanne.

L'ensemble de ces résultats nous confirme que la diminution du lumicanne avec l'âge pourrait être un des facteurs du vieillissement dermique.

Pour contrer cette perte d'expression du lumicanne au cours du vieillissement, nous avons cherché un effecteur capable de stimuler sa synthèse. Ainsi, nous avons mis en évidence l'effet stimulateur dose-dépendant de l'IGF-1.

La deuxième partie de notre travail s'est intéressée à l'effet du lumicanne présent au sein de la matrice extracellulaire lors du processus de développement tumoral. Nous avons utilisé comme modèle d'étude, des cellules de mélanome de souris (B16F1) et montré que l'expression de lumicanne par celles-ci entraînait une diminution de la prolifération ancrage indépendante, du pouvoir migratoire et invasif tout en n'altérant pas l'adhésion et l'étalement de ces cellules. L'injection de ces cellules dans un modèle de souris syngéniques C57BL6, montre que le lumicanne diminue fortement la croissance tumorale ainsi que le pouvoir métastatique.

Pour expliquer ce phénomène d'inhibition de la progression du mélanome, nous avons mis en évidence un contrôle du lumicanne sur le cycle cellulaire par le biais de la cycline D1, sur l'apoptose par l'induction de la voie mitochondriale et sur l'expression et l'activation de métalloprotéinases matricielles.

Les modifications moléculaires de la matrice extracellulaire changent ses propriétés physiques et peuvent être associées au développement des tumeurs malignes. Les modifications des SLRPs paraissent pouvoir jouer un rôle majeur dans l'acquisition de ces propriétés.

Pour savoir comment intervient le lumicanne dans la régulation de la croissance tumorale, il nous reste à étudier les effets possibles de cette molécule sur la régulation des facteurs de croissance. Ceux-ci, comme nous l'avons vu précédemment, sont des partenaires indispensables à

de nombreux processus physiologiques ou pathologiques. Ils sont impliqués en particulier dans l'embryogenèse, la réparation tissulaire, l'angiogénèse et l'apoptose. Ils sont également présents lors de toutes les étapes du processus tumoral en contrôlant la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion de nombreuses cellules tumorales.

Il existe un certain nombre de facteurs de croissance pouvant expliquer ces différentes régulations. On peut tout particulièrement s'intéresser à l'IGF-1 et au TGF- β . L'expression de l'IGF-1 a été identifiée comme un facteur de risque du cancer du sein (Pollak 2000). De plus, IGF-1 est capable de réguler positivement la synthèse du lumicanne, comme nous l'avons vu précédemment, avec une influence plus importante chez les cellules issues de patients jeunes (D'Avis P et coll. 1997). A cela, ajoutons que le lumicanne et l'IGF-1 sont souvent induits lors de pathologies bénignes dans un certain nombre de tissus (Luo et coll. 2002). De même, le taux de TGF- β est fortement augmenté dans les mélanomes avec métastases (Krasagakis et coll. 1998). Par son action immunosuppressive, le TGF- β facilite le développement de la tumeur (Bizik et coll. 1996), potentialise *in vivo* l'action du b-FGF sur la croissance tumorale (Hofer et coll. 1998) et l'expression à la surface de la cellule de CD44, un protéoglycane à chondroïtine-sulfate qui potentialise la migration et l'invasion des cellules de mélanome (Faassen et coll. 1993).

L'effet des SLRPS sur la croissance et l'invasion pourrait s'expliquer par la captation et la séquestration des facteurs de croissance comme c'est le cas de l'héparanne-sulfate qui peut lier le b-FGF (Sakaguchi et coll. 1991) ou la décorine, le biglycane et le lumicanne qui peuvent lier le TGF- β et le TNF- α (Tufvesson et coll. 2002; Vij et coll. 2004). Ces facteurs de croissance stockés dans la matrice extracellulaire pourraient servir de réserve pour les cellules. La séquestration par les SLRPs pourrait aussi protéger ces facteurs de croissance d'une dégradation protéolytique.

Pour compléter l'étude sur la régulation des MMPs par le lumicanne, il nous faudra par la suite étudier si le lumicanne est capable de réguler négativement, comme la décorine, les MMPs de type 1 et de type 3 (Al Haj Zen et coll. 2003), l'expression des TIMP1 et 2, des activateurs du plasminogène (uPA et tPA) et de leurs inhibiteurs (PAI-1 et 2), qui sont des protéases importantes du processus tumorale.

Par la suite, il nous faudra étudier plus précisément l'effet du lumicanne sur la régulation de l'angiogénèse. La néoangiogénèse est un phénomène important dans la régulation de processus physiologiques et pathologiques. Il a été montré sur des cellules endothéliales que la présence de décorine entraîne l'alignement de celles-ci pour former des pseudo-tubes creusés d'une cavité centrale (Schonherr et coll. 1999). Au sein du laboratoire, nous avons observé les vaisseaux

sanguins par une étude macroscopique sur des coupes des tumeurs issues de cellules B16F1 sauvages, transfectées par un vecteur vide ou contenant de l'ADNc du lumicanne, et cela ne nous a pas permis de déterminer, après une coloration spécifique, des différences visibles quant à la taille et au nombre des vaisseaux sanguins présents dans chaque champ d'observation. Cela nous indique que si le lumicanne intervenait dans le processus de néo-angiogénèse, il ne s'agirait certainement pas d'un phénomène majeur. Toutefois, un effet du lumicanne, mais dans de plus faible proportion, est tout à fait possible. Il nous reste donc à vérifier l'effet de celui-ci dans un modèle *in vitro* d'angiogénèse.

Un de nos derniers projets consiste à comprendre l'effet du lumicanne sur les propriétés structurales du stroma lors d'une réaction stromale aux abords d'une tumeur invasive. Dans la mesure où la décorine et le lumicanne ont un rôle important dans le maintien de la structure normale des fibres de collagène, leur réduction d'expression pourrait affaiblir la matrice et altérer les propriétés de cette barrière physique faces cellules tumorales infiltrantes (Peyrol et coll. 1997).

Pour terminer, il nous restera à déterminer, par rapport à la première partie de notre travail, s'il existe en plus d'une modulation de l'expression des SLRPS, une modification dans la taille ou la nature des chaînes de glycosaminoglycannes portées par la protéine cœur. Par rapport à la deuxième partie de notre étude, nous souhaitons préciser la partie protéique du lumicanne qui intervient dans la régulation de la prolifération et l'invasion des cellules tumorales, et étudier l'importance de sa structure dans l'espace pour les effets observés. Nous souhaitons également savoir si la partie glycanne intervient ou non dans ces effets. Et enfin, nous essayerons de mettre en évidence le ou les récepteurs du lumicanne dans sur les cellules de mélanome. Des travaux préliminaires suggèrent que ce récepteur pourrait être soit de type intégrine (Funderburgh et coll. 1997; Saika et coll. 2000), soit de type scavenger (Funderburgh et coll. 1997).

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS P., EYRE D.R. et MUIR H.

Biochemical aspects of development and ageing of human lumbar intervertebral discs.
Rheumatol Rehabil 1977; 16(1):22-9.

ADANY R., HEIMER R., CATERSON B., SORRELL J.M. et IOZZO R.V.

Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels.
J Biol Chem 1990; 265(19):11389-96.

ADATIA R., ALBINI A., CARLONE S., GIUNCIUGLIO D., BENELLI R., SANTI L., et coll.

Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan cDNA.
Ann Oncol 1997; 8(12):1257-61.

AIROLA K., KARONEN T., VAALAMO M., LEHTI K., LOHI J., KARINIEMI A.L., et coll.

Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas.
Br J Cancer 1999; 80(5-6):733-43.

AL HAJ ZEN A., LAFONT A., DURAND E., BRASSELET C., LEMARCHAND P., GODEAU G., et coll.

Effect of adenovirus-mediated overexpression of decorin on metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and cytokines secretion by human gingival fibroblasts.
Matrix Biol 2003; 22(3):251-8.

ANAISE D., STEINITZ R. et BEN HUR N.

Solar radiation: a possible etiological factor in malignant melanoma in Israel: a retrospective study (1960--1972).
Cancer 1978; 42(1):299-304.

ANTONSSON P., HEINEGARD D. et OLDBERG A.

Posttranslational modifications of fibromodulin.
J Biol Chem 1991; 266(25):16859-61.

AUSTIN B.A., COULON C., LIU C.Y., KAO W.W. et RADA J.A.

Altered collagen fibril formation in the sclera of lumican-deficient mice.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2002; 43(6):1695-701.

AUTIER P. et DORE J.F.

Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer.
Int J Cancer 1998; 77(4):533-7.

BANKS J., KREIDER J.W., BHAVANANDAN V.P. et DAVIDSON E.A.

Anionic polysaccharide production and tyrosinase activation in cultured human melanoma cells.
Cancer Res 1976; 36(2 Pt 1):424-31.

BARAMOVA E.N., COUCKE P., LEPRINCE P., DE PAUW-GILLET M.C., BASSLEER R. et FOIDART J.M.

Evaluation of matrix metalloproteinases and serine proteases activities in three B16 melanoma cell lines with distinct tumorigenic potential.
Anticancer Res 1994; 14(3A):841-6.

BARRETT A.J R.N.D., WOESSNER J.F.

Handbook of proteolytic enzymes.

In.

Ed. London: Academic Press 1998.

BARSALOU L.S., KANTOR G.J., DEISS D.M. et HALL C.E.

DNA repair in the genomic region containing the beta-actin gene in xeroderma pigmentosum complementation group C and normal human cells.
Mutat Res 1994; 315(1):43-54.

BARTOLD P.M., BOYD R.R. et PAGE R.C.

Proteoglycans synthesized by gingival fibroblasts derived from human donors of different ages.
J Cell Physiol 1986; 126(1):37-46.

BENTZ H., CHANG R.J., THOMPSON A.Y., GLASER C.B. et ROSEN D.M.

Amino acid sequence of bovine osteoinductive factor.
J Biol Chem 1990; 265(9):5024-9.

BERNERD F. et ASSELINEAU D.

UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging.
Cell Death Differ 1998; 5(9):792-802.

BERNFELD M., KOKENYESI R., KATO M., HINKES M.T., SPRING J., GALLO R.L., et coll.

Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans.
Annu Rev Cell Biol 1992; 8:365-93.

BERNSTEIN E.F., FISHER L.W., LI K., LEBARON R.G., TAN E.M. et UITTO J.

Differential expression of the versican and decorin genes in photoaged and sun-protected skin. Comparison by immunohistochemical and northern analyses.
Lab Invest 1995; 72(6):662-9.

BERTHEIM U. et HELLSTROM S.

The distribution of hyaluronan in human skin and mature, hypertrophic and keloid scars.
Br J Plast Surg 1994; 47(7):483-9.

BIANCO P., FISHER L.W., YOUNG M.F., TERMINE J.D. et ROBEY P.G.

Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues.
J Histochem Cytochem 1990; 38(11):1549-63.

BISSETT D.L., HANNON D.P. et ORR T.V.

Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin.

Photochem Photobiol 1989; 50(6):763-9.

BIZIK J., FELNEROVA D., GROFOVA M. et VAHERI A.

Active transforming growth factor-beta in human melanoma cell lines: no evidence for plasmin-related activation of latent TGF-beta.

J Cell Biochem 1996; 62(1):113-22.

BLOCHBERGER T.C., CORNUET P.K. et HASSELL J.R.

Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated.

J Biol Chem 1992; 267(29):20613-9.

BODE-LESNIEWSKA B., DOURS-ZIMMERMANN M.T., ODERMATT B.F., BRINER J., HEITZ P.U. et ZIMMERMANN D.R.

Distribution of the large aggregating proteoglycan versican in adult human tissues.

J Histochem Cytochem 1996; 44(4):303-12.

BORCHERDING M.S., BLACIK L.J., SITTIG R.A., BIZZELL J.W., BREEN M. et WEINSTEIN H.G.

Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneal scleral tissue.

Exp Eye Res 1975; 21(1):59-70.

BOTELLA L.M., SANZ-RODRIGUEZ F., SANCHEZ-ELSNER T., LANGA C., RAMIREZ J.R., VARY C., et coll.

Lumican is down-regulated in cells expressing endoglin. Evidence for an inverse relationship between Endoglin and Lumican expression.

Matrix Biol 2004; 22(7):561-72.

BOURIN M.C. et LINDAHL U.

Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation.

Biochem J 1993; 289 (Pt 2):313-30.

BRADFORD M.M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem 1976; 72:248-54.

BREEN M., WEINSTEIN H.G., JOHNSON R.L., VEIS A. et MARSHALL R.T.

Acidic glycosaminoglycans in human skin during fetal development and adult life.

Biochim Biophys Acta 1970; 201(1):54-60.

BRESLOW A.

Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.

Ann Surg 1970; 172(5):902-8.

BRIGGAMAN R.A.

Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement membrane.
J Invest Dermatol 1982; 78(1):1-6.

BROOKS P.C., STROMBLAD S., SANDERS L.C., VON SCHALSCHA T.L., AIMES R.T., STETLER-STEVENSON W.G., et coll.

Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.
Cell 1996; 85(5):683-93.

BROWN D.C. et VOGEL K.G.

Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen.
Matrix 1989; 9(6):468-78.

BUCHAILLE R., COUBLE M.L., MAGLOIRE H. et BLEICHER F.

Expression of the small leucine-rich proteoglycan osteoadherin/osteomodulin in human dental pulp and developing rat teeth.
Bone 2000; 27(2):265-70.

BURG M.A., GRAKO K.A. et STALLCUP W.B.

Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells.
J Cell Physiol 1998; 177(2):299-312.

CAPON F., EMONARD H., HORNEBECK W., MAQUART F.X. et BERNARD P.

Expression and activation of pro-gelatinase A by human melanoma cell lines with different tumorigenic potential.
Clin Exp Metastasis 1999; 17(6):463-9.

CARLSON E.C., MAMIYA K., LIU C.Y., GENDRON R.L., BIRK D.E., FUNDERBURGH J.L., et coll.

Role of Cys41 in the N-terminal domain of lumican in ex vivo collagen fibrillogenesis by cultured corneal stromal cells.
Biochem J 2003; 369(Pt 3):461-8.

CARRINO D.A., SORRELL J.M. et CAPLAN A.I.

Age-related changes in the proteoglycans of human skin.
Arch Biochem Biophys 2000; 373(1):91-101.

CASCINELLI N. et MARCHESINI R.

Increasing incidence of cutaneous melanoma, ultraviolet radiation and the clinician.
Photochem Photobiol 1989; 50(4):497-505.

CAUX F., TIMAR J., LAPIS K. et MOCZAR M.

Proteochondroitin sulphate in human melanoma cell cultures.
Biochem Soc Trans 1990; 18(2):293-4.

CELIS J.E., MADSEN P., CELIS A., NIELSEN H.V. et GESSER B.

Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division.

FEBS Lett 1987; 220(1):1-7.

CHAKRAVARTI S., MAGNUSON T., LASS J.H., JEPSEN K.J., LAMANTIA C. et CARROLL H.

Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican.

J Cell Biol 1998; 141(5):1277-86.

CHAKRAVARTI S., PAUL J., ROBERTS L., CHERVONEVA I., OLDBERG A. et BIRK D.E.

Ocular and scleral alterations in gene-targeted lumican-fibromodulin double-null mice.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44(6):2422-32.

CHAKRAVARTI S., STALLINGS R.L., SUNDARRAJ N., CORNUET P.K. et HASSELL J.R.

Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22.

Genomics 1995; 27(3):481-8.

CHATTERJEE R., BENZINGER M.J., RITTER J.L. et BISSETT D.L.

Chronic ultraviolet B radiation-induced biochemical changes in the skin of hairless mice.

Photochem Photobiol 1990; 51(1):91-7.

CHEN X.D., SHI S., XU T., ROBEY P.G. et YOUNG M.F.

Age-related osteoporosis in biglycan-deficient mice is related to defects in bone marrow stromal cells.

J Bone Miner Res 2002; 17(2):331-40.

CHOMCZYNSKI P. et SACCHI N.

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal Biochem 1987; 162(1):156-9.

CLARK W.H., JR., FROM L., BERNARDINO E.A. et MIHM M.C.

The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.

Cancer Res 1969; 29(3):705-27.

COHEN I.R., MURDOCH A.D., NASO M.F., MARCHETTI D., BERD D. et IOZZO R.V.

Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas.

Cancer Res 1994; 54(22):5771-4.

COLONNA M., NAVARRO F., BELLON T., LLANO M., GARCIA P., SAMARIDIS J., et coll.

A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells.

J Exp Med 1997; 186(11):1809-18.

CONTRERAS H.R., FABRE M., GRANES F., CASAROLI-MARANO R., ROCAMORA N., HERREROS A.G., et coll.

Syndecan-2 expression in colorectal cancer-derived HT-29 M6 epithelial cells induces a migratory phenotype.

Biochem Biophys Res Commun 2001; 286(4):742-51.

COOKE K.R. et FRASER J.

Migration and death from malignant melanoma.

Int J Cancer 1985; 36(2):175-8.

CORNUET P.K., BLOCHBERGER T.C. et HASSELL J.R.

Molecular polymorphism of lumican during corneal development.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35(3):870-7.

CORPUZ L.M., DUNLEVY J.R., HASSELL J.R., CONRAD A.H. et CONRAD G.W.

Molecular cloning and relative tissue expression of keratocan and mimecan in embryonic quail cornea.

Matrix Biol 2000; 19(7):693-8.

CORPUZ L.M., FUNDERBURGH J.L., FUNDERBURGH M.L., BOTTOMLEY G.S., PRAKASH S. et CONRAD G.W.

Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A.

J Biol Chem 1996; 271(16):9759-63.

COSSINS J., DUDGEON T.J., CATLIN G., GEARING A.J. et CLEMENTS J.M.

Identification of MMP-18, a putative novel human matrix metalloproteinase.

Biochem Biophys Res Commun 1996; 228(2):494-8.

DALY C.H. et ODLAND G.F.

Age-related changes in the mechanical properties of human skin.

J Invest Dermatol 1979; 73(1):84-7.

DANIELSON K.G., BARIBAULT H., HOLMES D.F., GRAHAM H., KADLER K.E. et IOZZO R.V.

Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.

J Cell Biol 1997; 136(3):729-43.

DAVID G.

Integral membrane heparan sulfate proteoglycans.

Faseb J 1993; 7(11):1023-30.

D'AVIS P Y., FRAZIER C.R., SHAPIRO J.R. et FEDARKO N.S.

Age-related changes in effects of insulin-like growth factor I on human osteoblast-like cells.

Biochem J 1997; 324 (Pt 3):753-60.

DE VRIES T.J., VAN MUIJEN G.N. et RUITER D.J.

The plasminogen activation system in melanoma cell lines and in melanocytic lesions.

Melanoma Res 1996; 6(2):79-88.

DEL SANTO M., JR., MARCHES F., NG M. et HINTON R.J.

Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage.
Arch Oral Biol 2000; 45(6):485-93.

DELEO V.A.

Prevention of skin cancer.
J Dermatol Surg Oncol 1988; 14(8):902-6.

DENG G., LU Y., ZLOTNIKOV G., THOR A.D. et SMITH H.S.

Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas.
Science 1996; 274(5295):2057-9.

**DJAVAHERI-MERGNY M., MORA L., MAZIERE C., AUCLAIR M., SANTUS R.,
DUBERTRET L., et coll.**

Inhibition of diphosphatidylglycerol synthesis by u.v. A radiations in N.C.T.C. 2544 human keratinocytes.
Biochem J 1994; 299 (Pt 1):85-90.

DODGE G.R., DIAZ A., SANZ-RODRIGUEZ C., REGINATO A.M. et JIMENEZ S.A.

Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on the expression of the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes.
Arthritis Rheum 1998; 41(2):274-83.

DOEGE K., SASAKI M., HORIGAN E., HASSELL J.R. et YAMADA Y.

Complete primary structure of the rat cartilage proteoglycan core protein deduced from cDNA clones.
J Biol Chem 1987; 262(36):17757-67.

DOEGE K., SASAKI M. et YAMADA Y.

Rat and human cartilage proteoglycan (aggrecan) gene structure.
Biochem Soc Trans 1990; 18(2):200-2.

DOLHNIKOFF M., MORIN J., ROUGHLEY P.J. et LUDWIG M.S.

Expression of lumican in human lungs.
Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19(4):582-7.

DORÉ J.

Soleil et mélanome Analyse des risques de cancer cutanés. Moyens de prévention.
Paris: La documentation française, 1990.

EADY R.A., MCGRATH J.A. et MCMILLAN J.R.

Ultrastructural clues to genetic disorders of skin: the dermal-epidermal junction.
J Invest Dermatol 1994; 103(5 Suppl):13S-18S.

**ELLENRIEDER V., HENDLER S.F., RUHLAND C., BOECK W., ADLER G. et GRESS
T.M.**

TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system.
Int J Cancer 2001; 93(2):204-11.

ELLIS I., GREY A.M., SCHOR A.M. et SCHOR S.L.

Antagonistic effects of TGF-beta 1 and MSF on fibroblast migration and hyaluronic acid synthesis.
Possible implications for dermal wound healing.
J Cell Sci 1992; 102 (Pt 3):447-56.

EVERETT M.A., YEARGERS E., SAYRE R.M. et OLSON R.L.

Penetration of epidermis by ultraviolet rays.
Photochem Photobiol 1966; 5(7):533-42.

FAASSEN A.E., MOORADIAN D.L., TRANQUILLO R.T., DICKINSON R.B., LETOURNEAU P.C., OEGEMA T.R., et coll.

Cell surface CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan is required for transforming growth factor-beta-stimulated mouse melanoma cell motility and invasive behavior on type I collagen.
J Cell Sci 1993; 105 (Pt 2):501-11.

FISHER L.W., HAWKINS G.R., TUROSS N. et TERMINE J.D.

Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone.
J Biol Chem 1987; 262(20):9702-8.

FISHER L.W., STUBBS J.T., 3RD et YOUNG M.F.

Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins.
Acta Orthop Scand Suppl 1995; 266:61-5.

FODIL-BOURAHLA I., DRUBAIX I. et ROBERT L.

Effect of in vitro aging on the biosynthesis of glycosaminoglycans by human skin fibroblasts.
Modulation by the elastin-laminin receptor.
Mech Ageing Dev 1999; 106(3):241-60.

FRASER J.R., LAURENT T.C. et LAURENT U.B.

Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover.
J Intern Med 1997; 242(1):27-33.

FRINK R.S.

Staining cells on a membrane filter with Giemsa stock and tap water.
Stain Technol 1965; 40(6):367-9.

FUNDERBURGH J.L., CATERSON B. et CONRAD G.W.

Distribution of proteoglycans antigenically related to corneal keratan sulfate proteoglycan.
J Biol Chem 1987; 262(24):11634-40.

FUNDERBURGH J.L., FUNDERBURGH M.L., BROWN S.J., VERGNES J.P., HASSELL J.R., MANN M.M., et coll.

Sequence and structural implications of a bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein.
Protein 37B represents bovine lumican and proteins 37A and 25 are unique.
J Biol Chem 1993; 268(16):11874-80.

FUNDERBURGH J.L., FUNDERBURGH M.L., HEVELONE N.D., STECH M.E., JUSTICE M.J., LIU C.Y., et coll.

Sequence, molecular properties, and chromosomal mapping of mouse lumican.
Invest Ophthalmol Vis Sci 1995; 36(11):2296-303.

FUNDERBURGH J.L., FUNDERBURGH M.L., MANN M.M. et CONRAD G.W.

Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta.
J Biol Chem 1991; 266(36):24773-7.

FUNDERBURGH J.L., FUNDERBURGH M.L., MANN M.M., CORPUZ L. et ROTH M.R.

Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation.
J Biol Chem 2001; 276(47):44173-8.

FUNDERBURGH J.L., MITSCHLER R.R., FUNDERBURGH M.L., ROTH M.R., CHAPES S.K. et CONRAD G.W.

Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan.
Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38(6):1159-67.

GEERKENS C., VETTER U., JUST W., FEDARKO N.S., FISHER L.W., YOUNG M.F., et coll.

The X-chromosomal human biglycan gene BGN is subject to X inactivation but is transcribed like an X-Y homologous gene.
Hum Genet 1995; 96(1):44-52.

GILCHREST B.A., GARMYN M. et YAAR M.

Aging and photoaging affect gene expression in cultured human keratinocytes.
Arch Dermatol 1994; 130(1):82-6.

GOETTSCH W., GARSSEN J., DE GRUIJL F.R. et VAN LOVEREN H.

Effects of UV-B on the resistance against infectious diseases.
Toxicol Lett 1994; 72(1-3):359-63.

GOLDSTEIN S.

Replicative senescence: the human fibroblast comes of age.
Science 1990; 249(4973):1129-33.

GRABBE S. et GRANSTEIN R.D.

Mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis.
Chem Immunol 1994; 58:291-313.

GREBNEVA E.A.

Irradiation of DNA with ultraviolet light: potential changes and mutations.
Mol Biol (Mosk) 1994; 28(4):805-12.

GRESSNER A.M., KRULL N. et BACHEM M.G.

Regulation of proteoglycan expression in fibrotic liver and cultured fat-storing cells.
Pathol Res Pract 1994; 190(9-10):864-82.

GRIFFITH T.S., BRUNNER T., FLETCHER S.M., GREEN D.R. et FERGUSON T.A.
Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.
Science 1995; 270(5239):1189-92.

GROSSHANS E.
Histologie de la peau normale.
In:
Encycl. Med. Chir
Paris, Fasc, 12220 A-12210, 1997

GROVER J., CHEN X.N., KORENBERG J.R. et ROUGHLEY P.J.
The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage.
J Biol Chem 1995; 270(37):21942-9.

GROVER J., LIU C.Y., KAO W.W. et ROUGHLEY P.J.
Analysis of the human lumican gene promoter.
J Biol Chem 2000; 275(52):40967-73.

HALL R., SEPTIER D., EMBERY G. et GOLDBERG M.
Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role.
Histochem J 1999; 31(12):761-70.

HAN Y.P., TUAN T.L., WU H., HUGHES M. et GARNER W.L.
TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP.
J Cell Sci 2001; 114(Pt 1):131-139.

HARPER J.W., ADAMI G.R., WEI N., KEYOMARSI K. et ELLEDGE S.J.
The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.
Cell 1993; 75(4):805-16.

HASSELL J.R., CINTRON C., KUBLIN C. et NEWSOME D.A.
Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars.
Arch Biochem Biophys 1983; 222(2):362-9.

HASSELL J.R., RADA J., CORNUET P., VERGNES J.P. et KINCHINGTON P.R.
Gene structure of chick lumican and identification of the first exon.
Biochim Biophys Acta 1998; 1397(2):119-25.

HAYASHI K., MADRI J.A. et YURCHENCO P.D.
Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan.
J Cell Biol 1992; 119(4):945-59.

HAYFLICK L.
The strategy of senescence.
Gerontologist 1974; 14(1):37-45.

HEDBOM E. et HEINEGARD D.

Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and collagen II.
J Biol Chem 1989; 264(12):6898-905.

HENRY S.P., TAKANOSU M., BOYD T.C., MAYNE P.M., EBERSPAECHER H., ZHOU W., et coll.

Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family.
J Biol Chem 2001; 276(15):12212-21.

HERBERT K.E., MISTRY N., GRIFFITHS H.R. et LUNEC J.

Immunochemical detection of sequence-specific modifications to DNA induced by UV light.
Carcinogenesis 1994; 15(11):2517-21.

HERRMANN G., WLASCHEK M., LANGE T.S., PRENZEL K., GOERZ G. et SCHARFFETTER-KOCHANEK K.

UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts.
Exp Dermatol 1993; 2(2):92-7.

HEUSSEN C. et DOWDLE E.B.

Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates.
Anal Biochem 1980; 102(1):196-202.

HIGHTOWER K.R., MCCREADY J.P. et BORCHMAN D.

Membrane damage in UV-irradiated lenses.
Photochem Photobiol 1994; 59(4):485-90.

HILDEBRAND A., ROMARIS M., RASMUSSEN L.M., HEINEGARD D., TWARDZIK D.R., BORDER W.A., et coll.

Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta.
Biochem J 1994; 302 (Pt 2):527-34.

HOBBY P., WYATT M.K., GAN W., BERNSTEIN S., TOMAREV S., SLINGSBY C., et coll.

Cloning, modeling, and chromosomal localization for a small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family member expressed in human eye.
Mol Vis 2000; 6:72-8.

HOCKING A.M., SHINOMURA T. et MCQUILLAN D.J.

Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix.
Matrix Biol 1998; 17(1):1-19.

HOFER S.O., SHRAYER D., REICHNER J.S., HOEKSTRA H.J. et WANEBO H.J.

Wound-induced tumor progression: a probable role in recurrence after tumor resection.
Arch Surg 1998; 133(4):383-9.

HOFMANN U.B., WESTPHAL J.R., VAN MUIJEN G.N. et RUITER D.J.

Matrix metalloproteinases in human melanoma.

J Invest Dermatol 2000; 115(3):337-44.

HUTTENLOCHER A., WERB Z., TREMBLE P., HUHTALA P., ROSENBERG L. et DAMSKY C.H.

Decorin regulates collagenase gene expression in fibroblasts adhering to vitronectin.
Matrix Biol 1996; 15(4):239-50.

HIDA J., MEIJNE A.M., KNUTSON J.R., FURCHT L.T. et MCCARTHY J.B.

Cell surface chondroitin sulfate proteoglycans in tumor cell adhesion, motility and invasion.
Semin Cancer Biol 1996; 7(3):155-62.

IOZZO R.V.

Neoplastic modulation of extracellular matrix. Colon carcinoma cells release polypeptides that alter proteoglycan metabolism in colon fibroblasts.
J Biol Chem 1985; 260(12):7464-73.

IOZZO R.V.

Perlecan: a gem of a proteoglycan.
Matrix Biol 1994; 14(3):203-8.

IOZZO R.V.

The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth.
Crit Rev Biochem Mol Biol 1997; 32(2):141-74.

IOZZO R.V.

Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.
Annu Rev Biochem 1998; 67:609-52.

IOZZO R.V.

Proteoglycans : structure, biology, and molecular interactions.
New york: Marcel Dekker, 2000.

IOZZO R.V. et COHEN I.

Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma.
Experientia 1993; 49(5):447-55.

IOZZO R.V., COHEN I.R., GRASSEL S. et MURDOCH A.D.

The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices.
Biochem J 1994; 302 (Pt 3):625-39.

IOZZO R.V., MOSCATELLO D.K., MCQUILLAN D.J. et EICHSTETTER I.

Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem 1999; 274(8):4489-92.

IOZZO R.V. et MURDOCH A.D.

Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function.
Faseb J 1996; 10(5):598-614.

ISHIWATA T., FUJII T., ISHIWATA S., IKEGAWA S. et NAITO Z.

Effect of morpholino antisense oligonucleotide against lumican mRNA in human embryonic kidney (HEK) 293 cells.

Pathol Int 2004; 54(2):77-81.

ITO Y., TAKEUCHI J., YAMAMOTO K., HASHIZUME Y., SATO T. et TAUCHI H.

Age differences in immunohistochemical localizations of large proteoglycan, PG-M/versican, and small proteoglycan, decorin, in the dermis of rats.

Exp Anim 2001; 50(2):159-66.

ITOH T., TANIOKA M., MATSUDA H., NISHIMOTO H., YOSHIOKA T., SUZUKI R., et coll.

Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice.

Clin Exp Metastasis 1999; 17(2):177-81.

JACKSON R.L., BUSCH S.J. et CARDIN A.D.

Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes.

Physiol Rev 1991; 71(2):481-539.

JAQUES L.B.

Glycosaminoglycans as polyelectrolytes: rejuvenation of original concepts.

Semin Thromb Hemost 1991; 17 Suppl 1:1-4.

JOHANSON S.

Non-collagenous matrix proteins.

In:

Extracellular matrix.

Ed. D. W. Cooper.

Amsterdam: Harwood Academix Publishers 1996: 68-94.

JOHANSSON S., SVINENG G., WENNERBERG K., ARMULIK A. et LOHIKANGAS L.

Fibronectin-integrin interactions.

Front Biosci 1997; 2:d126-46.

KAHARI V.M. et SAARIALHO-KERE U.

Matrix metalloproteinases in skin.

Exp Dermatol 1997; 6(5):199-213.

KAMADA H., MASUDA K., D'SOUZA A.L., LENZ M.E., PIETRYLA D., OTTEN L., et coll.

Age-related differences in the accumulation and size of hyaluronan in alginate culture.

Arch Biochem Biophys 2002; 408(2):192-9.

KAMBAYASHI H., YAMASHITA M., ODAKE Y., TAKADA K., FUNASAKA Y. et ICHIHASHI M.

Epidermal changes caused by chronic low-dose UV irradiation induce wrinkle formation in hairless mouse.

J Dermatol Sci 2001; 27 Suppl 1:S19-25.

KANITAKIS J.

Structure histologique de la peau humaine.

In:

Biologie de la peau humaine.

Ed. Inserm D. Schmitt.

Paris: 1995: 1-25.

KARTASOVA T. et VAN DE PUTTE P.

Isolation, characterization, and UV-stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes.

Mol Cell Biol 1988; 8(5):2195-203.

KEENE D.R., SAN ANTONIO J.D., MAYNE R., MCQUILLAN D.J., SARRIS G., SANTORO S.A., et coll.

Decorin binds near the C terminus of type I collagen.

J Biol Chem 2000; 275(29):21801-4.

KERR J.F., WYLLIE A.H. et CURRIE A.R.

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br J Cancer 1972; 26(4):239-57.

KIKUNO K., KITA K., NOMURA J., HIWASA T., YONEMITSU H. et SUZUKI N.

Search for genes responsible for UV susceptibility of human cells: involvement of syndecan-1 in UV resistance.

Biochem Biophys Res Commun 1998; 253(2):519-23.

KLUCK R.M., BOSSY-WETZEL E., GREEN D.R. et NEWMAYER D.D.

The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.

Science 1997; 275(5303):1132-6.

KOBE B. et DEISENHOFER J.

The leucine-rich repeat: a versatile binding motif.

Trends Biochem Sci 1994; 19(10):415-21.

KOIVUKANGAS V., KALLIOINEN M., AUTIO-HARMAINEN H. et OIKARINEN A.

UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo.

Acta Derm Venereol 1994; 74(4):279-82.

KOKENYESI R. et SILBERT J.E.

Immortalized, cloned mouse chondrocytic cells (MC615) produce three different matrix proteoglycans with core-protein-specific chondroitin/dermatan sulphate structures.

Biochem J 1997; 327 (Pt 3):831-9.

KOSANO H., KAYANUMA T. et NISHIGORI H.

Stimulation of melanogenesis in murine melanoma cells by 2-mercapto-1-(beta-4-pyridethyl) benzimidazole (MPB).

Biochim Biophys Acta 2000; 1499(1-2):11-18.

KOSHIISHI I., HORIKOSHI E., MITANI H. et IMANARI T.

Quantitative alterations of hyaluronan and dermatan sulfate in the hairless mouse dorsal skin exposed to chronic UV irradiation.

Biochim Biophys Acta 1999; 1428(2-3):327-33.

KRANTZ D.D., ZIDOVETZKI R., KAGAN B.L. et ZIPURSKY S.L.

Amphipathic beta structure of a leucine-rich repeat peptide.

J Biol Chem 1991; 266(25):16801-7.

KRASAGAKIS K., THOLKE D., FARTHMAN B., EBERLE J., MANSMANN U. et ORFANOS C.E.

Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma.

Br J Cancer 1998; 77(9):1492-4.

KRESSE H., HAUSSER H. et SCHONHERR E.

Small proteoglycans.

Experientia 1993; 49(5):403-16.

KRUSIUS T., GEHLSSEN K.R. et RUOSLAHTI E.

A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences.

J Biol Chem 1987; 262(27):13120-5.

KUGELMAN L.C., GANGULY S., HAGGERTY J.G., WEISSMAN S.M. et MILSTONE L.M.

The core protein of epican, a heparan sulfate proteoglycan on keratinocytes, is an alternative form of CD44.

J Invest Dermatol 1992; 99(6):886-91.

KUWABARA M., TAKUMA T., SCOTT P.G., DODD C.M. et MIZOGUCHI I.

Biochemical and immunohistochemical studies of the protein expression and localization of decorin and biglycan in the temporomandibular joint disc of growing rats.

Arch Oral Biol 2002; 47(6):473-80.

LADANYI A., GALLAI M., PAKU S., NAGY J.O., DUDAS J., TIMAR J., et coll.

Expression of a decorin-like molecule in human melanoma.

Pathol Oncol Res 2001; 7(4):260-6.

LAEMMLI U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 1970; 227(259):680-5.

LARSSON T., SOMMARIN Y., PAULSSON M., ANTONSSON P., HEDBOM E., WENDEL M., et coll.

Cartilage matrix proteins. A basic 36-kDa protein with a restricted distribution to cartilage and bone.

J Biol Chem 1991; 266(30):20428-33.

- LAUDER R.M., HUCKERBY T.N., NIEDUSZYNSKI I.A. et PLAAS A.H.**
Age-related changes in the structure of the keratan sulphate chains attached to fibromodulin isolated from articular cartilage.
Biochem J 1998; 330 (Pt 2):753-7.
- LE GOFF M.M., HINDSON V.J., JOWITT T.A., SCOTT P.G. et BISHOP P.N.**
Characterization of opticin and evidence of stable dimerization in solution.
J Biol Chem 2003; 278(46):45280-7.
- LEYGUE E., SNELL L., DOTZLAW H., HOLE K., HILLER-HITCHCOCK T., ROUGHLEY P.J., et coll.**
Expression of lumican in human breast carcinoma.
Cancer Res 1998; 58(7):1348-52.
- LEYGUE E., SNELL L., DOTZLAW H., TROUP S., HILLER-HITCHCOCK T., MURPHY L.C., et coll.**
Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma.
J Pathol 2000; 192(3):313-20.
- LOGGIE B., RONAN S.G., BEAN J. et DAS GUPTA T.K.**
Invasive cutaneous melanoma in elderly patients.
Arch Dermatol 1991; 127(8):1188-93.
- LONGAS M.O., RUSSELL C.S. et HE X.Y.**
Evidence for structural changes in dermatan sulfate and hyaluronic acid with aging.
Carbohydr Res 1987; 159(1):127-36.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J.**
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J Biol Chem 1951; 193(1):265-75.
- LU Y.P., ISHIWATA T., KAWAHARA K., WATANABE M., NAITO Z., MORIYAMA Y., et coll.**
Expression of lumican in human colorectal cancer cells.
Pathol Int 2002; 52(8):519-26.
- LUO J., DUNN T., EWING C., SAUVAGEOT J., CHEN Y., TRENT J., et coll.**
Gene expression signature of benign prostatic hyperplasia revealed by cDNA microarray analysis.
Prostate 2002; 51(3):189-200.
- MAEDA T., ALEXANDER C.M. et FRIEDL A.**
Induction of syndecan-1 expression in stromal fibroblasts promotes proliferation of human breast cancer cells.
Cancer Res 2004; 64(2):612-21.
- MARGELIN D., FOURTANIER A., THEVENIN T., MEDAISKO C., BRETON M. et PICARD J.**
Alterations of proteoglycans in ultraviolet-irradiated skin.
Photochem Photobiol 1993; 58(2):211-8.

MARGHOOB A.A., KOPF A.W., RIGEL D.S., BART R.S., FRIEDMAN R.J., YADAV S., et coll.

Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with 'classic' atypical-mole syndrome. A case-control study.

Arch Dermatol 1994; 130(8):993-8.

MASIAKOWSKI P., BREATHNACH R., BLOCH J., GANNON F., KRUST A. et CHAMBON P.

Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line.

Nucleic Acids Res 1982; 10(24):7895-903.

MATSUMOTO S., KATOH M., SAITO S., WATANABE T. et MASUHO Y.

Identification of soluble type of membrane-type matrix metalloproteinase-3 formed by alternatively spliced mRNA.

Biochim Biophys Acta 1997; 1354(2):159-70.

MAURICE D.M. et SINGH T.

An improved method for restraining rabbits for examination of the eye.

Invest Ophthalmol Vis Sci 1984; 25(10):1220-1.

MAUVIEL A., SANTRA M., CHEN Y.Q., UITTO J. et IOZZO R.V.

Transcriptional regulation of decorin gene expression. Induction by quiescence and repression by tumor necrosis factor- α .

J Biol Chem 1995; 270(19):11692-700.

MCALINDEN A., DUDHIA J., BOLTON M.C., LORENZO P., HEINEGARD D. et BAYLISS M.T.

Age-related changes in the synthesis and mRNA expression of decorin and aggrecan in human meniscus and articular cartilage.

Osteoarthritis Cartilage 2001; 9(1):33-41.

MCCAWLEY L.J. et MATRISIAN L.M.

Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!

Curr Opin Cell Biol 2001; 13(5):534-40.

MCGOVERN V.J., MIHM M.C., JR., BAILLY C., BOOTH J.C., CLARK W.H., JR., COCHRAN A.J., et coll.

The classification of malignant melanoma and its histologic reporting.

Cancer 1973; 32(6):1446-57.

MCGRATH H., JR.

Ultraviolet-A1 irradiation decreases clinical disease activity and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus.

Clin Exp Rheumatol 1994; 12(2):129-35.

MCLEOD GR D.N., LITTLE JH, ET AL.

Melanoma in queensland.

Philadelphia: JB lippincott Co, 1985.

MECHAM R.P., MORRIS S.L., LEVY B.D. et WRENN D.S.

Glucocorticoids stimulate elastin production in differentiated bovine ligament fibroblasts but do not induce elastin synthesis in undifferentiated cells.

J Biol Chem 1984; 259(20):12414-8.

MELCHING L.I. et ROUGHLEY P.J.

The synthesis of dermatan sulphate proteoglycans by fetal and adult human articular cartilage.

Biochem J 1989; 261(2):501-8.

MELCHING L.I. et ROUGHLEY P.J.

Modulation of keratan sulfate synthesis on lumican by the action of cytokines on human articular chondrocytes.

Matrix Biol 1999; 18(4):381-90.

MEYER K.

Chemical structure of hyaluronic acid.

Fed Proc 1958; 17(4):1075-7.

MEYER L.J. et STERN R.

Age-dependent changes of hyaluronan in human skin.

J Invest Dermatol 1994; 102(3):385-9.

MIDURA R.J. et HASCALL V.C.

Analysis of the proteoglycans synthesized by corneal explants from embryonic chicken. II. Structural characterization of the keratan sulfate and dermatan sulfate proteoglycans from corneal stroma.

J Biol Chem 1989; 264(3):1423-30.

MILLER E.J.

Biochemical characteristics and biological significance of the genetically-distinct collagens.

Mol Cell Biochem 1976; 13(3):165-92.

MILLER E.J., VAN DER KORST J.K. et SOKOLOFF L.

Collagen of human articular and costal cartilage.

Arthritis Rheum 1969; 12(1):21-9.

MOAN J.

UV-A radiation, melanoma induction, sunscreens, solarium and ozone reduction.

J Photochem Photobiol B 1994; 24(3):201-3.

MONEA S., LEHTI K., KESKI-OJA J. et MIGNATTI P.

Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism.

J Cell Physiol 2002; 192(2):160-70.

NAITO Z., ISHIWATA T., KURBAN G., TEDUKA K., KAWAMOTO Y., KAWAHARA K., et coll.

Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests.

Int J Oncol 2002; 20(5):943-8.

NAITO Z., ISHIWATA T., LU Y.P., TEDUKA K., FUJII T., KAWAHARA K., et coll.
Transient and ectopic expression of lumican by acinar cells in L-arginine-induced acute pancreatitis.
Exp Mol Pathol 2003; 74(1):33-9.

NARA Y., KATO Y., TORII Y., TSUJI Y., NAKAGAKI S., GOTO S., et coll.
Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican.
Histochem J 1997; 29(1):21-30.

NEAME P.J., KAY C.J., MCQUILLAN D.J., BEALES M.P. et HASSELL J.R.
Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican.
Cell Mol Life Sci 2000; 57(5):859-63.

NEAME P.J., SOMMARIN Y., BOYNTON R.E. et HEINEGARD D.
The structure of a 38-kDa leucine-rich protein (chondroadherin) isolated from bovine cartilage.
J Biol Chem 1994; 269(34):21547-54.

NISHIMORI Y., EDWARDS C., PEARSE A., MATSUMOTO K., KAWAI M. et MARKS R.
Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles.
J Invest Dermatol 2001; 117(6):1458-63.

NISHIU J., TANAKA T. et NAKAMURA Y.
Identification of a novel gene (ECM2) encoding a putative extracellular matrix protein expressed predominantly in adipose and female-specific tissues and its chromosomal localization to 9q22.3.
Genomics 1998; 52(3):378-81.

NOMURA Y., ABE Y., ISHII Y., WATANABE M., KOBAYASHI M., HATTORI A., et coll.
Structural changes in the glycosaminoglycan chain of rat skin decorin with growth.
J Dermatol 2003; 30(9):655-64.

OHNISHI Y., TAJIMA S. et ISHIBASHI A.
Coordinate expression of membrane type-matrix metalloproteinases-2 and 3 (MT2-MMP and MT3-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in primary and metastatic melanoma cells.
Eur J Dermatol 2001; 11(5):420-3.

OHUCHI E., IMAI K., FUJII Y., SATO H., SEIKI M. et OKADA Y.
Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules.
J Biol Chem 1997; 272(4):2446-51.

PARKS W.C., SECRIST H., WU L.C. et MECHAM R.P.
Developmental regulation of tropoelastin isoforms.
J Biol Chem 1988; 263(9):4416-23.

PARRISH J.A., JAENICKE K.F. et ANDERSON R.R.
Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin.
Photochem Photobiol 1982; 36(2):187-91.

PASSI A., ALBERTINI R., CAMPAGNARI F. et DE LUCA G.

Modifications of proteoglycans extracted from monolayer cultures of young and senescent human skin fibroblasts.

FEBS Lett 1997; 420(2-3):175-8.

PENDAS A.M., KNAUPER V., PUENTE X.S., LLANO E., MATTEI M.G., APTE S., et coll.

Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution.

J Biol Chem 1997; 272(7):4281-6.

PESCH K., ZEITZ C., FRIES J.E., MUNSCHER S., PUSCH C.M., KOHLER K., et coll.

Isolation of the mouse nyctalopin gene *nyx* and expression studies in mouse and rat retina.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44(5):2260-6.

PEYROL S., RACCURT M., GERARD F., GLEYZAL C., GRIMAUD J.A. et SOMMER P.

Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma.

Am J Pathol 1997; 150(2):497-507.

PODSKOCHY A., KOULIKOVSKA M., FAGERHOLM P. et VAN DER PLOEG I.

Biglycan gene expression in UVR-exposed rabbit corneas.

Acta Ophthalmol Scand 2004; 82(2):200-4.

POLLAK M.

Insulin-like growth factor physiology and cancer risk.

Eur J Cancer 2000; 36(10):1224-8.

POPE R.M.

Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis.

Nat Rev Immunol 2002; 2(7):527-35.

PUSCH C.M., ZEITZ C., BRANDAU O., PESCH K., ACHATZ H., FEIL S., et coll.

The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein.

Nat Genet 2000; 26(3):324-7.

QIN H., ISHIWATA T. et ASANO G.

Effects of the extracellular matrix on lumican expression in rat aortic smooth muscle cells in vitro.

J Pathol 2001; 195(5):604-8.

RADA J.A., ACHEN V.R., PENUGONDA S., SCHMIDT R.W. et MOUNT B.A.

Proteoglycan composition in the human sclera during growth and aging.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41(7):1639-48.

RADA J.A., CORNUET P.K. et HASSELL J.R.

Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins.

Exp Eye Res 1993; 56(6):635-48.

RAGHOW R.

The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis.
Faseb J 1994; 8(11):823-31.

RAO B.K., ENDZWEIG C.H., KAGEN M.H., KRIEGEL D. et FREEMAN R.G.

Wrinkling due to mid-dermal elastolysis: two cases and literature review.
J Cutan Med Surg 2000; 4(1):40-4.

RAOUF A., GANSS B., MCMAHON C., VARY C., ROUGHLEY P.J. et SETH A.

Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix.
Matrix Biol 2002; 21(4):361-7.

RAZ E., BEN-DOV I., GILON D., RAHAV G., MOGLE P. et ROSENMAN E.

Prolonged pyrexia and lung metastases. A rare presentation of an occult epithelioid sarcoma.
Chest 1989; 96(5):1191-2.

REARDON A.J., LE GOFF M., BRIGGS M.D., MCLEOD D., SHEEHAN J.K., THORNTON D.J., et coll.

Identification in vitreous and molecular cloning of opticin, a novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix.
J Biol Chem 2000; 275(3):2123-9.

RODDEY P.K., GARMYN M., PARK H.Y., BHAWAN J. et GILCHREST B.A.

Ultraviolet irradiation induces c-fos but not c-Ha-ras proto-oncogene expression in human epidermis.
J Invest Dermatol 1994; 102(3):296-9.

ROSENBLOOM J., ABRAMS W.R. et MECHAM R.

Extracellular matrix 4: the elastic fiber.
Faseb J 1993; 7(13):1208-18.

ROSS M.D., BRUGGEMAN L.A., HANSS B., SUNAMOTO M., MARRAS D., KLOTMAN M.E., et coll.

Podocan, a novel small leucine-rich repeat protein expressed in the sclerotic glomerular lesion of experimental HIV-associated nephropathy.
J Biol Chem 2003; 278(35):33248-55.

ROUGHLEY P.J., MELCHING L.I. et RECKLIES A.D.

Changes in the expression of decorin and biglycan in human articular cartilage with age and regulation by TGF-beta.
Matrix Biol 1994; 14(1):51-9.

ROUGHLEY P.J., WHITE R.J., CS-SZABO G. et MORT J.S.

Changes with age in the structure of fibromodulin in human articular cartilage.
Osteoarthritis Cartilage 1996; 4(3):153-61.

ROUGHLEY P.J., WHITE R.J., MAGNY M.C., LIU J., PEARCE R.H. et MORT J.S.

Non-proteoglycan forms of biglycan increase with age in human articular cartilage.
Biochem J 1993; 295 (Pt 2):421-6.

SAAMANEN A.M., SALMINEN H.J., RANTAKOKKO A.J., HEINEGARD D. et VUORIO E.I.

Murine fibromodulin: cDNA and genomic structure, and age-related expression and distribution in the knee joint.

Biochem J 2001; 355(Pt 3):577-85.

SAIKA S., MIYAMOTO T., TANAKA S., TANAKA T., ISHIDA I., OHNISHI Y., et coll.

Response of lens epithelial cells to injury: role of lumican in epithelial-mesenchymal transition.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44(5):2094-102.

SAIKA S., SHIRAISHI A., LIU C.Y., FUNDERBURGH J.L., KAO C.W., CONVERSE R.L., et coll.

Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing.

J Biol Chem 2000; 275(4):2607-12.

SAKAGUCHI K., YANAGISHITA M., TAKEUCHI Y. et AURBACH G.D.

Identification of heparan sulfate proteoglycan as a high affinity receptor for acidic fibroblast growth factor (aFGF) in a parathyroid cell line.

J Biol Chem 1991; 266(11):7270-8.

SAKAI L.Y., KEENE D.R., GLANVILLE R.W. et BACHINGER H.P.

Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils.

J Biol Chem 1991; 266(22):14763-70.

SAMBROOK J.F.E., MANIATIS T.

Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAMES K.

The role of proteoglycans and glycosaminoglycans in aging.

New York: Karger, 1994.

SAMPAIO L.O., DIETRICH C.P. et FILHO O.G.

Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and in cancer tissues.

Biochim Biophys Acta 1977; 498(1):123-31.

SAN MARTIN S., SOTO-SUAZO M., DE OLIVEIRA S.F., APLIN J.D., ABRAHAMSOHN P. et ZORN T.M.

Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice.

Reproduction 2003; 125(4):585-95.

SANTRA M., SKORSKI T., CALABRETTA B., LATTIME E.C. et IOZZO R.V.

De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells.

Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92(15):7016-20.

SCHAEFER L., MACAKOVA K., RASLIK I., MICEGOVA M., GRONE H.J., SCHONHERR E., et coll.

Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction.

Am J Pathol 2002; 160(3):1181-91.

SCHLESSINGER J., LAX I. et LEMMON M.

Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors?

Cell 1995; 83(3):357-60.

SCHOLZEN T., SOLURSH M., SUZUKI S., REITER R., MORGAN J.L., BUCHBERG A.M., et coll.

The murine decorin. Complete cDNA cloning, genomic organization, chromosomal assignment, and expression during organogenesis and tissue differentiation.

J Biol Chem 1994; 269(45):28270-81.

SCHONHERR E., BEAVAN L.A., HAUSSER H., KRESSE H. et CULP L.A.

Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro.

Biochem J 1993; 290 (Pt 3):893-9.

SCHONHERR E., O'CONNELL B.C., SCHITTNY J., ROBENEK H., FASTERMANN D., FISHER L.W., et coll.

Paracrine or virus-mediated induction of decorin expression by endothelial cells contributes to tube formation and prevention of apoptosis in collagen lattices.

Eur J Cell Biol 1999; 78(1):44-55.

SCHONHERR E., SCHAEFER L., O'CONNELL B.C. et KRESSE H.

Matrix metalloproteinase expression by endothelial cells in collagen lattices changes during co-culture with fibroblasts and upon induction of decorin expression.

J Cell Physiol 2001; 187(1):37-47.

SCHONHERR E., WITSCH-PREHM P., HARRACH B., ROBENEK H., RAUTERBERG J. et KRESSE H.

Interaction of biglycan with type I collagen.

J Biol Chem 1995; 270(6):2776-83.

SCOTT J.E.

Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues.

Faseb J 1992; 6(9):2639-45.

SEIKI M.

Membrane-type matrix metalloproteinases.

Apmis 1999; 107(1):137-43.

SEPHEL G.C. et DAVIDSON J.M.

Elastin production in human skin fibroblast cultures and its decline with age.

J Invest Dermatol 1986; 86(3):279-85.

SHEN Z., GANTCHEVA S., SOMMARIN Y. et HEINEGARD D.

Tissue distribution of a novel cell binding protein, osteoadherin, in the rat.
Matrix Biol 1999; 18(6):533-42.

SHIMIZU-HIROTA R., SASAMURA H., KURODA M., KOBAYASHI E. et SARUTA T.

Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family.
FEBS Lett 2004; 563(1-3):69-74.

SHWARTZ H., SHAVITT O. et LIVNEH Z.

The role of exonucleolytic processing and polymerase-DNA association in bypass of lesions during replication in vitro. Significance for SOS-targeted mutagenesis.
J Biol Chem 1988; 263(34):18277-85.

SMITH J.R. et PEREIRA-SMITH O.M.

Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression.
Science 1996; 273(5271):63-7.

SONAL D.

Prevention of IGF-1 and TGFbeta stimulated type II collagen and decorin expression by bFGF and identification of IGF-1 mRNA transcripts in articular chondrocytes.
Matrix Biol 2001; 20(4):233-42.

STERENBORG H.J. et VAN DER LEUN J.C.

Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source.
Photochem Photobiol 1990; 51(3):325-30.

STRONGIN A.Y., COLLIER I., BANNIKOV G., MARMER B.L., GRANT G.A. et GOLDBERG G.I.

Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease.
J Biol Chem 1995; 270(10):5331-8.

SUNDARRAJ N., FITE D., BELAK R., SUNDARRAJ S., RADA J., OKAMOTO S., et coll.

Proteoglycan distribution during healing of corneal stromal wounds in chick.
Exp Eye Res 1998; 67(4):433-42.

SVENSSON L., ASZODI A., REINHOLT F.P., FASSLER R., HEINEGARD D. et OLDBERG A.

Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon.
J Biol Chem 1999; 274(14):9636-47.

SVENSSON L., HEINEGARD D. et OLDBERG A.

Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5.
J Biol Chem 1995; 270(35):20712-6.

SVENSSON L., NARLID I. et OLDBERG A.

Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils.
FEBS Lett 2000; 470(2):178-82.

SZTROLOVICS R., ALINI M., MORT J.S. et ROUGHLEY P.J.

Age-related changes in fibromodulin and lumican in human intervertebral discs.
Spine 1999; 24(17):1765-71.

TAKAHASHI Y., ISHIKAWA O., OKADA K., OHNISHI K. et MIYACHI Y.

Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans in chronically ultraviolet light-irradiated hairless mice.
J Dermatol Sci 1995; 10(2):139-44.

TAKANOSU M., BOYD T.C., LE GOFF M., HENRY S.P., ZHANG Y., BISHOP P.N., et coll.

Structure, chromosomal location, and tissue-specific expression of the mouse opticin gene.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2001; 42(10):2202-10.

TAKEUCHI Y., KODAMA Y. et MATSUMOTO T.

Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity.
J Biol Chem 1994; 269(51):32634-8.

TASHEVA E.S. et CONRAD G.W.

The UV responsive elements in the human mimecan promoter: a functional characterization.
Mol Vis 2003; 9:1-9.

TASHEVA E.S., KE A. et CONRAD G.W.

Analysis of the expression of chondroadherin in mouse ocular and non-ocular tissues.
Mol Vis 2004; 10:544-54.

THOMAS L.

Epithelial and melanic skin tumors.
Rev Prat 2002; 52(7):797-806.

TOLEDO O.M. et DIETRICH C.P.

Tissue specific distribution of sulfated mucopolysaccharides in mammals.
Biochim Biophys Acta 1977; 498(1):114-22.

TOURNILLAC I., PICOT M.C., DEREURE O., GUILHOU J.J. et GUILLOT B.

Dubreuilh melanoma: and epidemiologic and prognostic study.
Ann Dermatol Venereol 1999; 126(10):676-80.

TOWBIN H., STAEHELIN T. et GORDON J.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76(9):4350-4.

TRALHAO J.G., SCHAEFER L., MICEGOVA M., EVARISTO C., SCHONHERR E., KAYAL S., et coll.

In vivo selective and distant killing of cancer cells using adenovirus-mediated decorin gene transfer.
Faseb J 2003; 17(3):464-6.

TROUP S., NJUE C., KLIEWER E.V., PARISIEN M., ROSKELLEY C., CHAKRAVARTI S., et coll.

Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer.

Clin Cancer Res 2003; 9(1):207-14.

TUFVESSON E. et WESTERGREN-THORSSON G.

Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha.

J Cell Biochem 2000; 77(2):298-309.

TUFVESSON E. et WESTERGREN-THORSSON G.

Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin.

FEBS Lett 2002; 530(1-3):124-8.

TYRRELL R.M. et PIDOUX M.

Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet, and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes.

Cancer Res 1987; 47(7):1825-9.

UNDERHILL C.

CD44: the hyaluronan receptor.

J Cell Sci 1992; 103 (Pt 2):293-8.

VAISANEN A., KALLIOINEN M., VON DICKHOFF K., LAATIKAINEN L., HOYHTYA M. et TURPEENNIEMI-HUJANEN T.

Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) immunoreactive protein--a new prognostic marker in uveal melanoma?

J Pathol 1999; 188(1):56-62.

VAN DER LEUN J.C.

UV-carcinogenesis.

Photochem Photobiol 1984; 39(6):861-8.

VIJ N., ROBERTS L., JOYCE S. et CHAKRAVARTI S.

Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea.

Exp Eye Res 2004; 78(5):957-71.

VOGEL K.G., PAULSSON M. et HEINEGARD D.

Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon.

Biochem J 1984; 223(3):587-97.

VOGEL K.G. et TROTTER J.A.

The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro.

Coll Relat Res 1987; 7(2):105-14.

WALD M., OLEJAR T., SEBKOVA V., ZADINOVA M., BOUBELIK M. et POUCKOVA P.

Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16.

Cancer Chemother Pharmacol 2001; 47 Suppl:S16-22.

WALKER R.A. et WOOLLEY D.E.

Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 and -3 in human melanoma.
Virchows Arch 1999; 435(6):574-9.

WANDEL E., GRASSHOFF A., MITTAG M., HAUSTEIN U.F. et SAALBACH A.

Fibroblasts surrounding melanoma express elevated levels of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vitro.
Exp Dermatol 2000; 9(1):34-41.

WASTESON A., UTHNE K. et WESTERMARK B.

A novel assay for the biosynthesis of sulphated polysaccharide and its application to studies on the effects of somatomedin on cultured cells.
Biochem J 1973; 136(4):1069-74.

WEBER C.K., SOMMER G., MICHL P., FENSTERER H., WEIMER M., GANSAUGE F., et coll.

Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines.
Gastroenterology 2001; 121(3):657-67.

WEGROWSKI J., MOCZAR M. et ROBERT L.

Proteoglycans from pig aorta. Comparative study of their interactions with lipoproteins.
Biochem J 1986; 235(3):823-31.

WEGROWSKI Y., PALTOT V., GILLERY P., KALIS B., RANDOUX A. et MAQUART F.X.

Stimulation of sulphated glycosaminoglycan and decorin production in adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin-4.
Biochem J 1995a; 307 (Pt 3):673-8.

WEGROWSKI Y., PILLARISSETTI J., DANIELSON K.G., SUZUKI S. et IOZZO R.V.

The murine biglycan: complete cDNA cloning, genomic organization, promoter function, and expression.
Genomics 1995b; 30(1):8-17.

WEKSBERG R., SQUIRE J.A. et TEMPLETON D.M.

Glypicans: a growing trend.
Nat Genet 1996; 12(3):225-7.

WENDEL M., SOMMARIN Y. et HEINEGARD D.

Bone matrix proteins: isolation and characterization of a novel cell-binding keratan sulfate proteoglycan (osteoaderin) from bovine bone.
J Cell Biol 1998; 141(3):839-47.

WEYERS W., EULER M., DIAZ-CASCAJO C., SCHILL W.B. et BONCZKOWITZ M.

Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types.
Cancer 1999; 86(2):288-99.

WINKLER J., WIRBELAUER C., FRANK V. et LAQUA H.

Quantitative distribution of glycosaminoglycans in young and senile (cataractous) anterior lens capsules.

Exp Eye Res 2001; 72(3):311-8.

WOLLINA U., HIPLER U.C., KNOLL B., GRAEFE T., KAATZ M. et KIRSCH K.

Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma.

J Cancer Res Clin Oncol 2001; 127(10):631-5.

WYLLIE A.H., KERR J.F. et CURRIE A.R.

Cell death: the significance of apoptosis.

Int Rev Cytol 1980; 68:251-306.

WYLLIE A.H., MORRIS R.G., SMITH A.L. et DUNLOP D.

Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis.

J Pathol 1984; 142(1):67-77.

XU T., BIANCO P., FISHER L.W., LONGENECKER G., SMITH E., GOLDSTEIN S., et coll.

Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice.

Nat Genet 1998; 20(1):78-82.

YAMAGUCHI Y., MANN D.M. et RUOSLAHTI E.

Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin.

Nature 1990; 346(6281):281-4.

YING S., SHIRAISHI A., KAO C.W., CONVERSE R.L., FUNDERBURGH J.L., SWIERGIEL J., et coll.

Characterization and expression of the mouse lumican gene.

J Biol Chem 1997; 272(48):30306-13.

ZIESKE J.D., GUIMARAES S.R. et HUTCHEON A.E.

Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement.

Exp Eye Res 2001; 72(1):33-9.

ZIMMERMANN D.R. et RUOSLAHTI E.

Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican.

Embo J 1989; 8(10):2975-81.

ANNEXES

The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression

Boris Vuillermoz,^{a,1} Antonina Khoruzhenko,^{a,1,2} Marie-France D'Onofrio,^a
Laurent Ramont,^a Lydie Venteo,^b Corinne Perreau,^a Frank Antonicelli,^a
François-Xavier Maquart,^a and Yanusz Wegrowski^{a,*}

^aLaboratory of Biochemistry, CNRS UMR 6198, Faculty of Medicine, F-51095 Reims Cedex, France

^bLaboratory of Pathology, EA 3306, IFR53 Biomolecules, Faculty of Medicine, F-51095 Reims Cedex, France

Received 25 September 2003; received in revised form 22 January 2004

Available online 19 March 2004

Abstract

Lumican is a member of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family. It contributes to the organisation of the collagen network and plays an important role in cell migration and tissue repair. The present study aimed to determine the influence of lumican expression on adhesion, anchorage-dependent and -independent growth, migration, in vitro invasion and in vivo melanoma growth. For that purpose, B16F1 mouse melanoma cells were stably transfected with an expression plasmid containing the complete lumican cDNA. Lumican expression by tumor cells did not change the proliferative activity of mouse melanoma cells in monolayer culture and did not influence either cell adhesion to extracellular matrix gel or type I collagen or cell spreading on these substrates. In contrast, lumican-transfected cells were characterized by a strong reduction of their anchorage-independent proliferation in agarose gel and capacity to invade extracellular matrix gel. After subcutaneous injections of transfected B16F1 cells in syngenic mice, lumican expression significantly decreased subcutaneous tumor formation in vivo, with a concomitant decrease of cyclin D1 expression. Lumican induced and/or increased the apoptosis of B16F1 cells. The results suggest that lumican is involved in the control of melanoma growth and invasion and may be considered, like decorin, as an anti-tumor factor from the extracellular matrix. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Proteoglycan; Lumican; Melanoma; Invasion; Migration; Anti-tumor

Introduction

Malignant melanoma is the second cancer in mortality rate in Caucasian population [1,2]. In the vertical phase of tumor growth, the cells acquire the capacity to penetrate the

papillary dermis, forming expansive, aggressive nodules [3]. In dermis, melanoma cells get in contact with extracellular matrix and induce a stromal reaction [4]. The quality and integrity of extracellular matrix can influence melanoma growth and progression and its capacity for metastasis [5].

Dermis extracellular matrix is composed of different types of collagens, many glycoproteins (including fibronectin, tenascin, thrombospondin), hyaluronan and proteoglycans. The small leucine-rich proteoglycans (SLRP) family, which includes decorin, biglycan and lumican, constitutes an abundant component of skin extracellular matrix [6]. Recent generation of knock-out mice has proven the role of these small proteoglycans in the regulation of the formation of collagen fibrillar network [7–9].

The SLRP family is composed of (glyco)proteins of M_r approximately 40,000 containing 7–10 leucine-rich domains. The core protein adopts a unique horseshoe or

Abbreviations: CFE, colony forming efficiency; ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SLRP, small leucine-rich proteoglycan.

* Corresponding author. Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, 51 rue Cognacq Jay, F-51095, Reims Cedex, France. Fax: +33-326-918055.

E-mail address: yanusz.wegrowski@univ-reims.fr (Y. Wegrowski).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

² Present address: Laboratory of Functional Diagnosis, Institute of Endocrinology and Metabolism, Academy of Medical Science of Ukraine, 04114 Kiev, Ukraine.

arch conformation to permit protein–protein interaction [6,10]. It is characterized by 4 and 2 conserved cysteine signature in the N- and C-terminal domain, respectively. Biglycan and decorin have one and two chondroitin/dermatan sulphate chains, respectively, attached to the core protein. Lumican was shown to be substituted with keratan sulphate in cornea [11] or with non-sulfated poly-lactosamine chain in tumor stroma [12]. The data concerning skin lumican are scanty, although it was shown that, in dermis, lumican is present in glycoprotein form and may control fibrillogenesis [9,13].

Recently, lumican expression was studied in tumor tissue. In different types of cancer, lumican was always expressed by fibroblasts or fibroblast-like cells adjacent to infiltrating tumor cells [12–14]. Lumican mRNA and proteins were also detected in pancreatic cancer cells in culture [12], but was not expressed in several types of epithelial breast cancer cell lines [13]. Lumican is a major SLRP of breast carcinoma, up-regulated in tumor zone in comparison to adjacent normal tissue [15]. A reduced expression of lumican was associated with poor outcome of invasive carcinoma [16]. Lumican containing non-sulfated poly-lactosamine chains was also expressed by colorectal carcinoma and in adjacent tumor stroma [14]. Lumican was also detected in pancreas cancers and pancreatic cancer cells in culture [12]. Nothing is known about expression of lumican in melanomas or melanoma cells in culture.

By regulating collagen fibrillogenesis, the SLRP family of macromolecules contributes to the mechanical and permeability properties of extracellular matrices, including dermis [17]. Apart from this fundamental function, SRPs are able to bind and neutralise growth factors, including TGF- β [18]. Decorin can also inhibit the growth of different cancer cells [19] by neutralising the EGF receptor-dependent kinases and up-regulating p21^{CIP1/WAF1} through interaction with the EGF receptor in a non-competitive way [20]. In vivo, decorin was shown to inhibit the growth of different tumors implanted in nude mice [21]. Recently, it was demonstrated that another SLRP, biglycan, inhibited pancreatic cancer cell growth [22] by a mechanism probably involving the SMAD4 transduction pathway [23].

Transformation of melanoma from planar to vertical growth, that is, dermal penetration, constitutes the first dangerous event in the malignancy of this tumor [3]. Lumican-lacking mice have a fragile dermis due to irregular fibrillogenesis and neither decorin nor biglycan physiological expression in the dermis compensates the lack of lumican [9]. The expression of lumican in the stroma of growing cancers and the implication of decorin and biglycan in the inhibition of growth of different tumors led us to examine the potential role of lumican in melanoma progression. In this paper, we show that lumican inhibits melanoma growth and progression in a mouse experimental model. Our results suggest a mechanism different from those of decorin or biglycan.

Materials and methods

Reagents

Culture reagents and molecular biology products were obtained from Gibco BRL (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Agar was purchased from BioMérieux (Meylan, France). Matrigel (ECM gel), bovine serum albumin (BSA), glutaraldehyde, cristal violet and Hoechst 33342 were purchased from Sigma (S^t-Quentin Fallavier, France). N-glycosidase F was purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). Keratanase II was purchased from Seikagaku (Coger, Morillon, France). Ni-NTA resin superflow was purchased from Quiagen (Courtaboeuf, France). The lumican polyclonal antibody against carboxy-terminal region of the core protein was generously provided by Dr P. Roughley (Genetics unit, McGill University, Montreal). The secondary horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit antibodies were from Amersham Biosciences (Saclay, France). Anti-mouse Bax polyclonal antibody was obtained from Cell Signaling (Ozyme, S^t Quentin en-Yvelines, France), anti-mouse cyclin D1 (clone SP4) polyclonal antibody were purchased from Labvision (Microm Microtech, Francheville, France).

Animals and cells

Female C57BL/6 mice (average body mass: 18–20 g, 7 weeks old) were purchased from Harlan-France (Gannat, France). Animals were individually caged in a room with constant temperature and humidity, standard food and water ad libitum. All mice were acclimatized for 1 week before starting the experiments. The experiments were conducted according to the recommendations of the Centre National de la Recherche Scientifique.

Murine B16F1 cells, a lung metastatic subline of murine B16 melanoma, were a generous gift of Dr. M. Gregoire (INSERM UMRS 419, Nantes, France). Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS in 25 cm² flasks (Nunc, Merck Eurolab, Strasbourg, France) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C.

Vector construction and transfection of lumican cDNA

A cDNA encoding the complete human lumican coding sequence (HLum) previously cloned into the pCR[®] 2.1-TOPO cloning vector was generously provided by Dr P. Roughley [24]. The cell expression construct (pcDNA3-HLum) was produced by *Eco*R1 digestion of the pCR[®] 2.1-TOPO vector, separation of the fragment of 1.2 kb containing the complete sequence of lumican by agarose gel electrophoresis, and religation into the pcDNA3 plasmid (Invitrogen). The recombinant expression construct (pQE30-HLum) was produced by *Hind*III and *Kpn*I digestion of the pCR[®] 2.1-TOPO vector, separation of the 1.5-kb fragment by agarose gel electrophoresis, and religation into the plas-

mid pQE30 (Quiagen). The proper insertion and sequence of the constructs was confirmed by DNA sequencing.

For stable transfections, 15 µg of plasmid pcDNA3 (vector alone) and pcDNA3-HLum were transfected into subconfluent B16F1 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 2 days, cells were expanded into 100-mm dishes. Transfected cells were selected in the presence of 400 µg/ml neomycin (G418). Resistant colonies of transfected B16F1 cells were isolated by critical dilution and screened for lumican production. In parallel, mock-transfected cells with empty plasmid were prepared.

Western blot

Proteins secreted into the culture media were concentrated by ethanol precipitation. The samples were reconstituted into 30 µl 100 mM Tris-HCl, pH 7.4. Half of the samples were incubated with 2.5 U/ml N-glycosidase F or 0.005U/ml keratanase II at 37°C overnight [24]. The cell layer was harvested by scraping, followed by centrifugation at 1000 × g and proteins were prepared using the method of Staal et al. [25]. All the samples were separated under reducing conditions in 7.5% polyacrylamide gels [26]. The tumors were homogenised in 50 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.6 and 0.6% NP40 at 4°C containing a cocktail of proteinase inhibitors, and proteins were extracted by overnight gentle agitation. The extracts were centrifuged and the supernatants were collected for protein analysis. The protein concentration was determined by Bradford method [27] and the samples were separated by electrophoresis as above.

Following electrophoresis, proteins were transferred from the polyacrylamide gels to nitrocellulose by electroblotting [28]. The membranes were soaked in TBS-T solution (0.005% Tween 20, 20 mM Tris and 140 mM NaCl, pH 7.6) containing 5% BSA for 2 h. After washing, the membranes were incubated with a rabbit polyclonal anti-human lumican primary antibody [24] at a final dilution of 1:400, or with a rabbit polyclonal anti-mouse Bax primary antibody at a final dilution of 1:1000, for 15 h at 4°C with constant agitation. The membranes were washed with TBS-T and probed with 1:1000 dilution of a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase in a solution of 1% BSA in TBS-T for 30 min at room temperature. The excess of second antibody was washed out by TBS-T and the complexes revealed by the ECL Plus Chemiluminescence Detection kit (Amersham-Pharmacia), as indicated by the manufacturer.

Melanin production

The level of melanin production by wild-type B16F1 cells, mock-transfected B16F1 cells and HLum-transfected B16F1 cells was measured by monitoring the absorbance of solubilised cell extracts [29,30]. Briefly, after detachment by 0.25% trypsin solution, the cells were settled down by centrifugation for 10 min at 1500 × g, then 2 ×

10⁶ cells were resuspended in 500 µl of 0.85-M potassium hydroxide and 10% dimethyl sulfoxide. The samples were incubated at 80°C for 90 min and centrifuged to remove insoluble material. The absorbance was measured at 405 nm.

Cell proliferation, adhesion and spreading

For measuring cell proliferation, mouse melanoma cells (10⁴ cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS) were plated into 24-well plates (0.5 ml per well). At the 3rd day, 10 µl FBS was added into each well. At 0, 3rd and 5th days, the cells were fixed with 1.1% glutaraldehyde for 20 min and stained with crystal violet. The wells were rinsed and air dried. Bound stain was dissolved in 500 µl of 10% acetic acid and the absorbance was measured at 560 nm [31].

Adhesion of the cells was determined by counting the number of cells attached to the substrate after 4 h of incubation in 96 well plates. Matrigel (10 µg/well), or type I collagen from rat tail tendons (10 µg/well) were used for the assays. The wells were saturated with 200 µl of 1% heat-inactivated BSA before adding the substratum. BSA-coated culture plastic was used as control. Two thousand cells were seeded in pre-coated wells. At the end of the incubation period, cells were fixed with methanol and stained using the May-Grunwald-Giemsa reagent. The number of adhered cells was counted for five random fields of observation at ×200 magnification. The percentage of spreaded cells was calculated for the cells adhered to Matrigel and type I collagen [32]. Cells with a cytoplasm diameter equal or larger than the nuclear diameter were considered as spreaded.

Anchorage-independent growth

Soft agar growth assays were carried out in 6-well plates. Each well contained the following layers: a bottom layer of 0.9% agar (1 ml), a middle layer of 0.3% agar (1 ml) containing the cell suspension (5 × 10³ cells/well) and a top layer of 0.9% agar (1 ml). Agar was previously mixed 1:1 with 2 × growth medium (RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS). After 10 days of culture, the number of colonies was counted in triplicate [33,34]. The groups of cells containing no less than 50 cells were considered as colonies.

The colony forming efficiency (CFE) was determined by the formula:

$$\text{CFE} = \frac{(\text{Number of colonies} \times 100)}{\text{Number of seeded cells.}}$$

Cell invasion and migration

The invasive capacity of transfected cells in vitro was probed by the determination of their ability to invade an

artificial basement membrane made of Matrigel. Polycarbonate filters (8 μm pore size, 0.3 cm^2 total filter area) of Transwell device (Coming Costar, Dutscher, Brumath, France) were coated with Matrigel (10 $\mu\text{g}/\text{filter}$) containing or not recombinant human lumican (0, 1 or 10 μg). Then, 5×10^4 cells in 100 μl RPMI-1640 medium supplemented with 0.2% BSA were placed into the upper chamber of the Transwell device. Eight hundred microliters of medium containing 2% BSA and 10% FBS were placed into the lower chamber. After 24 h of incubation, the cells were fixed with methanol for 5 min and stained by the May-Grunwald-Giemsa method. The cells remaining in the upper chamber were removed by cotton swab. Invaded cells were counted on the lower side of the filter. Five random fields at $\times 200$ magnification for every filter were counted [35]. Assay of the cell migration was carried out with the same method using uncoated filters.

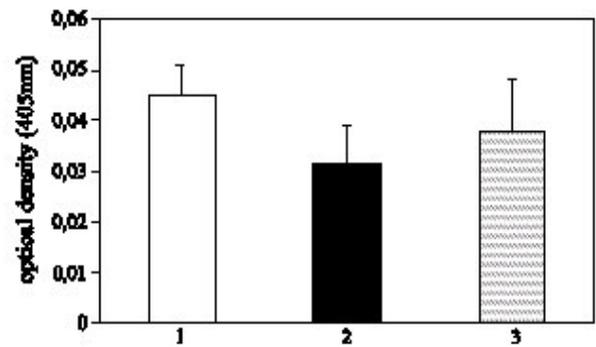


Fig. 2. Melanin content of B16F1 melanoma cells. Wild-type cells (1), mock-transfected cells (2) and cells transfected with HLum (3) were resuspended in potassium hydroxide and dimethyl sulfoxide and processed as described in Materials and methods. The absorbance of melanin was measured at 405 nm. Histograms represent the mean of four clones of two independent triplicate cultures ($\pm 1\text{SD}$).

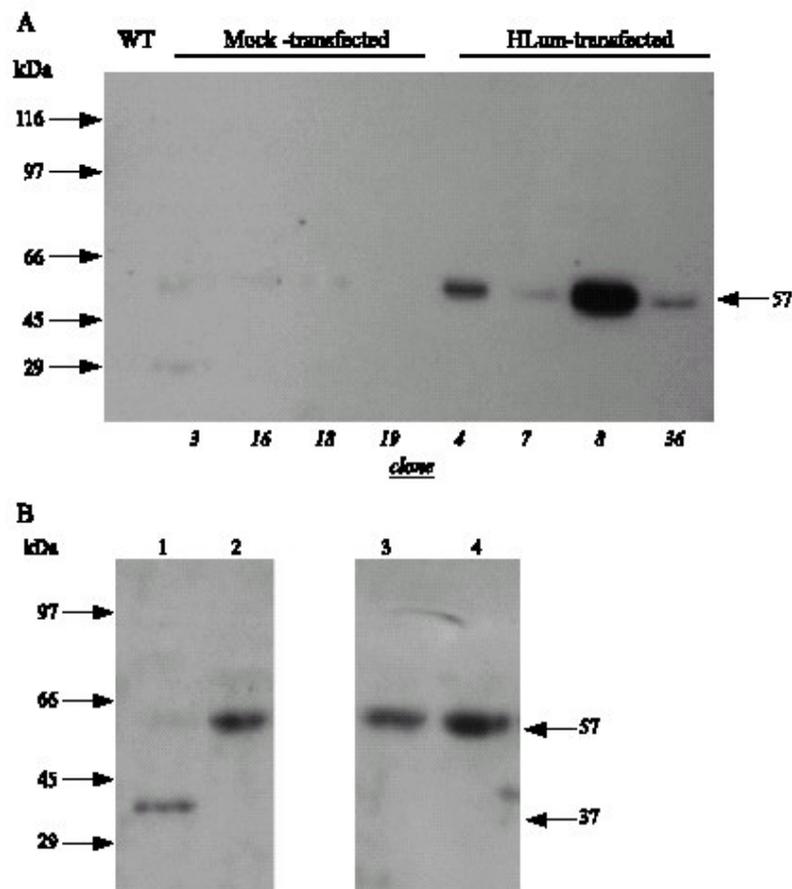


Fig. 1. Western blot analysis of lumican secreted into the medium of B16F1 melanoma cells (A). Total medium proteins from confluent culture of wild-type B16F1, mock-transfected B16F1 (transfected with pcDNA3 vector alone; four clones were studied: 3, 16, 18 and 19), and HLum-transfected B16F1 cells (transfected by pcDNA3-HLum construct, clones: 4, 7, 8 and 36) were separated by SDS-PAGE and transferred into nylon membrane as indicated in Materials and methods. The membrane was probed with an anti-lumican polyclonal antibody. Right arrow indicates the position migration of the M_r approximately 57,000-lumican band in HLum-transfected cells. (B) Digestion of secreted lumican with glycolytic enzymes. Lanes 1 and 4: the medium proteins from HLum-transfected B16F1 cells were digested with N-glycosidase F and Keratanase II, respectively. Lanes 2 and 3: the medium proteins from HLum-transfected B16F1 cells were undigested. The M_r approximately 57,000 and M_r approximately 37,000 lumican bands are indicated on the right margin. The position migration of size markers of 116, 97, 66 and 29 kDa are depicted on the left margin.

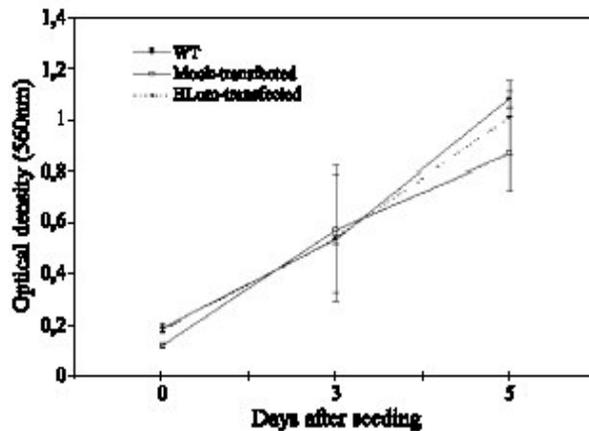


Fig. 3. The proliferative activity of B16F1 melanoma cells in monolayer culture. Wild-type cells, mock-transfected cells and HLum-transfected cells were seeded into 24-well plates. At the indicated times, triplicate dishes were fixed with glutaraldehyde and stained by violet crystal as described in Materials and methods. The bound stain was dissolved in 10% acetic acid and the absorbance measured at 560 nm. Histograms represent the mean \pm 1SD of four clones in two independent triplicate cultures.

Expression and purification of recombinant lumican

Recombinant human lumican core protein was expressed in *Escherichia coli* JM109, DE3 strain (Promega, Charbonnière-les-bains, France). Transformed cells were grown at 37°C in 100 ml of Luria Bertani medium containing 50 μ g of ampicillin/ml until the A_{600nm} was about 0.6. Protein expression was induced by addition of 0.4 mM isopropyl- β -

D-thiogalactopyranoside. After 4 h culture at 37°C under agitation, bacterial suspension was harvested by centrifugation at 4000 \times g for 15 min at 4°C. The pellets were resuspended in 1.5 ml of 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.4. The cells were disrupted by sonication. After centrifugation (3000 \times g, 5 min, room temperature), the pellets were washed with 2 ml 10 mM Tris, pH 8 and vigorously extracted in 8 M urea, pH 8.0, during 30 min, then centrifuged (10000 \times g, 5 min at room temperature). The supernatant was incubated for 1 h with 1 ml of Ni-NTA resin superflow. The resin was put in a chromatography column, washed with 4 ml of the urea buffer pH 6.3 then pH 5.9. Finally, the proteins were eluted with 4 ml of elution solution (8 M urea, pH 4.5). After dialysis against distilled water, the purity of the protein was assessed by SDS-PAGE and by Western blotting using anti-lumican polyclonal antibody.

In vivo tumor growth studies

The mice were subcutaneously injected in the right thigh with 2.5×10^5 HLum-transfected B16F1 cells suspended in 200 μ l RPMI-1640. Control mice were injected with the same number of mock-transfected cells (empty plasmid) or wild-type B16F1 cells, which both do not express lumican. Mice were sacrificed 14 days later for measurement of the tumor size. Tumor volume was calculated using the formula: volume = $a \times b^2 \times 0.5$, where a is the longest diameter and b the shortest [36]. Assays were performed using groups of seven animals each in two independent experiments.

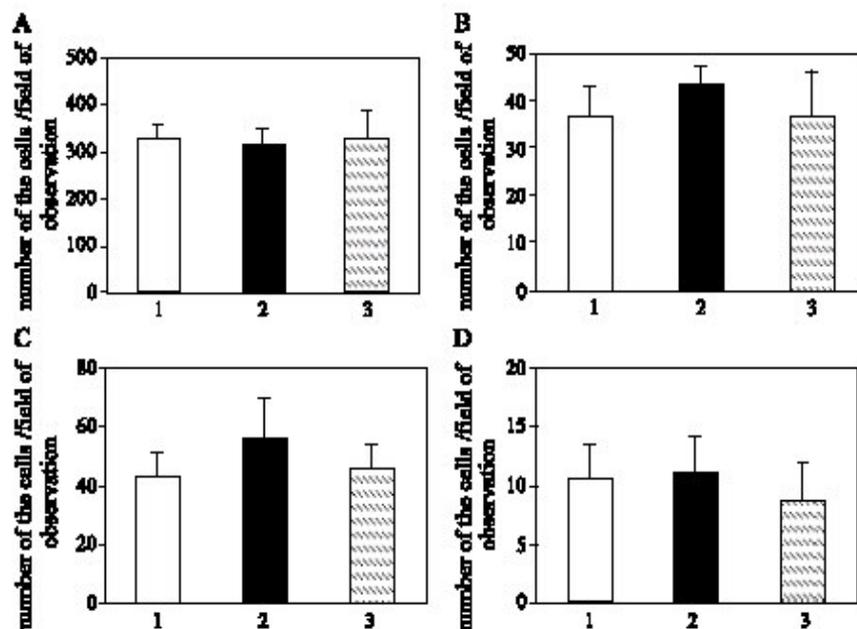


Fig. 4. Attachment and spreading of the B16F1 melanoma cells on different substrata. Wild-type cells (open bars), mock-transfected cells (full bars) or HLum-transfected cells (stippled bars) were seeded on Matrigel (A, C) or type I collagen-coated dishes (B, D) in 96 well plates. After 4 h of incubation, cells were fixed, stained with May-Grundvald-Giemsa method and counted for attachment (A, B) or spreading (C, D) as indicated in Materials and methods. Histograms represent the mean \pm 1SD of four clones in two separate experiments performed in triplicate.

Immunohistochemistry and nuclear morphology

Tissue samples were fixed in 4% fresh paraformaldehyde in PBS, pH 7.2 at 4°C overnight. Specimens were embedded in paraffin and sectioned at 3 µm. After deparaffinisation, the sections were treated with 0.3% H₂O₂ for 10 min at room temperature to block endogenous peroxidase. The slides were heated in a pressure cooking in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0), then washed in PBS buffer and incubated with normal rabbit serum for 20 min at room temperature. The lumican protein was detected using an

anti-lumican rabbit antibody, diluted (1:160) in PBS-1% BSA and incubated at 4°C overnight. The cyclin D1 protein was detected using an anti-cyclin D1 rabbit antibody, diluted (1:100) in PBS-1% BSA, and incubated at 4°C overnight. Sections from a normal dermis were used as positive controls. As negative controls, the tumor sections were incubated in PBS and 1% BSA without antibody. Sections were then washed and incubated with a biotinylated secondary antibody for 45 min at room temperature followed by streptavidin peroxidase. Color development was obtained with 3-amino-9-ethylcarbazole as chromogen (Vector Lab-

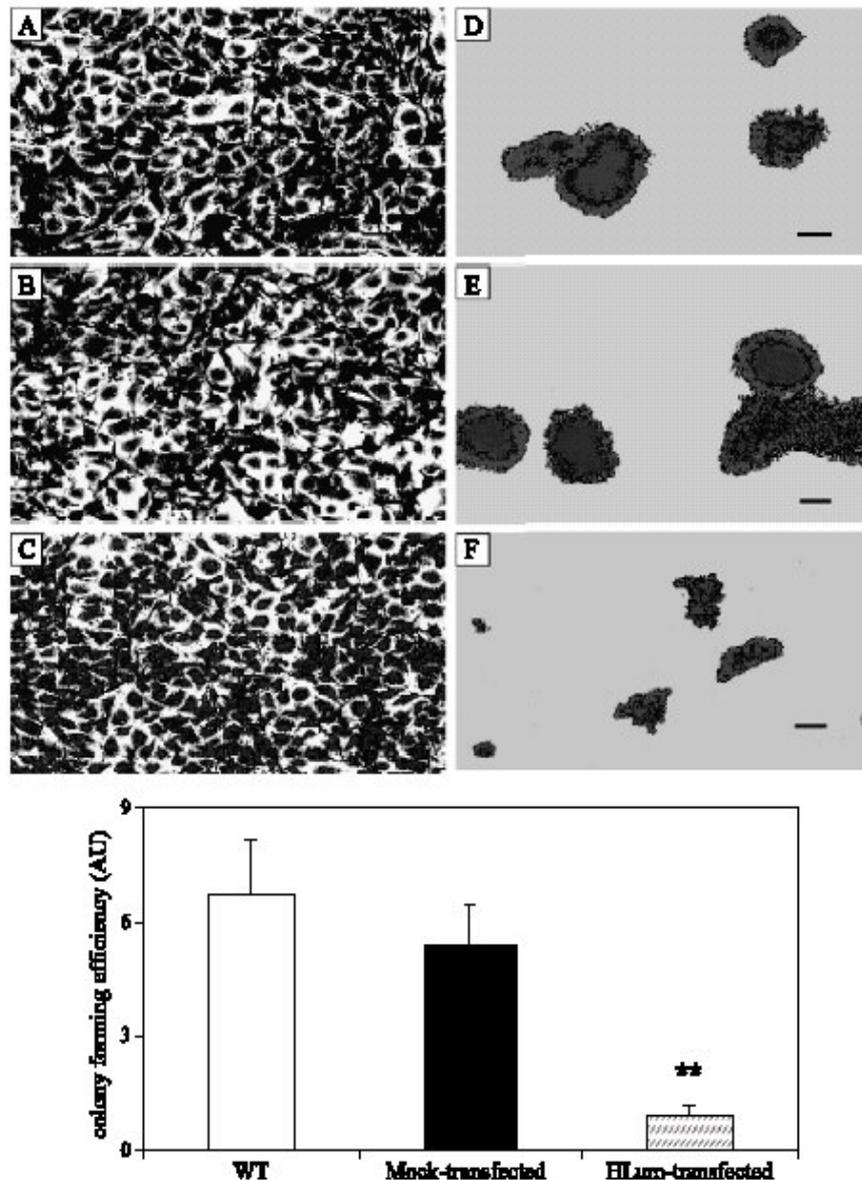


Fig. 5. Lumican expression by B16F1 melanoma cells decreases anchorage-independent cell growth. Cells were plated in monolayer (A, B, C) or in soft agar (D, E, F) as described under Materials and methods. Upper panel: photograph of control cells (A, D), mock-transfected cells (B, E) and cells transfected with HLum (C, F) after 10 days of culture. Cells were stained by the May-Grundvald-Giemsa method (scale bars, 20 µm). Lower panel: quantification of colony-forming efficiency (10 days of culture). The ratio of colonies number per 100 seeded cells was calculated for wild-type cells (open bar), mock-transfected cells (full bar) or HLum-transfected cells (stippled bar). Histograms represent the mean \pm 1SD of three clones in three different experiments performed in triplicate, **: significantly lower than wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells, $P < 0.01$.

oratories, Burlingame, CA), which gives a dark-red reaction product. The tumor sections were counterstained with Harris Hematoxyline (blue).

Positive immunohistochemical reaction of cyclin D1 was evaluated using a light microscope taking into account the staining of the nuclei only. At least 1000 cells were counted in each section, the percentage of stained cells was evaluated two times independently by two different investigators.

For nuclear staining, cells were washed with PBS, pH 7.2, treated with Hoechst 33342 (50 µg/ml) in PBS for 30 min at 37°C and observed in a Nikon Eclipse TE 300 fluorescence microscope. Cells pictures were captured through CCD-camera (Nikon DXM 1200). We evaluated the cells from their nuclear morphology.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation. For in vitro experiments, statistical significance between groups was assessed by unpaired Student's *t* test. Statistical analysis of in vivo tumor growth was performed using the non-parametric Mann–Withney *U* rank sum test. The *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Transfection and characterisation of lumican into B16F1 mouse melanoma cells

B16F1 mouse melanoma cells were used as a model for the study of melanoma invasion and metastasis [29,37,38]. Western blot analysis (Fig. 1A, WT) showed that wild-type B16F1 cells do not express lumican core protein. Moreover,

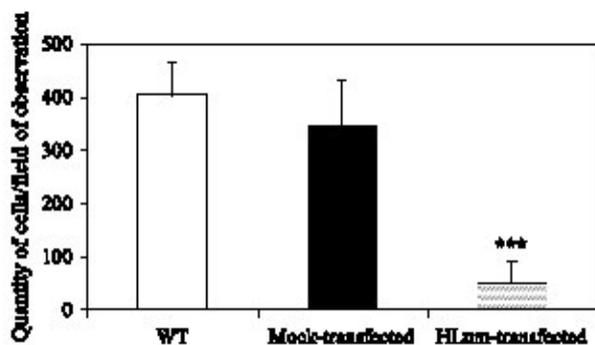


Fig. 6. Lumican expression decreases the migration of B16F1 melanoma cells through uncoated Transwell filter. Wild-type cells (open bars), mock-transfected cells (full bars) or cells transfected with HLum (stippled bars) were seeded into the upper chamber of Transwell. The number of cells, which crossed through the filter was determined in five random fields of observation at magnification $\times 200$, after 24 h of incubation at 37°C and staining by the May-Grundvald-Giemsa method. Histograms represent the mean \pm 1SD of two independent experiments performed in triplicate with four different clones. ***: Significantly lower than wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells, *P* < 0.001.

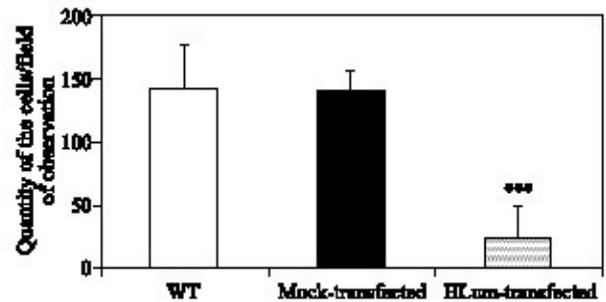


Fig. 7. Lumican expression decreases the ability of B16F1 melanoma cells to invade Matrigel. Wild-type cells (open bars), mock-transfected cells (full bars) or cells transfected with HLum (stippled bars) were seeded into the upper chamber of Transwell. The number of cells, which crossed through the Matrigel-coated filter was determined in five random fields of observation at magnification $\times 200$, after 24 h of incubation at 37°C and staining by the May-Grundvald-Giemsa method. Histograms represent the mean \pm 1SD of two independent experiments performed in triplicate with four different clones. ***: Significantly lower than wild-type (WT) and mock-transfected B16F1 cells, *P* < 0.001.

no lumican mRNA was observed in these cells by Northern blot analysis (data not shown).

To study the effects of lumican expression on the properties of melanoma cells, we transfected B16F1 cells with an expression plasmid containing the full-length human lumican cDNA (HLum) or with an empty plasmid (mock-transfected cells). Western blot analysis of four clones stably transfected with human lumican cDNA (clones 4, 7, 8 and 36) showed lumican secretion into the medium of B16F1 melanoma cells under the form of M_r approximately 57,000 band which corresponds to the glycosylated form of lumican [24]. No lumican was secreted by mock-transfected cells (clones 3, 16, 18 and 19; Fig. 1A). Treatment of the newly secreted proteins with keratanase II did not influence the migration of the M_r approximately 57,000 band (Fig. 1B, lanes 3 and 4). On the contrary, treatment with N-glycosidase F (Fig. 1B, lane 1 and 2) decreased its size to M_r approximately 37,000, which corresponds to the size of the lumican core protein. These results indicate that HLum-transfected cells produce lumican under its glycoprotein form. No difference of cell morphology was observed for the lumican-expressing clones as compared to that which integrated the empty plasmid (mock-transfected cells) or the wild-type, non-transfected cells.

To determine if lumican expression can change the level of differentiation of mouse melanocytes, melanin synthesis by B16F1 cells was measured. There was no difference of melanin content between the wild-type B16F1, mock-transfected B16F1 and HLum-transfected B16F1 cells (Fig. 2).

Lumican does not influence cell adhesion, spreading and growth in monolayer culture

To further determine the influence of lumican on cell physiology, the proliferation activity of wild-type B16F1, HLum-transfected B16F1 and mock-transfected B16F1 cells

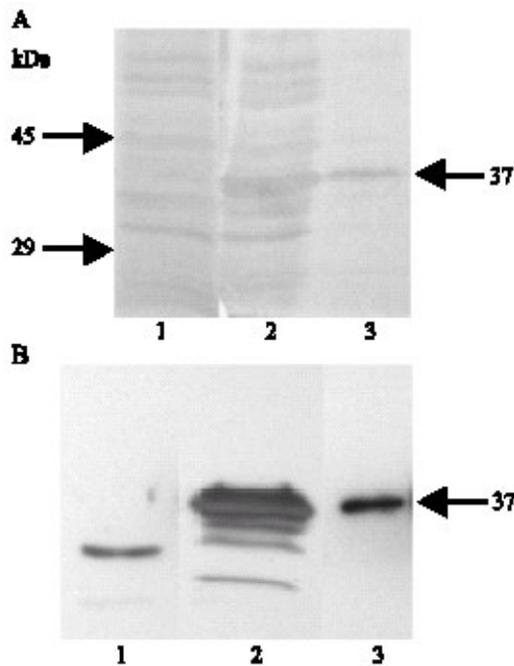


Fig. 8. Production and purification of human recombinant lumican. SDS-PAGE electrophoresis of *Escherichia coli* lysate transfected with pQE30 vector alone (lane 1), or with pQE30-HLum vector (lane 2) and of the purified fraction obtained after Ni-NTA chromatography (lane 3) stained with Coomassie blue (A) or revealed with anti-lumican (B). Right arrows indicate the position migration of the M_r approximately 37,000 lumican core protein. The position migration of size markers of 45 and 29 kDa are depicted on the left margin.

was examined. There was no significant difference of proliferation in lumican-expressing B16F1, wild-type B16F1 and mock transfected B16F1 cells in monolayer culture (Fig. 3).

We tested the influence of lumican expression on cell adhesion to Matrigel and type I collagen. The number of adhered cells after 4 h of incubation did not differ significantly for lumican-expressing B16F1, wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells (Figs. 4A and B), indicating that lumican expression did not influence cell adhe-

sion neither on plastic (not shown) nor on Matrigel or type I collagen. There was no significant difference between the percentage of spreaded cells (Figs. 4C and D). All these results indicate that transfected cells kept similar morphology and growth rate in monolayer as wild-type cells.

Lumican expression inhibits anchorage-independent growth

In contrast to monolayer cultures (Figs. 5A, B and C), there was a prominent effect of lumican expression on cell growth in soft agar. The number and size of colonies formed by the lumican-expressing cells were significantly decreased in comparison with colonies formed by wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells (Figs. 5D, E and F). Moreover, in this last case, most of the colonies had an irregular shape and were smaller than the colonies from wild-type and mock-transfected cells. Colony forming efficiency (CFE) of wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells was 6.7 ± 1.4 and 5.4 ± 1.0 , respectively, while CFE for lumican-expressing B16F1 cells was decreased to 0.9 ± 0.3 ($P < 0.01$) (Fig. 5, lower panel).

Lumican expression significantly decreases cell migration and invasion through ECM gel

To estimate the migratory potential of mouse melanoma cells transfected with lumican, we determined the ability of the cells to migrate through non-covered Transwell filter. The number of lumican-expressing B16F1 cells which were able to cross the filter was significantly decreased in comparison with wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells (Fig. 6). The mock-transfected cells retained a capacity to migrate through non-covered filter similar to that of non-transfected cells, indicating that transfection by itself, and acquired resistance for neomycine, did not change their migration potential. The mean number of lumican-expressing B16F1 cells migrated through the uncoated filter was 49 ± 40 per counted field versus 400 ± 60 and 340 ± 90 ,

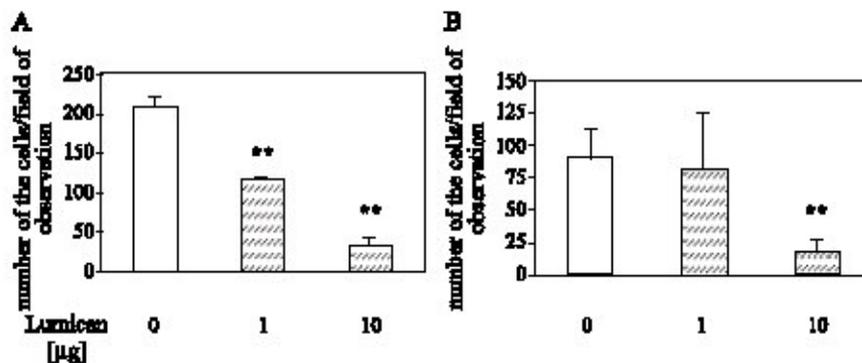


Fig. 9. Recombinant lumican decreases B16F1 melanoma cell migration and Matrigel invasion. Wild-type B16F1 cells were seeded into the upper chamber of Transwell device. Filters were coated either with recombinant lumican 0, 1 or 10 μg (A) or with a mixture of 10 μg Matrigel and 0, 1 or 10 μg recombinant lumican (B). The number of cells, which crossed through filter was determined in five random fields of observation at magnification $\times 200$, after 24 h of incubation at 37°C and staining by the May-Grundvald-Giemsa method. Histograms represent the mean \pm 1SD of triplicate experiments. **: Significantly lower than control (0 μg recombinant lumican), $P < 0.01$.

respectively, for wild-type and mock-transfected B16F1 cells ($P < 0.001$). The same effect of lumican expression was detected for invasion of mouse melanoma cells through Matrigel, an analogue of basement membrane, in Transwell filter assays (Fig. 7). The mean number of lumican-expressing B16F1 cells which invaded the Matrigel was 24.5 ± 25 per field of observation, whereas for wild-type and mock-transfected B16F1 cells, the number of invaded cells was 142.5 ± 36.5 and 142 ± 15.5 , respectively ($P < 0.001$). These results indicate that lumican expression inhibits the migratory potential of melanoma cells as well through the Transwell filter alone as covered with Matrigel.

Recombinant lumican reproduces the inhibiting effect of lumican expression on B16F1 cell migration and Matrigel invasion

Recombinant human lumican core protein was produced in *E. coli*, (JM109 DE3), and purified by affinity chromatography on Ni-NTA resin superflow column. The Western blot analysis showed lumican expression by the HLum-transfected bacteria (Fig. 8). The observed M_r approximately 37,000 protein band corresponded to the non-glycosylated core protein of lumican [24]. For invasion and migration

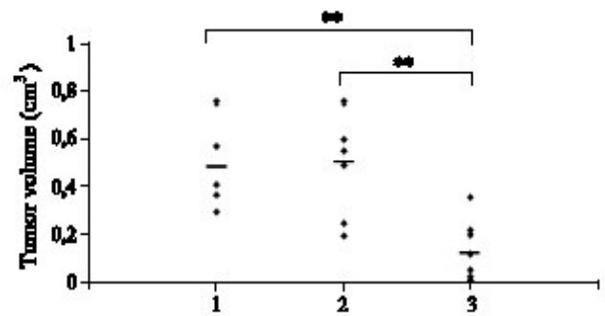


Fig. 11. Lumican-expression decreases the tumorigenicity of B16F1 melanoma cells in vivo. Tumors were generated by subcutaneous injection of 2.5×10^5 wild-type cells (1), mock-transfected cells (2), or HLum-transfected B16F1 cells (3), as described under Materials and methods. Tumor volume was measured at 14 days after injection. **: Significantly different from wild-type and mock-transfected B16F1 cell tumors, $P < 0.01$.

studies, Transwell filters were coated with purified recombinant lumican alone (0, 1 or 10 μg) or with a mixture of Matrigel (10 μg) and lumican (0, 1 or 10 μg). When the filter was coated with recombinant lumican alone, a significant inhibition of cell migration was already observed with 1 μg lumican added (Fig. 9A). When the filter was coated with a mixture of Matrigel and lumican, the number of

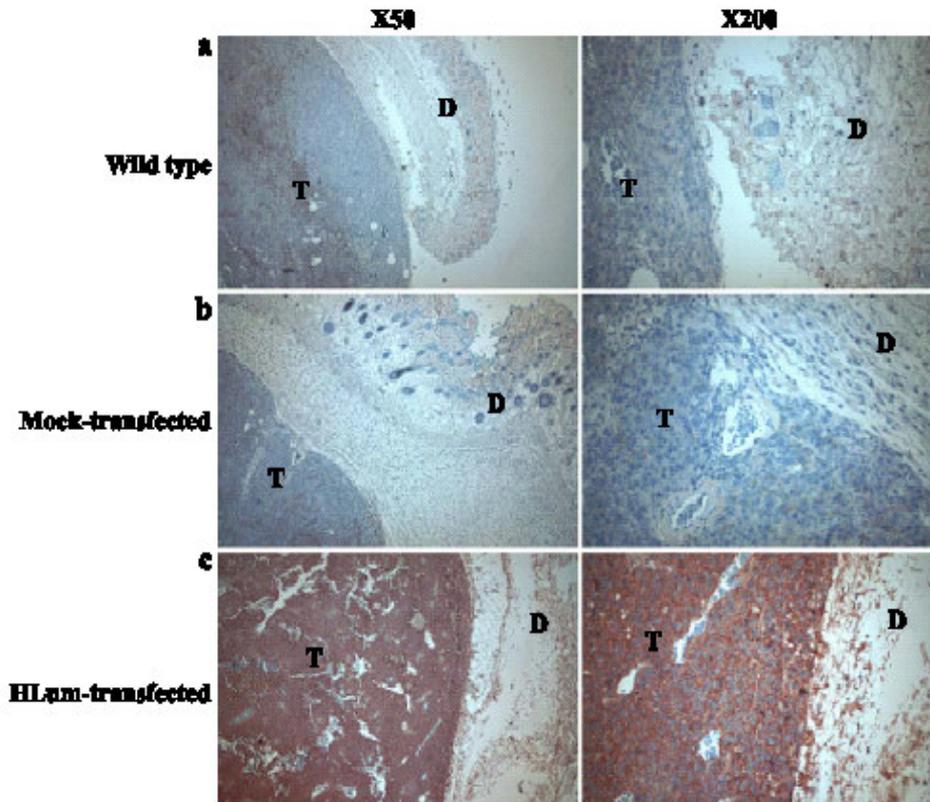


Fig. 10. Tumors from HLum-transfected B16F1 melanoma cells strongly express lumican. Tumors were generated by subcutaneous injection of 2.5×10^5 wild-type (a), mock-transfected (b), or HLum-transfected cells (c) in the right thigh of syngenic C57BL/6 mice, as described under Materials and methods. Immunohistochemical study was performed using a polyclonal anti-lumican antibody. Intense staining was found in tumors (T) from HLum-transfected cells whereas only a faint staining of the normal dermis (D) and tumor stroma was observed in the tumors from wild-type and mock-transfected cells. Magnification $\times 50$ (first column), magnification $\times 200$ (second column).

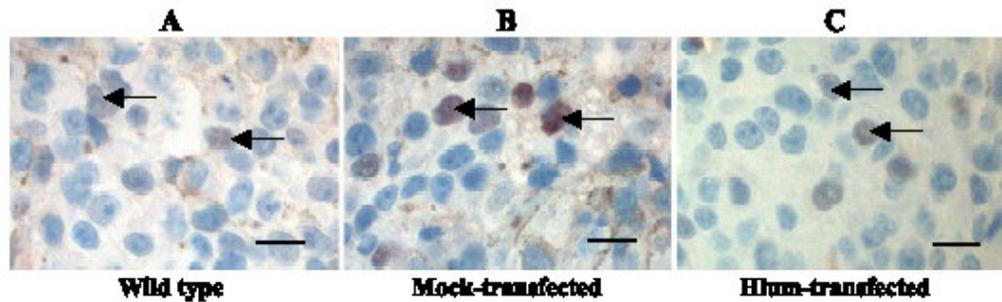


Fig. 12. Expression of cyclin D1 in tumors. Tumors were generated by subcutaneous injection of 2.5×10^5 wild-type, mock-transfected, or HLum-transfected cells in the right thigh of syngenic C57BL6 mice, as described under Materials and methods. Immunohistochemical staining of cyclin D1 showed multiple strongly stained nuclei in control tumors (A, B) whereas few weakly stained cell nuclei were observed in tumors from HLum-transfected cells (C) (scale bars, 10 μ m).

invaded cells was significantly decreased when 10 μ g of recombinant lumican were mixed with Matrigel (Fig. 9B). These results indicate that recombinant lumican decreases the migratory potential of melanoma cells as well through the filter alone as through Matrigel.

Lumican expression decreases the tumorigenicity of B16F1 melanoma cells in vivo

To confirm the inhibiting influence of lumican on tumor growth in vivo, C57BL6 syngenic mice were injected subcutaneously with 2.5×10^5 cells, either wild-type, mock-transfected or lumican-expressing B16F1 cells. The

mice developed local tumors after 8 days. The developing tumor did not influence the viability and food intake of animals up to 21 days. Tumors were excised 14 days after inoculation for analysis.

Immunohistochemical study (Fig. 10) showed that tumors developed from HLum-transfected B16F1 cells contained an important amount of lumican (Fig. 10c), whereas wild-type and mock-transfected cells did not (Figs 10a and b). A faint staining was also observed in the normal dermis and in the tumor stroma.

Lumican-expressing B16F1 cells produced significantly smaller tumors when compared with wild-type cells and mock-transfected cells (Fig. 11). The average tumor size

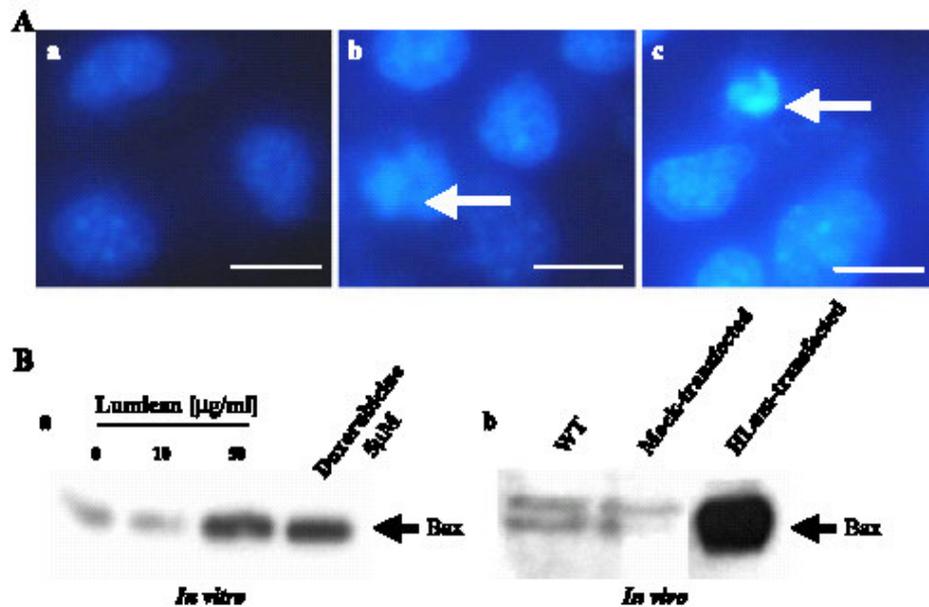


Fig. 13. A—effects of recombinant lumican on nuclear morphology. Wild-type B16F1 cells (2×10^4 /well) were plated into 24-well plates and incubated at 37° C for 16 h without or with recombinant lumican, then stained with Hoechst 33342. (a) Non-treated B16F1 cells (control). Note the homogeneous distribution of the chromatin in the nucleus. (b and c) Lumican-treated B16F1 cells (b:10 μ g/ml; c:50 μ g/ml). Note the condensed chromatin at the nuclear periphery and fragmented nuclei (arrows) (scale bars, 5 μ m). B—effects of lumican on Bax expression. (a) Wild-type B16F1 cells were incubated for 16 h without (controls) or with 10 or 50 μ g/ml recombinant lumican, or with 50 μ M Doxorubicine. At the end of the incubation period, cells were collected and homogenised and Bax expression evaluated by Western blot. The membrane was probed with an anti-Bax polyclonal antibody. Right arrow indicates the position migration of the M_r approximately 20,000 Bax band. (b) Tumors obtained 14 days after subcutaneous injection of wild-type, mock-transfected (controls) or HLum-transfected B16F1 cells were collected and homogenised, as described in Materials and methods. Bax expression was evaluated by Western blot.

was decreased by approximately 50% ($P < 0.01$), when HLum-transfected cells were used. By contrast, mock-transfected B16F1 cells produced tumors of the same size than wild-type cells.

Effect of lumican on cell cycle progression and apoptosis

Cell cycle progression is tightly regulated through a complex network of positive and negative cell cycle regulatory molecules, such as Cdks, cyclins and Cdk inhibitors [39]. In this study, we examined the expression of cyclin D1, known to play a major role in the control of cell cycle progression [40], in the tumors generated by wild-type, mock-transfected and HLum-transfected B16F1 cells. Positive labelling for cyclin D1 was observed in $40.3 \pm 2.8\%$, $41 \pm 3.0\%$ and $29.6 \pm 1.4\%$ of the cell nuclei of these tumors, respectively, indicating a significant ($P < 0.001$) inhibition of cyclin D1 expression in tumors generated by HLum-transfected cells (Fig. 12C), compared to the wild-type and mock-transfected ones (Figs. 12A and B).

The ability of recombinant lumican to induce apoptosis in B16F1 cell was determined by fluorescence microscopy using cells stained with Hoechst-33342 (Fig. 13). Control cells contained a round nucleus with homogeneous chromatin (Fig. 13A(a)). After exposure to recombinant lumican at the concentrations 10 and 50 $\mu\text{g/ml}$ for 16 h, B16F1 cells showed morphologic changes typical of apoptosis, such as cytoplasmic and nuclear shrinkage and chromatin condensation or fragmentation (Fig. 13A). Chromatin condensation and fragmentation was also detectable in the tumors generated by subcutaneous injection with wild-type cells, mock-transfected cells or HLum-transfected B16F1 cells (data not shown). It was not possible to accurately quantify the chromatin condensation in the tumors, however, due to the presence of necrosis area.

To further explore the effects of recombinant lumican, we performed Western blot analysis of Bax expression in B16F1 cells pre-treated with recombinant lumican at the concentration 10 and 50 $\mu\text{g/ml}$ for 16 h (Fig. 13B, panel a). The levels of Bax were up-regulated in cells treated by recombinant lumican 50 $\mu\text{g/ml}$ for 16 h. Increased Bax expression was also found in vivo in the tumors obtained with HLum-transfected cells (Fig. 13B, panel b).

Taken together, our results indicate that lumican can decrease the melanoma growth in vivo as in vitro by decreasing cell cycle, but also the melanoma progression by inducing and/or increasing the apoptosis of tumor cells.

Discussion

In the present study, we demonstrated that lumican expression inhibits some essential characteristics of melanoma cells in vitro and melanoma tumor growth in vivo. Previous studies demonstrated the presence of lumican in different types of cancer, including breast carcinoma [41],

pancreatic and colorectal cancers [14]. In breast tumors, lumican expression was inversely correlated with cancer progression. Reduced expression of lumican and decorin was correlated with poor outcome of invasive cancer [16]. The expression of SLRP molecules, including lumican, was proposed as a tissue defence mechanism against invading malignant cells [42]. The most studied SLRP molecule with anti-oncogenic effect was decorin. The ectopic expression of this proteoglycan or its addition to the culture medium retarded numerous cancer cell lines growth in monolayer culture, without affecting the growth of non-transformed cells [43,44]. When injected into tumor or ectopically expressed, decorin-limited cancer expansion [45]. The mechanism of decorin action was partially elucidated since this proteoglycan can bind and neutralise the EGF receptor [20] and stimulate the expression and activity of p21^{CIP1/WAF1} Cdk inhibitor [44].

Lumican-transfected B16F1 cells secreted much lumican both in vitro and in vivo. A faint expression of lumican was also found in normal dermis, tumor stroma and in the blood vessels. Such localization was already reported [46]. Lumican expression by B16F1 cells significantly inhibited hypodermal melanoma growth in syngenic mice and the anchorage-independent growth of these cells in soft agar. Lumican did not, however, change the B16F1 cell differentiation, their growth rate in monolayer culture and their adhesion or spreading on plastic, Matrigel or type I collagen. These characteristics contrast with that of decorin, which was shown to inhibit proliferation in monolayer culture by arresting the cells in G1 phase [44]. Expression of lumican in growing tumors inhibited the expression of cyclin D1, the major cyclin controlling Cdk activation and regulation of cell cycle progression [39]. These results suggest that the mechanism of action of lumican on melanoma cells is different from that of decorin. Decorin may act on individual cells even at distance, while lumican action was observed in growing tumors only, suggesting the influence of stromal components against cell invasion. We showed that lumican expression can substantially inhibit cell migration and cell invasion through an in vitro reconstituted basement membrane, like Matrigel. Melanoma progression in pre-metastatic phase is characterized by vertical growth through the basement membrane, with penetration into the underlying dermal tissue [2]. The extent of vertical growth is directly correlated with the poor prognosis of this tumor [47].

Many cell–matrix and cell–cell interactions are implicated in the progression and growth of the tumor [48]. B16F1 melanoma cells express different integrins, including vitronectin and fibronectin receptors, which are involved in cell migration [49]. The expression of integrins and their interaction with extracellular matrix macromolecules are necessary for proliferation and invasion of solid tumors [50,51]. On the contrary, anti-adhesive molecules expressed on the cell surface, for example, the chondroitin sulfate NG2 proteoglycan, are able to enhance melanoma growth [29]. Lumican secreted by HLum-transfected B16F1 melanoma

cells was devoid of keratan sulphate chains but was in glycosylated form, as judged by its resistance and susceptibility to digestion by keratanase and N-glycosidase F, respectively (Fig. 1B). These data, together with that obtained with recombinant lumican, indicate that the lumican core protein was responsible for the observed effects. The inhibition of cell migration and invasion by lumican suggests that the molecule may influence the integrin signalling pathway, as it was shown for CD44 [52]. This proteoglycan regulates the interaction of $\alpha 4 \beta 1$ integrin with fibronectin and thus adhesion-mediated growth control [53,54].

Another way of controlling the tumor progression is the induction of apoptosis. Many anti-tumor drugs have pro-apoptotic effects [55]. Indeed, lumican increased Bax expression *in vitro* and *in vivo*, and chromatin condensation *in vitro*, as observed after Hoechst-33342 staining. Our results suggest that, in addition to the inhibition of cell migration/invasion, lumican triggers apoptotic pathway. Bax is a major pro-apoptotic cytoplasmic factor, which may be activated either by the Bid pathway or directly by DNA damage [56]. The way by which lumican induces apoptosis in melanoma cells has to be established.

The growth of melanoma cells involves different growth factors. Interleukin-6, PDGF, bFGF and TGF- β are necessary for tumor progression [57]. Lumican, as other SLRP molecules, may neutralise TGF- β [18]. It was recently shown that TNF α may also interact with SLRP [58]. Apart interactions with some cell surface proteins, necessary for movement-dependent cell growth, lumican might also control the availability of growth factors. It was shown that growth factor depletion stress may also trigger the apoptotic pathway [59]. Studies are in progress to elucidate the detailed mechanism of lumican action on melanoma development and progression. As decorin, lumican can be considered as an extracellular protein, which controls tumor growth.

Acknowledgments

This work was supported by grants from ARERS (Association Régionale pour l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique et Technologique en Champagne-Ardenne), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Haute-Marne), the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Reims Champagne-Ardenne. We thank Pr M. Pluot (EA 3306, IFR53 Biomolécules, Reims, France) for providing technical facilities and Dr P. Roughley (Genetic unit, Mc Gill University, Montreal) for providing anti-lumican antibodies and pCR[®] 2.1-TOPO vector.

References

- [1] D.E. Elder, Skin cancer. Melanoma and other specific nonmelanoma skin cancers, *Cancer* 75 (1995) 245–256.
- [2] C. Balch, A. Houghton, S.-J.A. Soong, Cutaneous Melanoma, 3rd edition, Quality Medical Publishing, St. Louis, 1998.
- [3] L. Barnhill, N. Crowson, K. Busam, S. Granter, Textbook of Dermatopathology, 1998, McGraw-Hill, New York.
- [4] S. Suster, Hyalinizing spindle and epithelioid cell nevus. A study of five cases of a distinctive histologic variant of Spitz's nevus, *Am. J. Dermatopathol.* 16 (1994) 593–598.
- [5] D. Ruiter, T. Bogenrieder, D. Elder, M. Herlyn, Melanoma–stroma interactions: structural and functional aspects, *Lancet Oncol.* 3 (2002) 35–43.
- [6] R.V. Iozzo, The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 32 (1997) 141–174.
- [7] K.G. Danielson, H. Baribault, D.F. Holmes, H. Graham, K.E. Kadler, R.V. Iozzo, Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility, *J. Cell Biol.* 136 (1997) 729–743.
- [8] T. Xu, P. Bianco, L.W. Fisher, G. Longenecker, E. Smith, S. Goldstein, J. Bonadio, A. Boskey, A.M. Heegaard, B. Sommer, K. Satomura, P. Dominguez, C. Zhao, A.B. Kulkarni, P.G. Robey, M.F. Young, Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice, *Nat. Genet.* 20 (1998) 78–82.
- [9] S. Chakravarti, T. Magnuson, J.H. Lass, K.J. Jepsen, C. LaMantia, H. Carroll, Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican, *J. Cell Biol.* 141 (1998) 1277–1286.
- [10] G. Schmidt, H. Robenek, B. Harrach, J. Gloszl, V. Nolte, H. Hormann, H. Richter, H. Kresse, Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin, *J. Cell Biol.* 104 (1987) 1683–1691.
- [11] J.R. Hassell, D.A. Newsome, J.H. Krachmer, M.M. Rodrigues, Macular corneal dystrophy: failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77 (1980) 3705–3709.
- [12] Y. Ping Lu, T. Ishiwata, G. Asano, Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells, *J. Pathol.* 196 (2002) 324–330.
- [13] J.A. Rada, P.K. Comuet, J.R. Hassell, Regulation of corneal collagen fibrillogenesis *in vitro* by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins, *Exp. Eye Res.* 56 (1993) 635–648.
- [14] Y.P. Lu, T. Ishiwata, K. Kawahara, M. Watanabe, Z. Naito, Y. Moriyama, Y. Sugisaki, G. Asano, Expression of lumican in human colorectal cancer cells, *Pathol. Int.* 52 (2002) 519–526.
- [15] E. Leygue, L. Snell, H. Dotzlaw, S. Troup, T. Hiller-Hitcheck, L.C. Murphy, P.J. Roughley, P.H. Watson, Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma, *J. Pathol.* 192 (2000) 313–320.
- [16] S. Troup, C. Njue, E.V. Kliever, M. Parisien, C. Roskelley, S. Chakravarti, P.J. Roughley, L.C. Murphy, P.H. Watson, Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 207–214.
- [17] A.M. Hocking, T. Shinomura, D.J. McQuillan, Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix, *Matrix Biol.* 17 (1998) 1–19.
- [18] A. Hildebrand, M. Romaris, L.M. Rasmussen, D. Heinegard, D.R. Twardzik, W.A. Border, E. Ruoslahti, Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta, *Biochem. J.* 302 (Pt. 2) (1994) 527–534.
- [19] M.A. Nash, A.E. Loercher, R.S. Freedman, *In vitro* growth inhibition of ovarian cancer cells by decorin: synergism of action between decorin and carboplatin, *Cancer Res.* 59 (1999) 6192–6196.
- [20] R.V. Iozzo, D.K. Moscatello, D.J. McQuillan, I. Eichstetter, Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 4489–4492.
- [21] J.G. Tralhao, L. Schaefer, M. Micegova, C. Evaristo, E. Schonherr, S. Kayal, H. Veiga-Fernandes, C. Danel, R.V. Iozzo, H. Kresse, P. Lemarchand, *In vivo* selective and distant killing of cancer cells using

- adenovirus-mediated decorin gene transfer, *FASEB J.* 17 (2003) 464–466.
- [22] C.K. Weber, G. Sommer, P. Michl, H. Fensterer, M. Weimer, F. Gansauge, G. Leder, G. Adler, T.M. Gress, Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines, *Gastroenterology* 121 (2001) 657–667.
- [23] W.B. Chen, W. Lenschow, K. Tiede, J.W. Fischer, H. Kalthoff, H. Ungefroren, Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 36118–36128.
- [24] J. Grover, X.N. Chen, J.R. Korenberg, P.J. Roughley, The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21942–21949.
- [25] F.J. Staal, M. Roederer, L.A. Herzenberg, Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 9943–9947.
- [26] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [28] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 4350–4354.
- [29] M.A. Burg, K.A. Grako, W.B. Stallcup, Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells, *J. Cell. Physiol.* 177 (1998) 299–312.
- [30] H. Kosano, T. Kayanuma, H. Nishigori, Stimulation of melanogenesis in murine melanoma cells by 2-mercapto-1-(beta-4-pyridethyl) benzimidazole (MPB), *Biochim. Biophys. Acta* 1499 (2000) 11–18.
- [31] H. Wang, T.B. Ng, V.E. Ooi, W.K. Liu, Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32 (2000) 365–372.
- [32] W.O. Tsal, A. Czirok, B. Hegedus, C. Knaak, M.R. Chintalapudi, H. Okagawa, Y. Sugi, W.S. Argraves, Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 4587–4598.
- [33] R.M. Niles, R. Combs, The relationship between susceptibility to retinoic acid treatment and protein kinase C alpha expression in murine melanoma cell lines, *Exp. Cell Res.* 223 (1996) 20–28.
- [34] M. Gu, K. Meng, P.W. Majerus, The effect of overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG on cell growth and on colony formation in soft agar in COS-7 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 12980–12985.
- [35] W. Zhao, H. Liu, S. Xu, F. Entschladen, B. Niggemann, K.S. Zanker, R. Han, Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase, *Cancer Lett.* 162 (2001) S49–S55 (Suppl.).
- [36] M. Wald, T. Olejar, V. Sebkova, M. Zadinova, M. Boubelik, P. Pouckova, Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47 (2001) S16–S22 (Suppl.).
- [37] D. Hangan, V.L. Morris, L. Boeters, C. von Ballestrem, S. Uniyal, B.M. Chan, An epitope on VLA-6 (alpha6beta1) integrin involved in migration but not adhesion is required for extravasation of murine melanoma B16F1 cells in liver, *Cancer Res.* 57 (1997) 3812–3817.
- [38] K.R. Gehlsen, M.J. Hendrix, In vitro assay demonstrates similar invasion profiles for B16F1 and B16F10 murine melanoma cells, *Cancer Lett.* 30 (1986) 207–212.
- [39] O. Coqueret, Linking cyclins to transcriptional control, *Gene* 299 (2002) 35–55.
- [40] R.L. Sutherland, E.A. Musgrove, Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models, *Breast Cancer Res.* 4 (2002) 14–17.
- [41] E. Leygue, L. Snell, H. Dotzlaw, K. Hole, T. Hiller-Hitcheck, P.J. Roughley, P.H. Watson, L.C. Murphy, Expression of lumican in human breast carcinoma, *Cancer Res.* 58 (1998) 1348–1352.
- [42] R.V. Iozzo, I. Cohen, Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma, *Experientia* 49 (1993) 447–455.
- [43] M. Santra, T. Skorski, B. Calabretta, E.C. Lattime, R.V. Iozzo, De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7016–7020.
- [44] M. Santra, D.M. Mann, E.W. Mercer, T. Skorski, B. Calabretta, R.V. Iozzo, Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 149–157.
- [45] C.C. Reed, J. Gauldie, R.V. Iozzo, Suppression of tumorigenicity by adenovirus-mediated gene transfer of decorin, *Oncogene* 21 (2002) 3688–3695.
- [46] J.L. Funderburgh, M.L. Funderburgh, M.M. Mann, G.W. Conrad, Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 24773–24777.
- [47] J.M. Karjalainen, M.J. Eskelinen, S. Nordling, P.K. Lipponen, E.M. Alhava, V.M. Kosma, Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant melanoma, *Br. J. Cancer* 77 (1998) 1917–1925.
- [48] W. Homebeck, H. Emonard, J.C. Monboisse, G. Bellon, Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression, *Semin. Cancer Biol.* 12 (2002) 231–241.
- [49] D.M. Ramos, E.D. Berston, R.H. Kramer, Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells, *Cancer Res.* 50 (1990) 728–734.
- [50] E. Ruoslahti, Structure and biology of proteoglycans, *Annu. Rev. Cell Biol.* 4 (1988) 229–255.
- [51] I.R. Hart, M. Birch, J.F. Marshall, Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis, *Cancer Metastasis Rev.* 10 (1991) 115–128.
- [52] J.R. Knutson, J. Iida, G.B. Fields, J.B. McCarthy, CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes, *Mol. Biol. Cell* 7 (1996) 383–396.
- [53] C.M. Verfaillie, A. Benis, J. Iida, P.B. McGlave, J.B. McCarthy, Adhesion of committed human hematopoietic progenitors to synthetic peptides from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin: cooperation between the integrin alpha 4 beta 1 and the CD44 adhesion receptor, *Blood* 84 (1994) 1802–1811.
- [54] R.W. Hurley, J.B. McCarthy, E.A. Wayner, C.M. Verfaillie, Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation, *Exp. Hematol.* 25 (1997) 321–328.
- [55] Z. Huang, Bel-2 family proteins as targets for anticancer drug design, *Oncogene* 19 (2000) 6627–6631.
- [56] J.M. Adams, Ways of dying: multiple pathways to apoptosis, *Genes Dev.* 17 (2003) 2481–2495.
- [57] I.M. Shih, M. Herlyn, Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma, *In Vivo* 8 (1994) 113–123.
- [58] E. Tufvesson, G. Westergren-Thorsson, Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin, *FEBS Lett.* 530 (2002) 124–128.
- [59] D.G. Breckenridge, M. Germain, J.P. Mathai, M. Nguyen, G.C. Shore, Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways, *Oncogene* 22 (2003) 8608–8618.

INFLUENCE OF AGING ON GLYCOSAMINOGLYCANS AND SMALL LEUCINE-RICH PROTEOGLYCANS PRODUCTION BY SKIN FIBROBLASTS

*Boris Vuillermoz**, *Yanusz Wegrowski**, *Jean-Luc Contet-Audonneau[§]*, *Louis Danoux[§]*,
Gilles Pauly[§], *François-Xavier Maquart**

* Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, CNRS UMR 6198, IFR 53-Biomolécules,
Faculty of Medicine, University of Reims Champagne-Ardenne, 51 Rue Cognacq Jay, 51095
Reims cedex, France

[§] Cognis France, Division Laboratoires Sérobiologiques, 2-3 rue de Seichamps, 54425 Pulnoy,
France

Shortened title : Alterations of hyaluronan and lumican production in skin aging.

Corresponding author :

Professeur F.X. Maquart

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6198

Faculté de Médecine

51 rue Cognacq-Jay, 51095 Reims cedex, France

Tel : 33.3.26.78.83.46

Fax : 33.3.26.78.85.39

E-mail : fmaquart@chu-reims.fr

Abbreviations : SLRPs : Small Leucine Rich Proteoglycans ; GAGs : glycosaminoglycans

ABSTRACT

Skin aging is characterized by a progressive alteration of its functional properties, linked to alterations of dermal connective tissue. Whereas many studies have been devoted to collagen alterations during aging, the situation is less clear concerning glycosaminoglycans and proteoglycans. Particularly, the alterations of the expression of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), a family of proteoglycans strongly implicated in cell regulation, have never been studied.

In the present study we measured glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans synthesis by skin fibroblasts from donors of 1 month to 83 years old. [³H]-glucosamine and [³⁵S]-sulfate incorporation did not show significant differences of sulfated GAG synthesis during aging. On the other hand, a significant positive correlation was found between hyaluronan secretion and donor's age. Northern blot analysis of SLRPs mRNAs showed a significant negative correlation of lumican mRNA with donor's age, whereas decorin and biglycan mRNAs were not significantly altered. Immunohistochemical study and quantitative image analysis confirmed a decreased lumican accumulation in aged human skin.

Taken together, our results suggest that impairment of glycosaminoglycans and SLRPs synthesis might be involved in the functional alterations of aged skin.

INTRODUCTION

Skin aging is characterized by a progressive alteration of its functional properties, linked to alterations of dermal connective tissue. Mechanical properties of the skin mainly depend on the quality of the extracellular matrix. Whereas many studies have been devoted to the age-related changes affecting collagen fibrils, another important family of extracellular matrix macromolecules, proteoglycans, have however, been far less studied.

Proteoglycans are one of the main components of extracellular matrix. They are composed of a core protein bearing one or more glycosaminoglycan chains [1]. At the present time, at least 50 different core proteins have been cloned whereas the sulfated glycosaminoglycan chains of proteoglycans are classified into two groups : the glucosaminoglycans (heparin/heparan sulfate and keratan sulfate) and the galactosaminoglycans (chondroitin sulfate/dermatan sulfate). Non-sulfated hyaluronan contains glucosamine and glucuronic acid only.

A major proteoglycan of the dermis is versican, a large proteoglycan with, in its Vo splicing variant, a 265 kDa core protein bearing 12-15 attached chondroitin sulfate chains [2]. In addition to versican, dermis contains several small leucine-rich proteoglycans (SRLPs) such as decorin, biglycan and lumican [3,4].

SLRPs seem to play an important role in the regulation of cell activity and in the organization and functional properties of skin connective tissue [5]. Among this proteoglycan family, decorin was the most studied. Decorin is composed of a 40 kDa protein core, bearing a unique dermatan/chondroitin sulfate GAG chain. It is the most abundant SLRP in adult human skin, where it is present for a large part as a truncated form lacking its carboxy-terminal end [6]. It plays an important role in skin homeostasis, as pointed out by the observation of abnormal collagen fibril morphology and skin fragility in mice with invalidated decorin gene [7]. Biglycan contains a core protein of about 42 kDa with two dermatan/chondroitin sulfate chains. It is highly expressed in bone [3]. It is present in low

amount in normal human skin but seems to be strongly expressed in various models of tissue repair [8]. Lumican is also present in adult human skin, under the form of a glycoprotein with a 38 kDa core protein [9]. As decorin, lumican seems to play an important role in the preservation of skin functional properties. Lumican-null mice showed abnormal collagen fibril assembly, with large and abnormally shaped collagen fibrils, and an extremely loose and fragile skin [10]. Generally, experiments with SLRP-deficient mice demonstrated the crucial role played by SLRPs in the control of collagen fibrillogenesis [11].

In addition to the control of collagen fibril assembly, SLRPs seem to have other important functions in the skin, either directly or indirectly. Decorin, particularly, is able to directly decrease cell proliferation. This effect is associated with an induction of p21, a protein that complexes with cyclins and reduces cyclin-dependent kinase activity, thus blocking cell division [12]. Decorin is also able to bind Transforming Growth Factor- β (TGF- β) with a high affinity and, thus, may modulate TGF- β activity in skin [13]. Biglycan does not inhibit normal cell growth [14]. It is, however, required for endothelial cell migration [15] and induces G1-arrest in pancreatic cancer cells [16]. Little is known about the role of lumican in skin but the disorganized, abnormally loose dermis, which characterizes lumican-deficient mice [10], demonstrate its importance in skin functional properties.

Taken together, all these features make SLRPs good candidates for a major role in the regulation of skin homeostasy. An alteration of their repartition might be involved in the alterations, which occur in skin aging. In the present study, we studied the expression of SLRPs by early passage cultured skin fibroblasts, obtained from donors of 1 month to 83 years old. We showed that lumican expression decreased during aging whereas decorin expression tended to increase, resulting in a strong alteration of the decorin to lumican ratio. On the other hand, biglycan expression was not modified during aging. Alterations of SLRPs expression could be implicated in the functional impairment which affect aged skin.

MATERIALS AND METHODS

All the experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Committee for Ethics of the CNRS and with the principles of the declaration of Helsinki.

Isolation and culture of human fibroblasts

Fibroblasts from patients from 1 month old to 83 years old were used in this study. Biopsies were obtained from routine circumcisions, or aesthetic surgery, with the informed consent of the patients or their parents. The samples were cleaned of excess subcutaneous tissue and cut into small pieces (5x5 mm), then incubated with 0.25% trypsin in 0.01% ethylenediamine tetraacetic acid solution (Gibco Life Technology, France) at 4°C overnight. The epidermal sheets were separated from dermis by forceps.

Primary cultures of dermal fibroblasts were established by cutting the dermis into small pieces (1 x 1 mm), then sticking the fragments into 25 cm² flasks. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco Life Technology, France) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cultures between passages 3 and 5 were used in this study.

Glycosaminoglycan and proteoglycan analysis

For metabolic labelling, series of three confluent 2 cm² wells (Costar, Dutscher, France) were incubated for 24h, four days after seeding, with 50 µCi/ml [³⁵S]-sulfate (Amersham-Pharmacia, France) in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 20 mg/l of Na₂SO₄ (one tenth of the usual concentration) and 2 % dialyzed FBS or with 10 µCi/ml [³H]-glucosamine (Amersham-Pharmacia, France) in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 2 % of FBS.

The culture media and cell layers were collected separately. The cell layer was washed twice with phosphate buffer saline (PBS). Culture media were heated for 5 min at 100°C. The cell layer was

solubilized in 50 mM NaOH and heated for 10 min at 60°C. An aliquot was taken for protein measurement [17]. The incorporation of ³⁵S sulfate and ³H-glucosamine into glycosaminoglycans was determined by the cetylpyridinium chloride precipitation method [18,19]. Briefly, 40 µl of the medium and cell layer extracts were spotted on filter papers and dialysed three times in 1% cetylpyridinium chloride containing 0.05 M NaCl and 0.05% (m/v) sodium sulfate. The radioactivity of precipitated proteoglycans on dried filter paper was measured by liquid scintillation counting.

The remaining part of all aliquots was adjusted to pH 8.0 with 1 M acetic acid. The extracts were digested for 24h at 50 °C with 0.4 mg/ml Pronase in 0.05 M Tris HCl (pH 8.0) and 0.02 M CaCl₂ buffer. Pronase was precipitated with 10% trichloroacetic acid and centrifugation for 15 min at 5000 g. The supernatant was exhaustively dialysed against distilled water at 4°C. An aliquot was taken for measuring the radioactivity incorporated into glycosaminoglycans. The remaining part was freeze-dried. The samples were redissolved in water and deposited on electrophoresis strips, together with standard glycosaminoglycans. Cellulose-acetate-gel electrophoresis was performed on Cellogel membranes (Sebia, France) at 40 V for 2h in 0.1M zinc acetate buffers, pH 5 [20]. After electrophoresis, the membranes were fixed in ethanol and stained with 0.2% (m/v) Alcian Blue [21], then soaked with 1% (m/v) 2,5-diphenyloxazol (PPO), 5% (v/v) glycerol in ethanol. The glycosaminoglycan bands on the dried strips were autoradiographed at -80°C on hyperfilm-MP (Amersham-Pharmacia, France) in a X-omatic cassette with intensifying screen (Amersham-Pharmacia, France) [22].

To quantify hyaluronan synthesis, aliquots of the pronase digests were hydrolyzed at 60°C for 60 min with 10 U/ml hyaluronidase from *Str. Hyaluroticus* (Sigma) [23]. The samples were spotted on 3 MM Whatman filter paper and dialysed against cetylpyridinium chloride as above. The remaining radioactivity of the precipitate was counted in a liquid scintillation counter.

RNA extraction and Northern blot analysis

Total RNA was isolated from primary culture of fibroblasts and keratinocytes by a guanidinium-thiocyanate/phenol mixture (Tri Reagent, Euromedex, France). Total RNA was extracted according to the instructions of the manufacturer using a single-step method, as described by Chomczynski and Sacchi [24]. For each sample, 15 µg of RNA were dissolved and denatured by heating at 65°C for 15 min. Total RNAs were separated by electrophoresis through a 1.0% agarose/formaldehyde gel for 6h at 70 V [25] and transferred overnight to nylon filter (Genescreen plus, NEN, France) by capillary blotting in 6 X standard saline citrate solution. The air-dried nylon filter was ultraviolet-irradiated for 5 min to bind transferred RNA.

Membranes were hybridized at high stringency with [³²P]-labelled probes of decorin, biglycan (generous gift of Dr Larry Fisher) [26] and lumican (generously provided by Dr P. Roughley) [9]. For loading control, membranes were hybridized with a probe corresponding to the ubiquitously expressed 36B4 RNA [27]. The filter was washed and exposed to autoradiography at -80°C using hyperfilm MP (Amersham-Pharmacia, France).

Quantification of autoradiograms was performed by densitometric scanning with a Bio-profil software (Vilbert-Lourmat, France).

Immunohistochemistry

Antibody against lumican was obtained from Seikagaku (Japan). Tissues were frozen immediately in liquid nitrogen for immunofluorescence study. Cryostat sections of 10 µm of thickness were used. In brief, frozen sections were fixed in acetone for 10 minutes, then air dried, stained in a humid chamber with monoclonal antibody diluted 1:50 for 18h at 4°C. After being washed in PBS pH 7.2, antibody was revealed by a specific immunoglobulin marked by fluorescein isothiocyanate (FITC) diluted 1:100, applied for 30 min at room temperature. Sections were washed again, counterstained with Evans blue and mounted in buffered glycerin. Negative controls for the

specificity of staining consisted in replacing the primary antibody or the secondary antibody by PBS.

Sections were analysed by confocal laser scanning microscope (CLSM) (Zeiss, France) and pictures were recorded for quantification by image analyser and illustrations.

Quantification of immunohistochemical preparations

Pictures obtained with CLSM were converted to color numeric images, in red/green/blue, with 8 bits per channel, and 256 shades of color. These images were analyzed using mathematical morphology software (Quantimet Q570 IW, Leica, France).

Firstly, the area containing the structure to be studied was delimited and measured (area A). Secondly, the immunofluorescent dye (green) corresponding to the antibody studied was then detected in the area A and measured as area B. Finally, the area fraction occupied by lumican was calculated. Results were expressed as mean of percentage of reactive surface for 6 pictures per subject (B/A in % +/- SEM).

Statistical methods

Statistical analysis of the data was done using Student's t-test and the non-parametric Mann and Whitney u-test. Differences were considered significant for $p < 0.05$.

RESULTS

✓ **Glycosaminoglycan synthesis by fibroblasts during aging**

Total glycosaminoglycan synthesis by fibroblasts from the donors was measured by [³H]-glucosamine (Fig. 1, A and C) and [³⁵S]-sulfate incorporation (Fig. 1, B and D). No significant correlation between glycosaminoglycan synthesis and donor's age was found, neither in the culture medium (Fig. 1, A and B) nor in the cell layer (Fig.1, C and D). Specific measurement of hyaluronan synthesis permitted, however, to demonstrate a significant positive correlation ($r = 0,770$, $p < 0.01$) between the proportion of hyaluronan synthesized and donor's age (Fig 2).

Cellulose acetate electrophoresis of the sulfated GAGs secreted in the culture medium by human skin fibroblasts showed three major bands corresponding to chondroitin sulfate, dermatan sulfate and heparan sulfate. Quantification of these bands (Fig. 3, left panels) showed that dermatan sulfate was the predominant fraction of the secreted GAGs and tended to increase with the age of the donor. On the other hand, the percentage of secreted chondroitin sulfate tended to decrease with donor's age while heparan sulfate showed no distinct variations. In the cell layer (Fig. 3, right panels), no dermatan sulfate was detected and heparan sulfate represented the large majority (about 80%) of the sulfated GAGs. There was no correlation of heparan sulfate or chondroitin sulfate with donor's age.

✓ **Expression of SLRPs by fibroblasts is altered during aging**

Northern blot analysis of the SLRPs decorin, biglycan and lumican mRNA (Fig. 4) demonstrated a significant negative correlation between lumican expression and donor's age ($r = 0.506$, $p < 0.01$). The lumican/decorin ratio (Fig 4, lower panel) was also significantly correlated with donor's age ($r = 0.551$, $p < 0.001$). By contrast, no significant correlation was found either for decorin or biglycan.

✓ **Decreased lumican accumulation in aged skin**

Immunohistochemistry revealed the presence of lumican in the dermis, preferentially in the superficial, papillary layer (Fig. 5). Quantification by image analysis (Table I) demonstrated a strong decrease (-81% and -85%, respectively, $p < 0.01$) of dermal lumican in aged skin (donors over 50) compared to young (0-15 years) and adult (16-50 years) skin.

DISCUSSION

Glycosaminoglycans and proteoglycans constitute a group of extracellular matrix macromolecules, which plays a major role in connective tissue organization and function [1]. A particular interest is presently devoted to the SLRPs family, which seems able to regulate many cellular functions [5]. Decorin and lumican, particularly, seem to be strongly involved in the homeostasis and organization of dermis and other connective tissues, as pointed out by several knockout experiments of SLRPs core proteins genes [11]. Biglycan, on the other hand, seems to be more implicated in the organization of calcified tissues, since targeted disruption of the biglycan gene induce an osteoporosis-like phenotype in mice [28].

Previous works demonstrated that decorin interacts with collagen fibers [29] and increases their tensile strength [30]. Less is known about the effects of lumican interactions with collagen fibers but it is demonstrated that lumican-deficient mice display disorganized collagen fibers and skin fragility [10]. In the present study, we decided to investigate the synthesis of glycosaminoglycans and proteoglycans, with a special emphasis on small leucine-rich proteoglycans by dermal fibroblasts from donors of various ages. Although some previous studies were devoted to the alterations of proteoglycans and glycosaminoglycans during aging, their results are often contradictory or partial. Older studies [31,32], for instance, compared the amounts of GAGs in skin extracts, without taking into account the potential age-related variations in proteoglycan/GAGs extractability, which could be reduced in older skin [33,34]. Other studies were conducted on a very small number of fibroblast cell lines [35] or on *in vitro*-aged fibroblasts, obtained by serial passages of the same strain, which poorly represents the physiological situation [36]. To our knowledge, a systematic analysis and characterization of the GAGs and SLRPs synthesized by a large population of skin fibroblasts from various donor's ages, with a very low number of subcultures, was never published before.

Whereas there was no direct correlation between GAG synthesis and donor's age, we observed a significant decrease of the amount of GAGs synthesized by fibroblasts from the oldest patients (over 60). These results are in agreement with that of Takeda *et al.*, who reported a decrease of proteoglycan synthesis by *in vivo*-aged fibroblasts [35]. This study concerned, however, two fibroblast strains only. It is obvious from our studies that a very large variability of GAG synthesis may be observed from one cell line to another and comparison of large series of fibroblasts is necessary to draw definite conclusions. On the other hand, Breen *et al.* [31], and Fleischmajer *et al.* [32] reported that total skin GAGs content decreases with increasing age. Differences in glycosaminoglycan extractability were not, however, considered by these authors.

Whereas total GAG synthesis decreased in aged skin, we observed, on the contrary, that the percentage of hyaluronan synthesized by human skin fibroblasts increased during aging. These results seem contradictory with that of Meyer and Stern [33], who demonstrated that total skin hyaluronan content does not change with age. It is not the case, however, since previous data from Davidson and Small [36] showed that the half-life of skin hyaluronan is decreased in aging skin. It may be suggested that hyaluronan degrading enzymes, hyaluronidases, activity may be increased in aged skin, simultaneously with the increase of new hyaluronan chains by fibroblasts. Similar results were obtained by Fodil-Bouralha *et al.* in *in vitro*-aged fibroblasts [38]. A rapid degradation of neo-synthesized hyaluronan in human skin organ culture was also reported by Tammi *et al.* [39]. So, the total hyaluronan content of the dermis may be decreased in aged skin even if hyaluronan synthesis is increased in aging fibroblasts.

Cellulose acetate electrophoresis demonstrated that dermatan sulfate was the major sulfated GAG secreted by human skin fibroblasts. Its relative proportion tended to increase whereas that of chondroitin sulfate decreased with donor's age. A decreased chondroitin-sulfate synthesis was also observed by Fodil-Bouralha *et al.* [38] in *in vitro* aged fibroblasts, after serial passages. In addition,

immunohistochemical studies by Willen *et al.*[40] showed a loss of chondroitin sulfate in the papillary dermis of patients over 60. Carrino *et al.* [34] suggested that this decrease could be due to a decreased versican accumulation in aged skin. Once again, however, as pointed out by these authors, there could be age-related variations in proteoglycan extractability from skin.

Our data points out a significant negative correlation between lumican expression by fibroblasts and donor's age. On the other hand, decorin and biglycan expression was not modified. Consequently, the lumican/decorin ratio was strongly altered during aging. To our knowledge, no similar study of SLRPs production by human fibroblasts during physiological aging was ever reported before. Carrino *et al.* [34] reported an increase in the proportion of extractable decorin in aged human skin, whereas western blot analysis by Nomura *et al.* [41] showed that the amount of decorin increased with age in rat skin. On the other hand, decreased decorin mRNA levels were demonstrated by Bernstein *et al.* [42] in photo-aged skin. Different alterations, however, occur during photo-aging and physiological aging. No data are available about biglycan and lumican expression during skin aging.

Taken together, our data demonstrate a significant decrease of lumican expression and accumulation in aged skin, with a strong alteration of the lumican to decorin ratio. Due to the particular importance of these two SLRPs in dermal organization and properties, we suggest that these alterations might be involved in the functional alterations, which characterize aging skin.

Acknowledgements : This work was supported by grants from CNRS, the University of Reims-Champagne-Ardenne, and Cognis France, Division Laboratoires Sérobiologiques.

REFERENCES

- 1-Iozzo RV: Matrix proteoglycans from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67: 609-652, 1998
- 2-Zimmerman DR: Versican. In : Iozzo RV (ed). *Proteoglycans : structure, biology and molecular interactions*. Marcel Dekker, New-York, Basel, 2000, pp 327-341
- 3- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine DJ, Robey PG: Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 1549-1563, 1990
- 4-Ying S, Shiraishi A, Kao CW, *et al*: Characterization and expression of the mouse lumican gene. *J Biol Chem* 272: 30306-30313, 1997
- 5-Neame PJ, Kay CJ: Small Leucine-Rich Proteoglycans. In : Iozzo RV (ed). *Proteoglycans : structure, biology and molecular interactions*. Marcel Dekker, New-York, Basel, 2000, pp 201-235
- 6-Carrino DA, Onnerfjord P, Sandy JD, *et al*: Age-related changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adults skin. *J Biol Chem* 278: 17566-17572, 2003
- 7-Danielson KG, Barribault H, Gomes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV: Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136: 729-753, 1997
- 8-Wegrowski Y, Gillery P, Kotlarz G, Perreau C, Georges N, Maquart FX: Modulation of sulfated glycosaminoglycan and small proteoglycan synthesis by the extracellular matrix. *Mol Cell Biochem* 205: 125-131, 2000
- 9-Grover J, Chen XN, Korenberg JR, Roughley PJ: The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage. *J Biol Chem*: 270, 21942-21949, 1995

- 10-Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH, Jepsen KJ, La Mantia C, Carrol H: Lumican regulates collagen fibril assembly : skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 141: 1227-1286, 1998
- 11-Ameye L, Young MF: Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans : novel *in vivo* models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12: 107R-116R, 2002
- 12-De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV: Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinase. *J Biol Chem* 271: 18961-18965, 1996
- 13-Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E: Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 346: 821-824, 1990
- 14-Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B, Iozzo RV: Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest* 100: 149-157, 1997
- 15-Kinsella MG, Tsoi CK, Jarveläinen HT, Wight TN: Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. The role of endogenous basic fibroblasts growth factor. *J Biol Chem* 272: 318-325, 1997
- 16-Weber CK, Sommer G, Michl P, *et al*: Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1 arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* 121: 657-667, 2001
- 17-Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 18-Wasteson A, Uthne K, Westermark B : A novel assay for the biosynthesis of sulphated polysaccharide and its application to studies on the effects of somatomedin on cultured cells. *Biochem J* 136: 1069-1074, 1973

- 19-Glimelius B, Pintar JE : Analysis of developmentally homogeneous neural crest cell populations *in vitro*. IV. Cell proliferation and synthesis of glycosaminoglycans. *Cell Differ* 10: 173-182, 1981
- 20-Wessler E: Electrophoresis of acidic glycosaminoglycans in hydrochloric acid: a micro method for sulfate determination. *Anal Biochem* 41: 67-69, 1971
- 21-Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC : Molecular weight estimation of sulfated glycosaminoglycans in human gingivae. *Connect Tissue Res* 9: 165-172, 1982
- 22-Wegrowski Y : Effect of hyperthermia on the extracellular matrix. I. Heat enhances hyaluronan and inhibits sulphated glycosaminoglycan synthesis. *FEBS Lett* 334: 121-124, 199
- 23-Saito H, Yamagata T, Suzuki S : Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. *J Biol Chem* 243: 1536-1542, 1986
- 24-Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162: 156-159, 1987
- 25-Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 26-Fisher LW, Stubbs JT 3rd, Young MF : Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. *Acta Orthop Scand Suppl* 266: 61-5, 1995
- 27-Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P : Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucl Ac Res* 10: 7895-7903, 1982
- 28-Xu T, Bianco P, Fisher L, Longenecker G, *et al*: Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nature Genet* 20: 78-82, 1998
- 29-Pogany G, Hernandez DJ, Vogel KG: The *in vitro* interaction of proteoglycans with type I collagen is modulated by phosphate. *Arch Biochem Biophys* 313: 102-111, 1994
- 30-Pins GD, Christiansen DL, Patel R, Silver FH: Self-assembly of collagen fibers. Influence of fibrillar alignment and decorin on mechanical properties. *Biophys J* 73: 2164-2172, 1997

- 31-Breen M, Weinstein HG, Johnson BL, Veis A, Marshall RT: Acidic glycosaminoglycans in human skin during fetal development and adult life. *Biochim Biophys Acta* 201: 54-60, 1970
- 32-Fleischmajer R, Perlish J, Bashey RI: Human dermal glycosaminoglycans and aging. *Biochim Biophys Acta* 279: 265-275, 1972
- 33-Meyer LJM, Stern R: Age-dependent changes of hyaluronan in human skin. *J Invest Dermatol* 102: 385-389, 1994
- 34-Carrino DA, Sorrell JM, Caplan AI: Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* 373: 91-101, 2000
- 35-Takeda K, Gosiewska A, Peterkofsky B: Similar, but not identical, modulation of expression of extracellular matrix components during *in vitro* and *in vivo* aging of human skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 153: 450-459, 1992
- 36-Passi A, Albertini R, Campagnari F, De Luca G: Modifications of proteoglycans secreted into the growth medium by young and senescent human skin fibroblasts. *FEBS Lett.* 402: 286-290, 1997
- 37-Davidson EA, Small W: Metabolism *in vivo* of connective tissue mucopolysaccharides II. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid of skin. *Biochim Biophys Acta* 69: 53-458, 1963
- 38-Fodil-Bourahla I, Drubaix I, Robert L: Effect of *in vitro* aging on the biosynthesis of glycosaminoglycans by human skin fibroblasts. Modulation by the elastin-laminin receptor. *Mech Ageing Dev* 106: 241-260, 1999
- 39-Tammi R, Säämänen AM, Maibach ME, Tammi M: Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *J Invest Dermatol* 97: 126-130, 1991
- 40-Willen MD, Sorrell JM, Lekan CC, Davis BT, Caplan AI: Patterns of glycosaminoglycan/proteoglycan immunostaining in human skin during aging. *J Invest Dermatol* 96: 968-974, 1991

41-Nomura Y, Abe Y, Ishii Y, Watanabe M, Kobayashi M, Hattori A, Tsujimoto M: Structural changes in the glycosaminoglycan chain of rat skin decorin with growth. *J Dermatol* 30: 655-664, 2003

42-Bernstein EF, Fisher LW, Li K, Le Baron RG, Tan EML, Uitto J: Differential expression of the versican and decorin genes in photoaged and sun-protected skin. *Lab Invest* 72: 662-669, 1995

TABLE I : Quantification of lumican accumulation in human superficial dermis

	Young (0 – 15 years)	Adult (16 – 50 years)	Old (51 – 83 years)
n	7	7	5
Age (mean ± SEM)	5.3 ± 2.0	36.9 ± 13.9	58.8 ± 26.3
Percentage of lumican area (mean ± SEM)	8.5 ± 1.05	10.6 ± 2.8	1.6 ± 0.9*

Lumican accumulation was estimated by quantitative image analysis and expressed as percentage of reactive lumican area referring to corresponding superficial dermis area.

* : Percentage of lumican area in old skin is significantly lower than in young and adult skins ($p < 0.01$).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Total GAG synthesis by human skin fibroblasts :

Human skin fibroblasts from donors of various ages were incubated for 24h in the presence of [³H]-glucosamine (A, C) or [³⁵S]-sulfate (B, D). Radioactivity incorporated in the glycosaminoglycans of the culture medium (A, B) and cell layer (C, D) was measured as described in Materials and Methods. No significant correlation between overall glycosaminoglycan synthesis and donor's age was found.

Figure 2 : Increased hyaluronan synthesis by human skin fibroblasts from aged skin.

Hyaluronan was measured in the culture medium of human skin fibroblasts as described in Materials and Methods. A significant correlation between hyaluronan synthesis and donor's age was found ($p < 0.01$).

Figure 3 : Chondroitin-sulfate is decreased in the culture medium of fibroblasts from donors over 54 :

Human skin fibroblasts from donors of various ages were incubated for 24h in the presence of [³⁵S]-sulfate. The percentages of dermatan sulfate (DS), chondroitin sulfate (CS) and heparan sulfate (HS) were measured in the culture medium (left panels) and cell layer (right panels), as described in Materials and Methods. No dermatan sulfate was found in the cell layer. A significant decrease of chondroitin sulfate secretion by fibroblasts from patients over 54 was observed ($p < 0.01$).

Figure 4 : Lumican expression by human skin fibroblasts decreases with donor's age :

RNAs from human skin fibroblasts of donors of various ages were extracted as described in Materials and Methods. Specific mRNAs for Decorin, Biglycan, and Lumican were then measured by Northern-blot, using specific cDNA probes. A significant negative correlation between lumican expression and donor's age was found ($p < 0.01$). It was also found for the lumican/decorin ratio ($p < 0.001$).

Figure 5 : Decreased lumican accumulation in aged skin

An example of lumican detection in human skin from 3 subjects of 3, 31 and 53 years old.

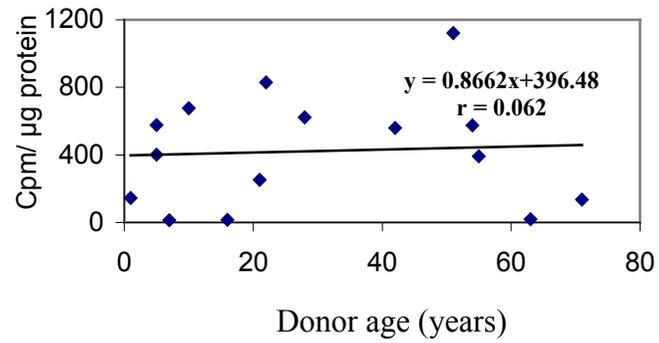
Lumican was detected in human skin biopsies, using immunohistochemistry technique. Lumican, revealed in green in superficial dermis by specific antibody labelled by FITC, is clearly visible in skin of 3 and 31 years old and comparatively strongly decreased in skin of 53 years old.

Counterstain with Evans blue in red. Scale bar : 50 μm .

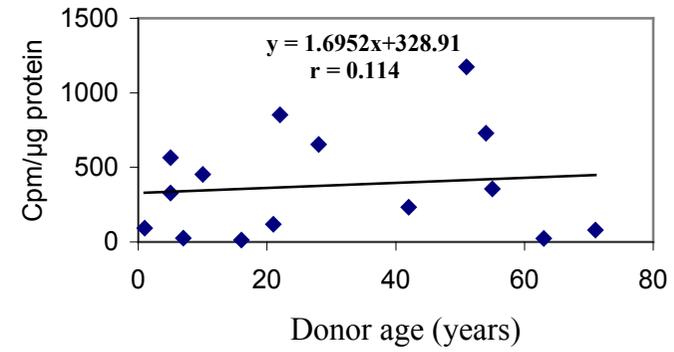
E = epidermis, SD = superficial dermis

Fig 1

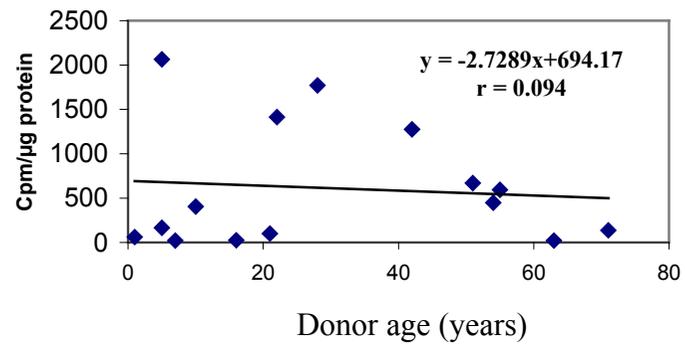
A



B



C



D

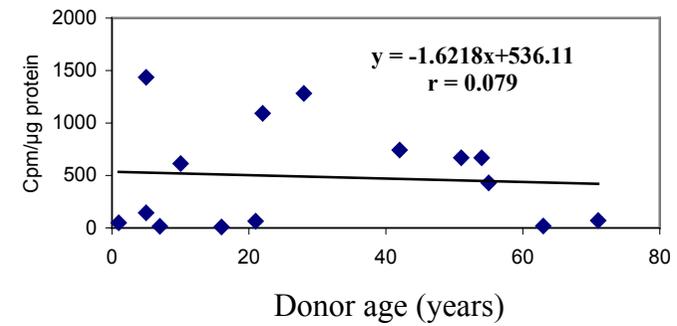


Fig 2

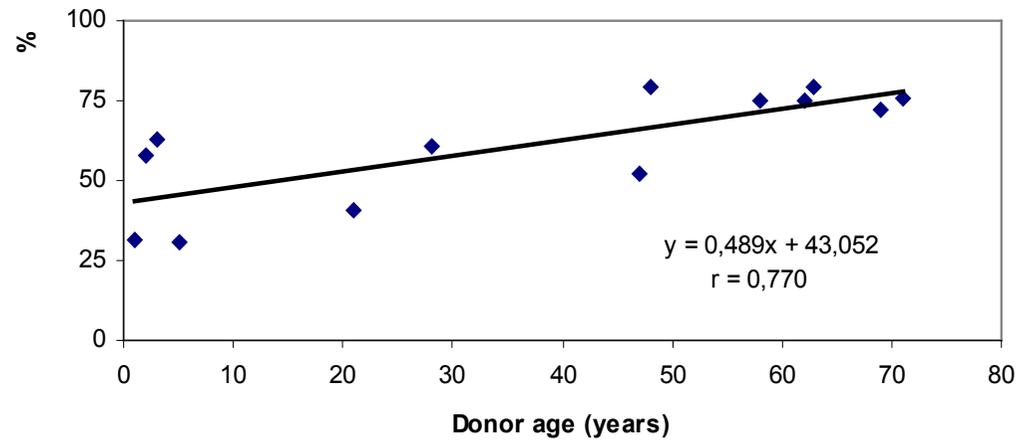
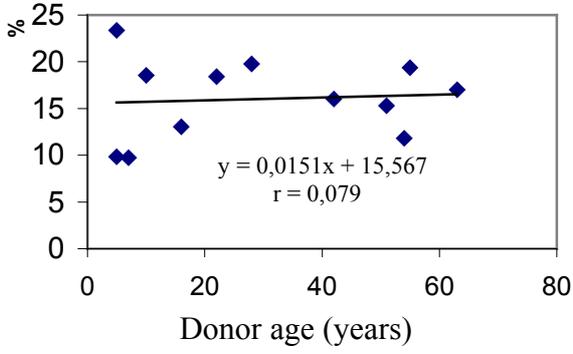


Fig 3

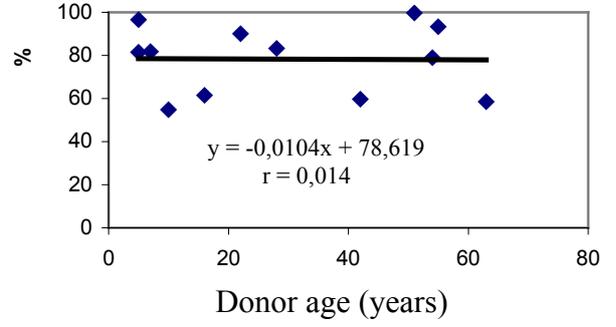
MEDIUM

HS

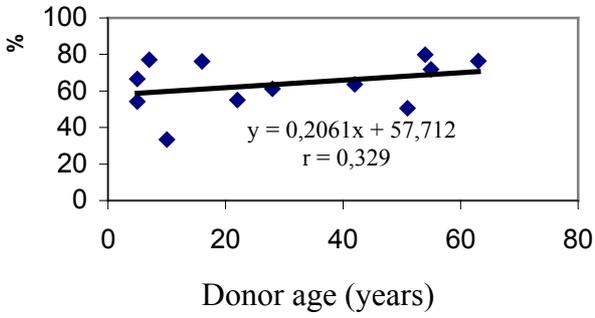


CELL LAYER

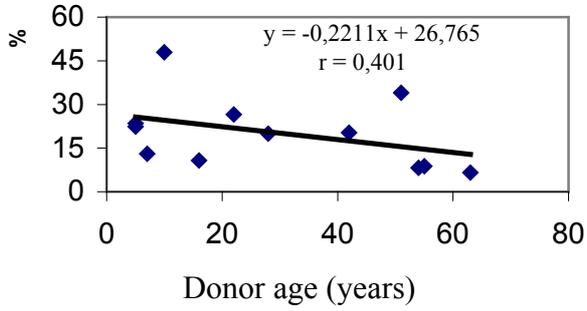
HS



DS



CS



CS

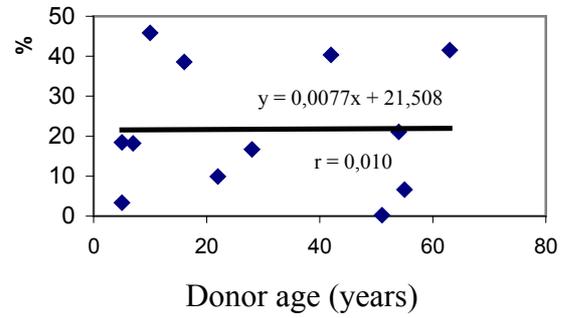
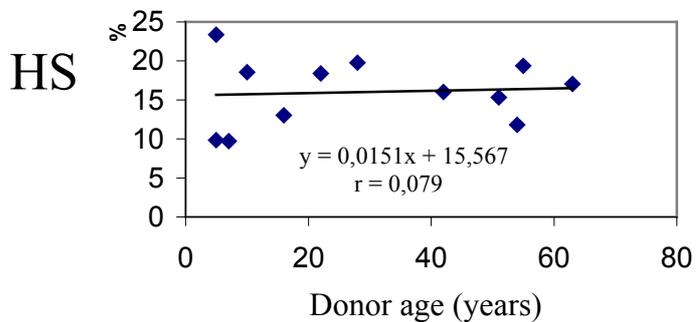


Fig 3

MEDIUM



CELL LAYER

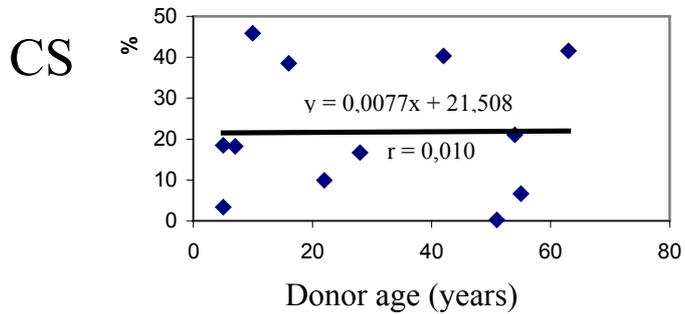
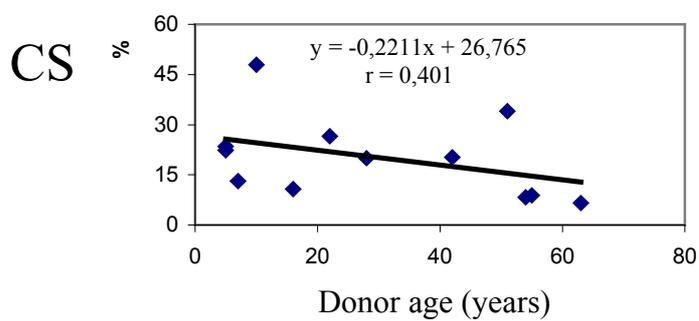
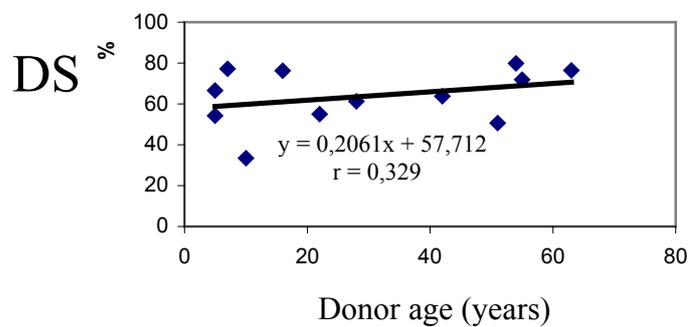
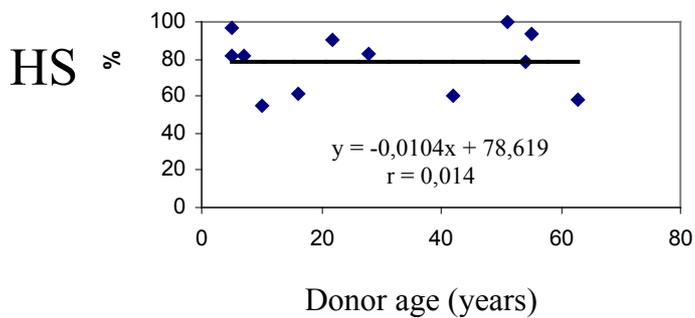
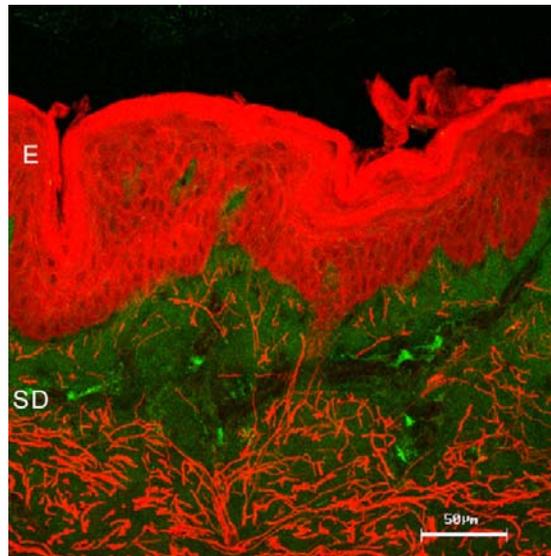
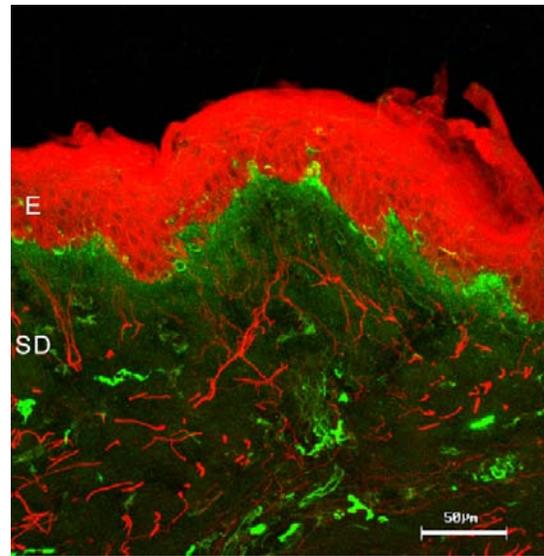


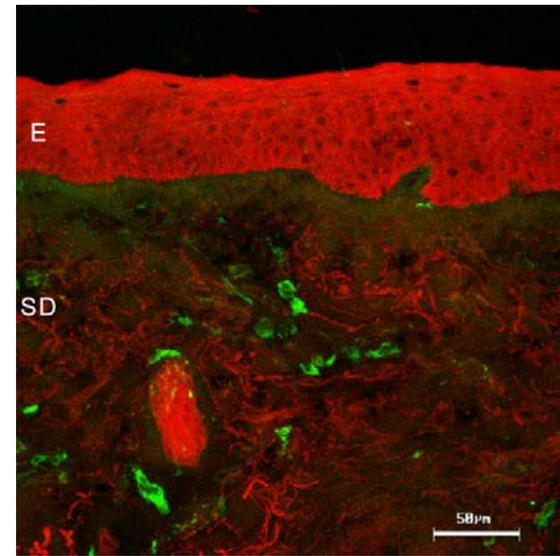
Fig. 5



3 years old



31 years old



53 years old

RESUME

Les protéoglycannes de la famille des SLRPs (Small Leucine Rich Proteoglycans) présentent un rôle très important dans la régulation de la fibrillogénèse du collagène de type 1, et jouent un rôle prépondérant dans les interactions cellules-matrice extracellulaire en contrôlant différents processus biologiques comme la migration, la différenciation et la croissance aussi bien dans les tissus embryonnaires qu'au cours de la réparation tissulaire. Les SLRPs comme la décorine et le lumicanne sont des constituants matriciels essentiels permettant le maintien de l'intégrité de la peau et semblent jouer un rôle important dans le processus du vieillissement cutané et de réparation tissulaire. Nous avons pu démontrer au cours de notre étude sur un modèle de cellules fibroblastiques issues de donneurs d'âge croissant, les modulations de l'expression de ces SLRPs au cours du vieillissement et leur régulation lors d'une exposition prolongée aux ultraviolets. Nous avons constaté, au cours du vieillissement cutané, une diminution de la synthèse de lumicanne associé à une augmentation de l'expression de la décorine. De même, une exposition au soleil chronique des fibroblastes dermiques entraîne une diminution de la synthèse du lumicanne.

Comme la décorine et le biglycane, le lumicanne a été signalé dans le stroma de nombreux tissus tumoraux et a été impliqué dans le contrôle du développement de certaines tumeurs cancéreuses, comme le carcinome du sein, le cancer pancréatique et colorectal. Nous avons observé l'inhibition de la croissance tumorale et du potentiel métastatique *in vivo* après induction d'expression de lumicanne dans des cellules tumorales par transfection stable. Nous avons donc cherché à élucider le mécanisme d'action du lumicanne présent au sein de la peau lors du processus de progression du mélanome et cela à partir de cellules de mélanome de souris (B16F1) transfectées de manière stable par un plasmide pcDNA3 contenant l'ADNc du lumicanne ou de cellules B16F1 cultivées en présence de lumicanne recombinant ; nous avons étudié la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*, l'expression des protéines impliquées dans le phénomène d'apoptose et l'activité de certaines protéinases extracellulaires.

Notre travail a mis en évidence que la présence de lumicanne recombinant ou de lumicanne sécrété par les cellules transfectées, entraînait un retard de migration et d'invasion du Matrigel® par les cellules B16F1 dans un système transwell®, par rapport aux cellules sauvages. De plus, l'expression de lumicanne par les cellules transfectées inhibe la croissance des clones en agar mou. *In vivo*, l'expression de lumicanne par les clones transfectés inhibe la croissance tumorale chez la souris ainsi que le nombre de métastases pulmonaires. Nous avons démontré que l'inhibition de la croissance tumorale est corrélée *in vivo* à une diminution de l'expression de la cycline D1 et à une augmentation de l'expression des protéines Bax et PARP clivées. Ces résultats suggèrent que le lumicanne est un inducteur de la voie apoptotique.

Comme la décorine et le biglycane, le lumicanne peut être donc considéré comme une protéine matricielle dotée de propriétés "anti-tumorales", avec un mode d'action différent.

Mots clés : Protéoglycannes / Vieillissement cutané / Ultraviolet / Mélanome / Métalloprotéinases matricielles / Cycle cellulaire / Apoptose