

UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DE PHARMACIE

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne**

Domaine : Immunologie / Biochimie

Soutenue publiquement le 16 décembre 2005

par

Romain DEBRET

**Dégradation de l'élastine et régulation des cytokines :
rôle dans la réaction inflammatoire liée au mélanome**

Membres du Jury :

Président du Jury :

P. BERNARD, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Reims

Rapporteurs :

G. FAURY, Professeur des Universités, Grenoble

M. D'INCAN, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Clermont-Ferrand

Examineur :

J.M. SALLENAVE, Principal Investigator, Edimbourg (Ecosse)

Directeurs de thèse :

R. LE NAOUR, Maître de Conférence des Universités, HDR, Reims

F. ANTONICELLI, Maître de Conférence des Universités, HDR, Reims

Je remercie ici les Professeurs F.X. Maquart et M. Guenounou pour m'avoir accueilli dans leurs Unités et de m'avoir accordé leur confiance.

Je remercie tout particulièrement le professeur P. Bernard de m'avoir accueilli dans son laboratoire de Recherche en Dermatologie durant 2 années, et de l'aide financière dont il m'a fait bénéficier par le biais de l'Association pour la Recherche en Dermatologie. Soyez également remercié d'avoir accepté de juger mon travail.

Mes remerciements vont de tout cœur aux Docteurs F. Antonicelli et R. Le Naour pour avoir dirigé ce travail avec une très grande disponibilité. Veuillez trouver ici mes remerciements infinis, et mon plus grand respect.

Je remercie le Docteur W. Hornebeck pour ses excellents conseils et ses avis toujours très éclairés tout au long de cette étude.

Je remercie vivement le Docteur J.M. Sallenave de m'avoir fourni les adénovirus I κ B et ovalbumine, et aussi d'avoir accepté de se déplacer d'Edimbourg pour faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également les Professeurs G. Faury et M. d'Incan d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse avec des délais si restreints.

Je livre d'immenses remerciements à l'ensemble des personnels de l'Unité CNRS UMR 6198, ainsi qu'aux personnels de l'EA 3796. Merci à tous pour ces années qui resteront à jamais ancrées dans ma mémoire...

A mes parents Ketty et Jean Claude

Pour tout ce que vous m'avez apporté

Pour m'avoir soutenu sans cesser de croire en moi

Pour l'amour que vous m'avez donné depuis toujours

A ma sœur Sonia

Je vous dédie cette thèse

SOMMAIRE

SOMMAIRE	- 1 -
LISTE DES ABREVIATIONS	- 4 -
LISTE DES ILLUSTRATIONS	- 7 -
INTRODUCTION	- 10 -
Contexte scientifique	- 11 -
1. Histologie et physiologie de la peau	- 13 -
1.1. L'épiderme	- 14 -
1.1.1. Le kératinocyte	- 14 -
1.1.2. Le mélanocyte	- 15 -
1.1.3. La cellule de Langerhans	- 18 -
1.1.4. La cellule de Merkel	- 18 -
1.2. La jonction dermo-épidermique (JDE)	- 18 -
1.3. Le derme	- 20 -
1.3.1. La matrice dermique	- 20 -
1.3.1.1. Les collagènes	- 21 -
1.3.1.2. Les fibres élastiques	- 21 -
1.3.1.3. La substance fondamentale amorphe	- 21 -
1.3.2. Les cellules dermiques	- 22 -
1.4. L'hypoderme	- 22 -
1.5. Les annexes cutanées	- 23 -
1.5.1. Les follicules pilo-sébacés	- 23 -
1.5.2. Les glandes sudoripares	- 23 -
1.5.3. Les ongles	- 23 -
1.6. Les fonctions immunes de la peau	- 24 -
1.6.1. Immunité innée et adaptative	- 24 -
1.6.2. Induction de la réponse immune cutanée	- 25 -
1.6.3. Devenir de la réponse immune cutanée	- 26 -
1.6.4. Résolution de la réponse immune cutanée	- 26 -
1.6.5. L'immunosurveillance tumorale cutanée	- 27 -
2. Le mélanome	- 28 -
2.1. Epidémiologie	- 28 -
2.2. Les facteurs de risque	- 29 -
2.3. Diagnostic et classification	- 30 -
2.3.1. Le diagnostic clinique	- 30 -
2.3.2. Le diagnostic histologique	- 31 -
2.3.3. La classification anatomo-clinique	- 31 -
2.3.4. Critères du pronostic	- 32 -
2.3.5. Classification internationale	- 34 -
2.4. Physiopathologie	- 35 -
2.4.1. Transformation et régulation du mélanome	- 35 -
2.4.1.1. Transformation du mélanocyte	- 36 -
2.4.1.2. Les oncogènes du mélanome	- 36 -
2.4.1.3. Les facteurs solubles régulant le mélanome	- 37 -
2.4.1.4. Régulation du mélanome par contacts cellulaires	- 39 -
2.4.1.5. Régulation du mélanome par la MEC	- 40 -
2.4.2. Altération de l'immunosurveillance du mélanome	- 42 -
3. Le lymphocyte T	- 43 -
3.1. Genèse des cellules T	- 43 -
3.1.1. La cellule précurseur	- 43 -
3.1.2. La différenciation des cellules T	- 43 -
3.1.3. Exportation vers les pools périphériques	- 45 -
3.2. Les polarisations Th1 et Th2	- 46 -
3.2.1. La polarisation Th1	- 46 -
3.2.2. La polarisation Th2	- 47 -
4. L'interleukine-1 β	- 48 -
4.1. Généralités	- 48 -
4.1.1. Les cytokines	- 48 -
4.1.2. La famille de l'IL-1	- 48 -

4.2.	Expression du gène de l'IL-1 β	- 49 -
4.2.1.	Contrôle de l'expression.....	- 49 -
4.2.2.	Les inducteurs de l'IL-1 β	- 51 -
4.3.	Synthèse et sécrétion de la protéine d'IL-1 β	- 51 -
4.3.1.	Signal additionnel de traduction.....	- 51 -
4.3.2.	Clivage de la protéine d'IL-1 β	- 52 -
4.3.3.	Les mécanismes de sécrétion.....	- 52 -
4.4.	Les récepteurs de l'IL-1 β	- 54 -
4.4.1.	Le récepteur de type 1 (IL-1RI).....	- 55 -
4.4.2.	La protéine accessoire du récepteur (IL-1R-AcP).....	- 55 -
4.4.3.	Le récepteur de type 2 (IL-1RII).....	- 56 -
4.4.4.	La transduction du signal.....	- 56 -
4.4.4.1.	Les événements précoces	- 57 -
4.4.4.2.	Les voies MAPK (mitogen-activated protein kinases).....	- 58 -
4.4.4.3.	Les facteurs de transcription.....	- 59 -
4.4.4.3.1.	Les facteurs de transcription AP-1 (activated protein-1).....	- 60 -
4.4.4.3.2.	La voie NF- κ B (nuclear factor- κ B)	- 61 -
4.5.	Rôles physiopathologiques de l'IL-1 β	- 64 -
4.5.1.	Rôle dans les pathologies inflammatoires chroniques	- 64 -
4.5.2.	Rôle dans le mélanome	- 65 -
5.	L'élastine	- 68 -
5.1.	Les fibres élastiques	- 68 -
5.2.	Structure de l'élastine	- 68 -
5.2.1.	Modèles structuraux	- 68 -
5.2.2.	La tropoélastine.....	- 69 -
5.2.2.1.	Structure du gène de l'élastine.....	- 71 -
5.2.2.2.	Contrôle de l'expression.....	- 72 -
5.2.2.3.	Modifications post-traductionnelles.....	- 73 -
5.2.2.4.	Sécrétion et assemblage.....	- 74 -
5.2.3.	Les peptides d'élastine.....	- 76 -
5.3.	Le complexe récepteur de l'élastine	- 80 -
5.3.1.	Mise en évidence d'un récepteur membranaire	- 80 -
5.3.2.	Description des sous-unités	- 80 -
5.3.2.1.	L'EBP	- 80 -
5.3.2.2.	La protéine protectrice (ou cathepsine A).....	- 81 -
5.3.2.3.	La neuraminidase.....	- 82 -
5.3.3.	Transduction du signal intracellulaire.....	- 82 -
	But du Travail	- 85 -
	MATERIELS ET METHODES	- 86 -
1.	Préparation de la kappa-élastine (κ -élastine).....	- 87 -
2.	Isolément des lymphocytes à partir du sang veineux de donneurs sains	- 88 -
2.1.	Elutriation à contre-courant.....	- 88 -
2.2.	Elimination des hématies par gradient de densité.....	- 89 -
3.	Culture cellulaire.....	- 89 -
3.1.	Mise au repos.....	- 89 -
3.2.	Stimulation des lymphocytes	- 90 -
4.	Immunomarquage fluorescent des lymphocytes T	- 91 -
4.1.	Anticorps et élastine couplés à des fluorochromes.....	- 91 -
4.2.	Marquage membranaire des lymphocytes T CD3 ⁺ CD4 ⁺	- 91 -
4.3.	Marquage intracytoplasmique des cytokines	- 92 -
4.4.	Principe d'analyse par cytométrie en flux	- 92 -
5.	Analyse par western-blot.....	- 93 -
5.1.	Obtention d'extraits cellulaires.....	- 93 -
5.2.	Western-blot (immunodétection des protéines).....	- 93 -
6.	Analyse par EMSA (electrophoretic mobility shift assay).....	- 95 -
6.1.	Extraction des protéines nucléaires.....	- 95 -
6.2.	Gel-shift (ou retard sur gel)	- 96 -
7.	Analyse zymographique	- 97 -
7.1.	Préparation des milieux conditionnés.....	- 97 -
7.2.	Zymographie en gel de gélatine	- 97 -
8.	Analyse par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	- 98 -
9.	Analyse en RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction)	- 98 -

9.1.	Préparation des ARN	- 98 -
9.2.	Transcription inverse	- 99 -
9.3.	PCR	- 99 -
10.	Analyse statistique des résultats obtenus	- 101 -
RESULTATS		- 102 -
<u>1^{ère}</u> partie : induction de la production d'IL-1 β par les peptides d'élastine dans les cellules de mélanome		- 103 -
<u>2^{ème}</u> partie : Effets des peptides d'élastine sur la polarisation Th1 des lymphocytes T		- 130 -
<u>3^{ème}</u> partie : Résultats complémentaires		- 142 -
A. Influence d'une co-stimulation des cellules M ₃ Da par l'IL-1 β et les PDE sur l'expression de GRO α et de l'IL-8 : Implication de la voie NF- κ B		- 142 -
A.1. Analyses des expressions de l'IL-8 et de GRO α		- 142 -
A.2. Analyse de la voie NF- κ B		- 143 -
B. Influence de l'activation des lymphocytes T par les PDE sur le comportement des cellules de mélanome		- 145 -
B.1. Niveau d'expression de l'IL-1 β dans des lymphocytes T humains activés par les PDE		- 145 -
B.2. Effets des milieux conditionnés de lymphocytes sur l'expression de l'IL-8 dans les cellules M ₃ Da		- 146 -
C. Conclusions sur les résultats complémentaires		- 148 -
DISCUSSION GENERALE		- 149 -
1. Activité biologique des PDE sur une lignée de mélanome		- 150 -
2. Régulation du gène de l'IL-1 β par les PDE		- 153 -
3. Influence des PDE sur la différenciation de cellules T : Application au mélanome		- 156 -
3.1. PDE et autres composants matriciels dans la polarisation des lymphocytes T		- 156 -
3.2. Rôle potentiel des PDE dans la réponse immunitaire dirigée contre le mélanome		- 158 -
3.2.1. La médiation cellulaire T anti-mélanome		- 158 -
3.2.2. Implication des PDE dans la défense anti-tumorale appliquée au mélanome		- 159 -
CONCLUSIONS, PERSPECTIVES		- 161 -
BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE		- 164 -
REFERENCES		- 167 -

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAA	Anévrisme Aortique Abdominal
ACTH	Corticotropine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMPc	Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
AP-1, -2	<i>Activator protein-1, -2</i>
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BFA	Bréfeldine A
bFGF	<i>basic-Fibroblast Growth Factor</i>
BCR	<i>B Cell Receptor</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumine</i>
CK2	Caséine Kinase-2
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CRE	<i>cAMP-Response Element</i>
CREB	<i>cAMP-Response Element Binding protein</i>
CSAIDs	<i>Cytokine Suppressing Anti-Inflammatory Drugs</i>
DAG	Diacylglycérol
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
EBP	<i>Elastin binding protein</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(b-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACIT	<i>Fibre Associated Collagens with Interrupted Triple Helices</i>
GMPc	Guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
ICE	<i>IL-1β Converting Enzyme</i>
IFN α , γ	Interféron- α , - γ
IGF-1	<i>Insulin-Like Growth Factor</i>

IKK	<i>IκB-Kinase</i>
IL-	Interleukine-
IL-1R	Récepteur de l'Interleukine-1
IL-1Ra	<i>Interleukin-1 Receptor antagonist</i>
IL-1R-AcP	<i>IL-1 Receptor Accessory Protein</i>
IP ₃	Inositol 3, 4, 5-trisphosphate
I κ B	Inhibiteur de NF- κ B
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JDE	Jonction dermo-épidermique
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
LacCer	<i>Lactosyl Ceramide</i>
LOX	Lysyl Oxydase
LPS	Lipopolysaccharide
MAGP	<i>Microfibrills Associated Glycoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Kinase</i>
MC1R	Mélanocortine-1
MEC	Matrice Extracellulaire
MEF-2	<i>MADS box transcription Enhancer Factor-2</i>
MEK	MAPK/Erk Kinase
MGSA/GRO	Melanoma Growth Stimulatory Activity / Growth-Regulated Oncogene
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MSH	<i>Melanocyte Stimulating Hormone</i>
MSK-1, -2	<i>Mitogen- and Stress-activated protein Kinase-1, -2</i>
Nase	Neuraminidase
NEMO	<i>NF-κB Essential Modulator</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pb	paire de bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE	Peptides issus de la Dégradation de l'Elastine
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PFA	Paraformaldehyde

PHA	Phytohemagglutinine A
PI ₃ -K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PKG	Protéine Kinase G
PP	Protéine Protectrice
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RT	<i>Reverse Transcription</i>
SALT	<i>Skin Associated Lymphoid Tissue</i>
SAPK	<i>Stress Activated Protein Kinase</i>
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SFA	Substance Fondamentale Amorphe
S-gal	<i>Spliced-galactosidase</i>
SIE	<i>Sis Inducible Enhancer</i>
SP-1	<i>Specific protein-1</i>
SRE	<i>Serum responsive element</i>
SRF	<i>Serum-Response Factor</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SVF	Sérum de veau foetal
TBE	Tris-borate EDTA
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th1, 2	<i>T helper type-1, -2</i>
TIL	<i>Tumour Infiltrating Lymphocyte</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TMB	Tétraméthylbenzidine
TNFα	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TRE	<i>TPA Responsive Element</i>
TSP-1	Thrombospondine-1
U.V.	Ultraviolets
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
β-Gal	β-galactosidase

LISTE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

- Schéma 1 :** *Représentation de la peau et des annexes cutanées*
- Schéma 2 :** *Représentation des couches épidermiques*
- Schéma 3 :** *Maturation des mélanosomes*
- Schéma 4 :** *Voies de synthèse des pigments mélanocytaires*
- Coupe 1 :** *Coupes de peau – Diffusion de mélanine*
- Schéma 5 :** *Représentation de la jonction dermo-épidermique*
- Coupe 2 :** *Coupe de peau – les couches du derme*
- Schéma 6 :** *Taux d'incidence et de mortalité du mélanome en fonction de l'âge*
- Schéma 7 :** *Illustration des quatre grandes variétés de mélanomes*
- Schéma 8 :** *Illustration des marqueurs pronostiques selon Breslow et Clark et Mihm*
- Tableau 1 :** *Corrélation entre l'indice de Breslow et les risques de récurrence et décès après 5 et 10 ans*
- Tableau 2 :** *Niveau d'invasion selon Clark et Mihm*
- Tableau 3 :** *Système de classification de l'American Joint Committee on Cancer*
- Schéma 9 :** *Régulation de la croissance du mélanome par les facteurs de croissance et les cytokines autocrines et paracrines*
- Schéma 10 :** *Molécules d'adhésion exprimées par le mélanocyte et le mélanome*
- Tableau 4 :** *Macromolécules et matrikines issues des membranes basales participant à la régulation de la cellule de mélanome*
- Schéma 11 :** *Schéma de différenciation des cellules T dans le thymus*
- Schéma 12 :** *Schématisation de la balance Th1 / Th2*
- Tableau 5 :** *Nouvelle nomenclature des dix membres de la superfamille de l'IL-1*
- Schéma 13 :** *Schématisation des éléments régulateurs du promoteur du gène de l'IL-1 β*
- Schéma 14 :** *Les trois mécanismes proposés pour la sécrétion de l'IL-1 β*
- Tableau 6 :** *Nouvelle nomenclature des neuf membres de la famille du récepteur de l'IL-1*
- Schéma 15 :** *Modèle de liaison de l'IL-1 β à son récepteur membranaire et ses antagonistes*
- Schéma 16 :** *Voies de signalisation induites par l'IL-1 β*
- Schéma 17 :** *Cascades de signalisation MAPK*
- Schéma 18 :** *Les protéines des familles NF- κ B et I κ B*
- Schéma 19 :** *Activation de NF- κ B p50/p65*
- Schéma 20 :** *Participation de l'IL-1 β dans la manifestation de l'inflammation systémique*

- Schéma 21 :** *Modèles structuraux proposés de l'élastine*
- Schéma 22 :** *Schématisation de l'étirement des fibres d'élastine*
- Schéma 23 :** *Structure de l'ADNc de la tropoélastine humaine*
- Schéma 24 :** *Représentation schématique des domaines fonctionnels du promoteur du gène de l'élastine*
- Schéma 25 :** *Schématisation de la sécrétion et assemblage de l'élastine*
- Schéma 26 :** *Structure et formation des liaisons croisées de l'élastine*
- Tableau 7 :** *Effets biologiques des PDE en fonction de leur nature et des cellules cibles*
1^{ère} partie
- Tableau 8 :** *Effets biologiques des PDE en fonction de leur nature et des cellules cibles*
2^{ème} partie
- Schéma 27 :** *Schématisation de l'épissage alternatif du transcrit primaire de la β -Gal*
- Schéma 28 :** *Résumé des données de la littérature concernant les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine*

MATERIELS ET METHODES

- Schéma 29 :** *Schématisation du principe d'élutriation*
- Tableau 9 :** *Anticorps et réactifs couplés à des fluorochromes utilisés pour les analyses de marquages membranaires et intracytoplasmiques*
- Tableau 10 :** *Anticorps utilisés en western-blot*
- Tableau 11 :** *Oligonucléotides utilisés pour les analyses en PCR*

RESULTATS

Publication 1 :

- Figure 1 :** *Influence des PDE sur la production et l'expression d'IL-1 β in vitro*
- Figure 2 :** *La régulation positive de l'expression d'IL-1 β par les PDE nécessite un appariement à S-gal*
- Figure 3 :** *Régulation des voies MAPK et de l'activation de AP-1 par les PDE et leurs conséquences sur l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β dans les cellules de mélanome*
- Figure 4 :** *Activation de la voie NF- κ B par les PDE dans les cellules M₃Da*
- Figure 5 :** *Influence de l'activation de la voie NF- κ B par les PDE sur l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β*
- Figure 6 :** *Les PDE augmentent la fixation de NF- κ B sur le promoteur du gène de l'IL-1 β*
- Tableau 1 :** *Comparatif des motifs de fixation de NF- κ B à l'ADN*

Publication 2 :

- Figure 1 :** *Régulation des cytokines lors de l'interaction des PDE avec des lymphocytes du sang périphérique exprimant le récepteur de l'élastine*
- Figure 2 :** *Régulation de l'expression intracellulaire des cytokines par les PDE dans les lymphocytes du sang périphérique activés par la PHA*
- Figure 3 :** *Régulation positive de l'IFN γ et de l'IL-2 par les PDE dans les lymphocytes du sang périphérique activés par la PHA*
- Figure 4 :** *Régulation de la voie Erk $\frac{1}{2}$, de l'activation d'AP-1 et de la sécrétion de proMMP-9 par les PDE dans les lymphocytes du sang périphérique*
- Figure I :** *Contribution du récepteur de l'élastine sur la synthèse des cytokines dans les cellules T CD4⁺ traitées par les PDE*
- Figure II :** *Régulation de l'expression intracellulaire des cytokine dans les lymphocytes du sang périphérique activés par l'IL-12 et traités ou non par les PDE*
- Figure III :** *Régulation de l'expression intracellulaire des cytokine dans les lymphocytes du sang périphérique activés par l'IL-4 et traités ou non par les PDE*

Résultats complémentaires :

- Figure 1 :** *Analyse par RT-PCR de la modification d'expression des chimiokines IL-8 et GRO α par l'IL-1 β et les PDE dans les cellules M₃Da*
- Figure 2 :** *Analyse par EMSA du niveau d'activation du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules M₃Da stimulées par l'IL-1 β et les PDE*
- Figure 3 :** *Analyse par RT-PCR de la modification d'expression de l'IL-1 β dans des lymphocytes activés par la PHA et les PDE*
- Figure 4 :** *Analyse par RT-PCR de la modification d'expression de l'IL-8 dans les cellules M₃Da par des milieux conditionnés de lymphocytes*

DISCUSSION GENERALE

- Schéma 30 :** *Hypothèse de régulation croisée des facteurs de transcription dans les cellules de mélanome par les PDE*

INTRODUCTION

Contexte scientifique

L'homéostasie cellulaire détermine le nombre, la morphologie, la distribution dans l'espace et les fonctions des cellules. Pour former une entité homogène, les cellules reposent sur une architecture tridimensionnelle appelée Matrice Extracellulaire (MEC), composée de macromolécules diverses telles que des collagènes, des fibres élastiques, des glycoprotéines et des protéoglycannes. La MEC n'est pas une entité inerte ; elle exerce une influence directe sur le comportement des cellules via des récepteurs situés à leur surface membranaire. Ainsi la MEC peut engendrer la migration, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire [Gimond et Aumailley, 1992], et donc jouer un rôle important dans les processus impliquant une modification de l'architecture tissulaire tels que la cicatrisation ou l'invasion tumorale.

Lors de processus physiologiques normaux tels que l'embryogenèse, la cicatrisation ou le vieillissement mais aussi dans certains contextes physiopathologiques comme l'inflammation ou la progression tumorale, la MEC est dégradée libérant de nombreux peptides biologiquement actifs (matrikines) et qui, pour certains, étaient jusque là « invisibles » pour les cellules (matrikines cryptiques) [Schenk et Quaranta, 2003] [Maquart et coll., 2005]. Par ailleurs, la MEC renferme de nombreuses molécules solubles, telles que des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance, qui sont libérées lors de la protéolyse matricielle et peuvent ainsi exercer leurs effets spécifiques sur les cellules avoisinantes [Mott et Werb, 2004].

Certains tissus comme les poumons, les vaisseaux sanguins et la peau sont le siège de processus inflammatoires et/ou tumoraux conséquents de fortes contraintes physico-chimiques externes. L'élastine est un élément matriciel commun de ces différents tissus. Sa dégradation entraîne la libération de matrikines dont l'implication a été démontrée dans l'emphysème pulmonaire, l'athérosclérose aortique et plus récemment dans le cadre de la progression tumorale du mélanome (tumeur cutanée). Les rôles attribués à ces peptides issus de la dégradation de l'élastine (PDE) sont nombreux et permettent notamment d'accroître la protéolyse matricielle

soit en augmentant directement la synthèse d'enzymes protéolytiques (Métalloprotéinases matricielles, sérines protéases) par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire, soit en exerçant un chimiotactisme sur des cellules inflammatoires capables de dégrader la MEC (polynucléaires neutrophiles, macrophages, ...).

Bien que les mécanismes inflammatoires et tumoraux aient souvent été étudiés distinctement, il existe cependant une relation étroite entre ces deux processus. En effet, de nombreuses cellules participant à la réaction inflammatoire sont retrouvées en périphérie et au sein même des tumeurs cancéreuses. La thérapie cellulaire s'inspire de cette observation en conditionnant des cellules immunitaires (lymphocytes) à une meilleure reconnaissance des antigènes tumoraux et donc à l'initiation d'une réaction immune plus efficace contre les cellules cancéreuses. Cependant, les cellules tumorales peuvent détourner cette stratégie en exprimant de nouveaux antigènes non reconnus. Ce phénomène témoigne d'un réel dialogue entre les cellules inflammatoires et les cellules cancéreuses. Le dialogue intercellulaire se manifeste généralement par l'expression de facteurs solubles : les cytokines.

Afin de mieux comprendre les mécanismes liant l'inflammation à la progression du mélanome, nous avons étudié l'influence de protagonistes tels que les PDE sur l'expression de cytokines capables de modifier à la fois le comportement des cellules immunitaires et des cellules tumorales au cours des processus invasifs.

1. Histologie et physiologie de la peau

La peau est l'organe élastique externe recouvrant l'organisme et représente environ 3% de la masse corporelle. Les principales fonctions de la peau sont de protéger l'individu contre les agressions environnementales en jouant un rôle de barrière et de thermoréguler l'organisme afin de limiter les dépenses énergétiques. De plus, ce tissu possède de nombreux récepteurs sensoriels tactiles et des fonctions immunes qui lui sont propres.

Anatomiquement, la peau est subdivisée en couches superposées (Schéma 1) :

- L'épiderme
- La jonction dermo-épidermique (JDE)
- Le derme
- L'hypoderme

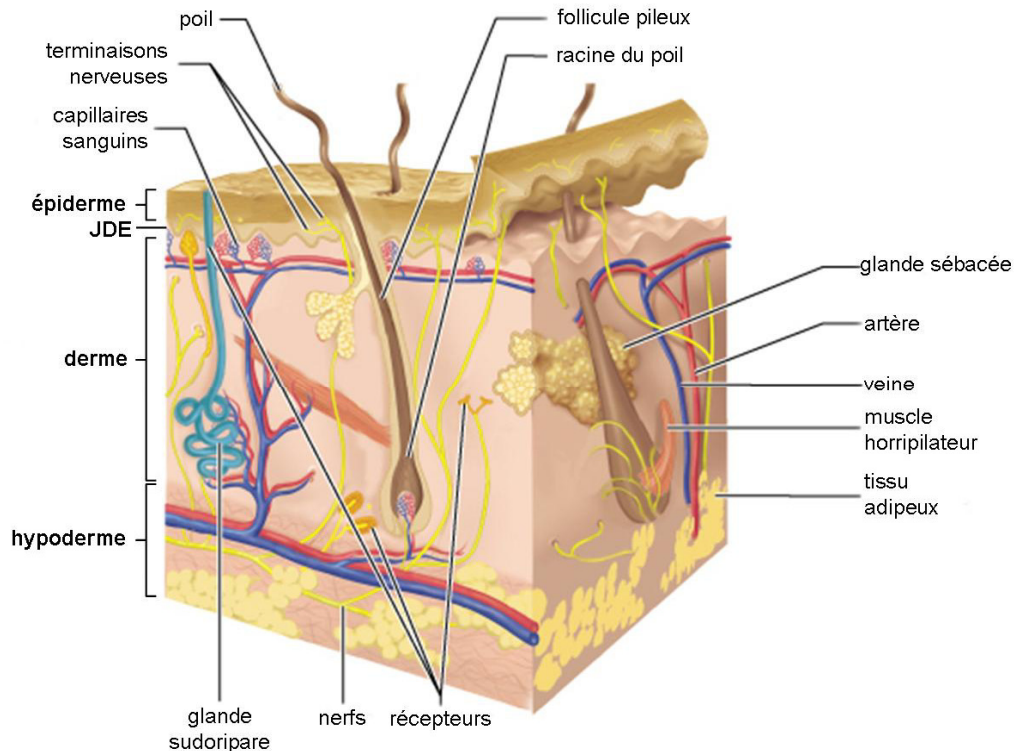


Schéma 1 : Représentation de la peau et des annexes cutanées (tiré de la page web : www.cnrs.fr/cw/dissiers/doschim/imArt/peau/derme01.html)

1.1. L'épiderme

Il s'agit de la couche la plus externe en contact direct avec l'environnement. Son épaisseur varie de 100 μm à 1 mm selon la partie du corps (paupières et paumes respectivement). L'épiderme est principalement organisé en strates kératinisées pouvant être renouvelées en 4 à 6 semaines et reposant sur une membrane basale (ou JDE).

On distingue quatre types cellulaires constituant l'épiderme :

- Le kératinocyte
- Le mélanocyte
- La cellule de Langerhans
- La cellule de Merkel

1.1.1. Le kératinocyte

Cette cellule représente 80 à 85% du pool cellulaire total de l'épiderme. Les kératinocytes se multiplient depuis la couche basale puis migrent vers la surface en se différenciant pour former différentes couches décrites en microscopie optique (Schéma 2).

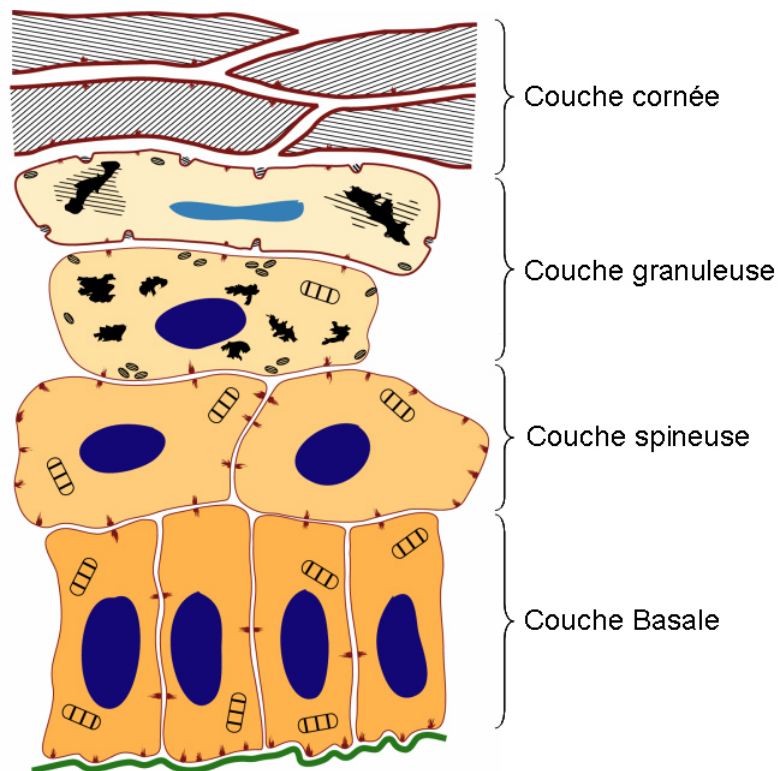


Schéma 2 : Représentation des couches épidermiques (tiré de la page web : www.theses.ulaval.ca/2002/19935/19935-Chapitre.html)

La *couche basale* comprend une assise de cellules en mitoses d'aspect cubique avec un noyau allongé perpendiculaire à la jonction dermo-épidermique. Ces cellules sont liées entre elles par des desmosomes.

La *couche spinieuse* est constituée de 4 à 6 strates de kératinocytes de forme polyédrique comprenant un noyau arrondi ; celui-ci s'aplatit au niveau des couches supérieures. Liés entre eux par des desmosomes au niveau des extensions cytoplasmiques, ces kératinocytes renferment la prékératine.

La *couche granuleuse* implique 1 à 4 assises de cellules caractérisées par un noyau allongé parallèle à la jonction dermo-épidermique. Ces kératinocytes contiennent des grains de kératohyaline.

La *couche cornée* est la plus externe. Elle est édifiée par des strates de cellules anucléées (cornéocytes) remplies de kératine. Les cornéocytes les plus superficiels finissent par se détacher de l'épiderme : c'est la desquamation.

L'assemblage des kératinocytes constitue une barrière très compacte limitant la pénétration des agents toxiques et infectieux. Cet édifice forme également un premier rempart contre les rayonnements ultraviolets (U.V.).

1.1.2. Le mélanocyte

Les mélanocytes sont des cellules mononucléées d'aspect dendritique. Ils naissent au niveau de la crête neurale et migrent lors du 3^{ème} mois de développement foetal jusque dans la couche basale de l'épiderme et dans les matrices des cheveux. Ces cellules dérivant de la crête neurale migrent également au niveau des yeux, de l'oreille interne et des leptoméniges (pie-mère). On dénombre de 1000 à 2000 mélanocytes par mm² de peau représentant 5 à 10% des cellules constituant l'épiderme.

La particularité des mélanocytes est de renfermer dans leur cytoplasme de nombreuses unités de pigmentation : les mélanosomes. Ces organelles sont initialement regroupées au centre de la cellule, près du noyau. On en distingue quatre types selon leur degré de maturation, c'est-à-dire selon la quantité de pigment brun (la mélanine) qu'ils contiennent (Schéma 3).

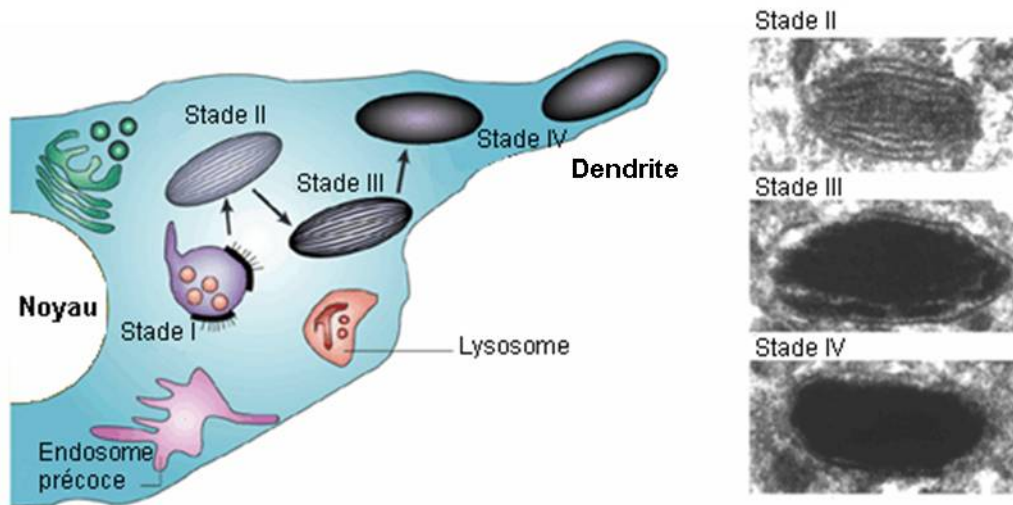


Schéma 3 : *Maturation des mélanosomes dans une dendrite de mélanocyte. A droite, images en microscopie électronique des stades II à IV (d'après L. Collinson and C. Hopkins, Imperial College, Londres, UK).*

Origine : Nature Reviews Molecular Cell Biology 2; 738-748 (2001)

La maturation des mélanosomes est régulée constitutivement par la melanocyte stimulating hormone (MSH), une hormone de la glande pituitaire. La formation de mélanine peut également être induite par une autre hormone, la corticotropine (ACTH), ou encore par les U.V.. La mélanine s'accumule dans les mélanosomes au fur et à mesure que ceux-ci progressent dans les dendrites des mélanocytes, le long de microtubules. Les mélanosomes sont ensuite sécrétés dans le milieu extracellulaire et diffusent vers les kératinocytes environnants afin d'optimiser la photoprotection de l'ADN de ces cellules. On estime qu'un mélanocyte peut alimenter une trentaine de kératinocytes en mélanine.

Deux types majeurs de mélanines ont été mis en évidence (Schéma 4) : l'eumélanine et la phaéomélanine. Ces pigments dérivent de la tyrosine (un acide aminé aromatique) qui est oxydé en présence d'O₂ et d'une enzyme particulière : la tyrosinase.

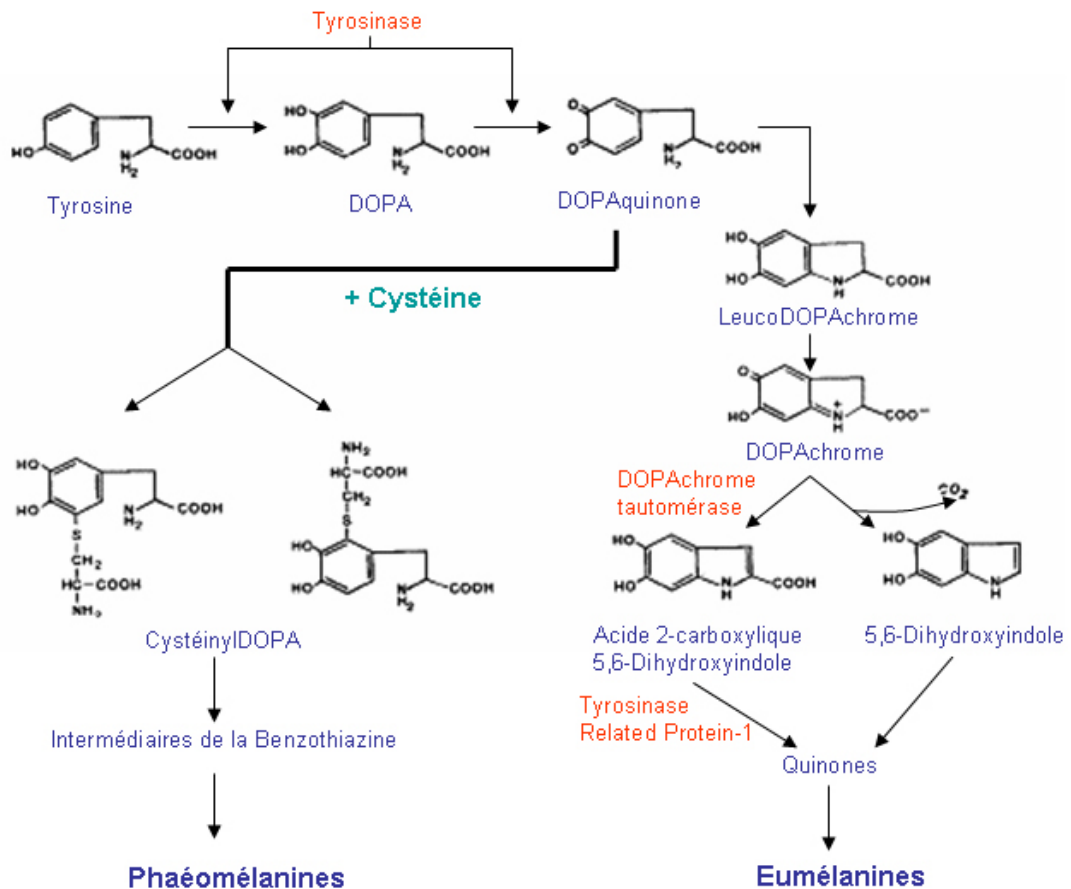
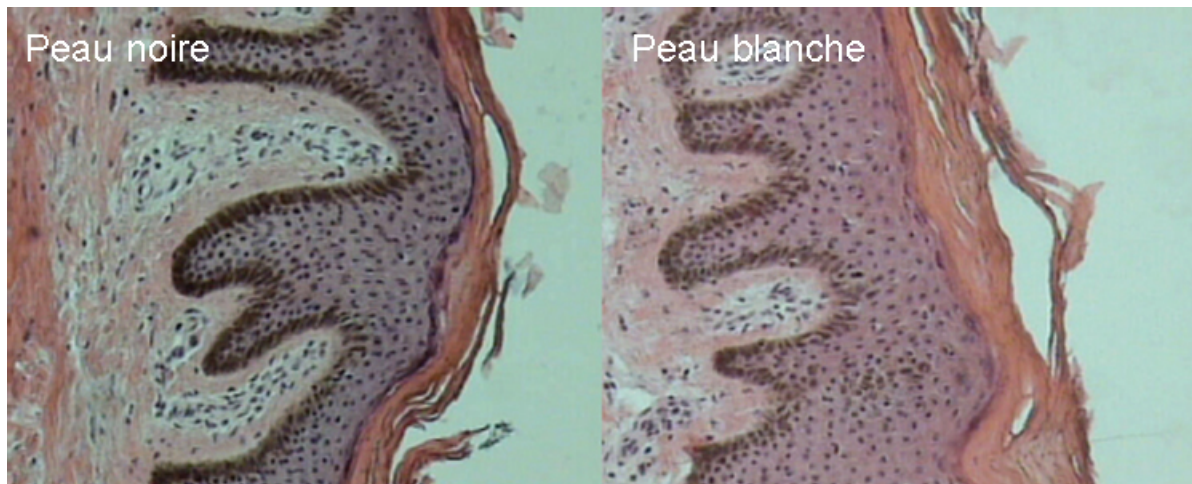


Schéma 4 : Voies de synthèse des pigments mélanocytaires (tiré de la page web : albinism.med.umn.edu/factpath.gif)

Le produit formé majoritairement est l'eumélanine, un polymère de couleur foncée allant de marron à noir. L'association de la MSH avec le récepteur de la mélanocortine 1 (MC1R) ou l'exposition aux U.V. conduisent à la production d'eumélanine (cuivre dépendante) responsable de la coloration de la peau, des cheveux et des yeux. Lorsque le récepteur MC1R est en contact avec la protéine Agouti, protéine réglant un dépôt de mélanine jaune dans le poil de certains mammifères, la production de mélanine s'oriente vers la synthèse de phaéomélanine (soufre dépendante). C'est un monomère de couleur plus clair allant de jaune à rouge. Ce pigment détermine généralement des individus à peau très claire, aux cheveux roux et aux yeux verts. Ainsi, les phototypes de peau ne sont pas dus à la quantité de mélanocytes mais à la production plus ou moins importante de pigments et au type de mélanine produite (coupe 1).



Coupe 1 : Coupes de peau (coloration hématoxyline éosine) observées au microscope x100. Les mélanocytes sont en nombre identique, mais la diffusion de mélanine vers les kératinocytes est plus importante dans la peau noire (tiré de la page web : www.crdp-montpellier.fr/ressources/RD/SVT/JDID/JDid01/JDid01.pdf)

1.1.3. La cellule de Langerhans

Représentant 3 à 4% des cellules de l'épiderme, les cellules de Langerhans se retrouvent principalement au niveau de la couche spinieuse et très minoritairement dans les autres couches.

Ces cellules d'origine hématopoïétique migrent dans la peau pour capter les antigènes exogènes. Leur rôle consiste d'une part à initier la réponse immunitaire en présentant les antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ au niveau des ganglions lymphatiques. D'autre part, les cellules de Langerhans interviennent dans les processus de prolifération et de différenciation des kératinocytes.

1.1.4. La cellule de Merkel

Ce type cellulaire est retrouvé au niveau de la couche basale épidermique et dans les muqueuses. Les cellules de Merkel sont en contact direct avec les terminaisons nerveuses dermiques et leur rôle semble se limiter à la sensibilité tactile.

1.2. La jonction dermo-épidermique (JDE)

Également appelée lame basale épidermique, la JDE est une structure fine d'origine à la fois dermique (fibroblastes) et épidermique (kératinocytes) dont le

principal rôle structural est d'assurer un accrochage solide entre le derme et l'épiderme. D'une épaisseur d'environ 100 nm, la JDE est divisée en 4 couches distinctes

(Schéma 5) :

La *membrane plasmique des kératinocytes basaux* est représentée par les hémidesmosomes qui constituent la plaque d'ancrage des kératinocytes basaux épidermiques au derme adjacent.

La *lamina lucida* est traversée par les filaments d'ancrage (laminine-1, -5 et -6). Ces filaments sont retrouvés en grande quantité au niveau des hémidesmosomes et forment un réseau avec la partie extracellulaire des intégrines $\alpha 6 \beta 4$ à la surface des kératinocytes.

La *lamina densa* est majoritairement composée de collagène de type IV, mais on retrouve également des protéoglycannes, du nidogène et de la laminine-1 au sein de cette structure.

La *zone fibrillaire* contient des fibres d'ancrage composées de collagène de type VII. Ces fibres sembleraient être en contact étroit avec la laminine-5 des fibrilles d'ancrage.

La JDE assure le soutien entre l'épiderme et le derme et permet également la migration des kératinocytes, essentielle dans le processus de cicatrisation cutanée, ainsi que les échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments.

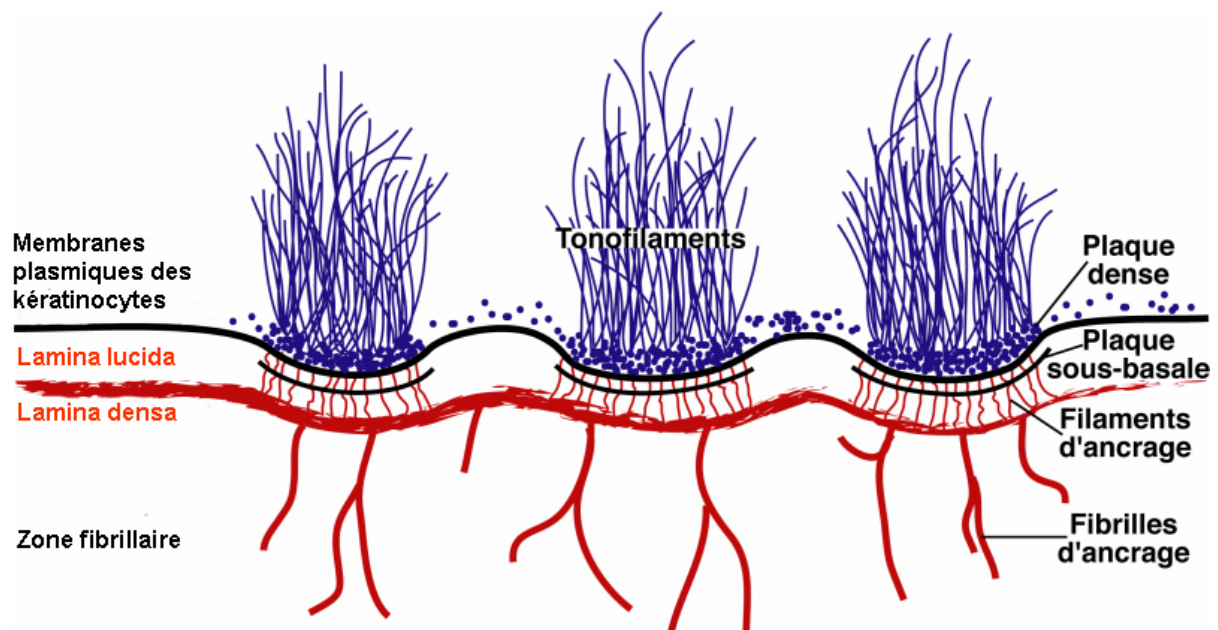
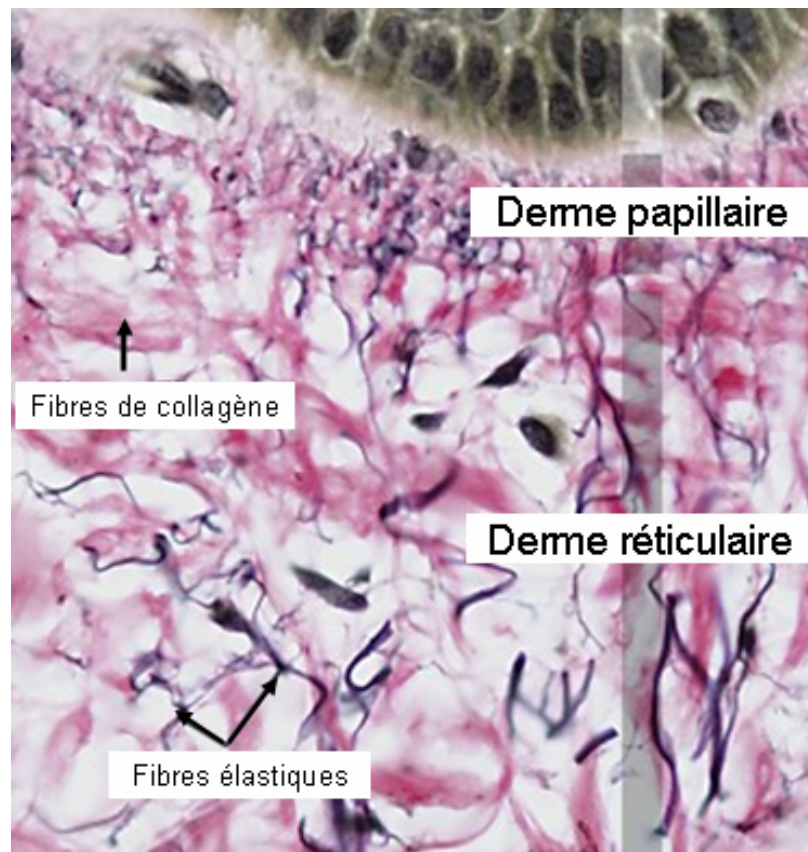


Schéma 5 : Représentation de la jonction dermo-épidermique (tiré de la page web : www.theses.ulaval.ca/2002/19935/19935-Chapitre.html)

1.3. Le derme

C'est le tissu conjonctif de soutien de la peau. Le derme est constitué d'une MEC épaisse (2 mm en moyenne) synthétisée par les fibroblastes dermiques. Cette entité assure l'élasticité, la résistance et la compressibilité de la peau mais permet également d'apporter les nutriments nécessaires à l'épiderme par les capillaires sanguins qu'elle contient (coupe 2).



Coupe 2 : Coupe de peau (coloration van Gieson et elastine) faisant apparaître les couches papillaire et réticulaire du derme. (tiré de la page web : www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.html)

1.3.1. La matrice dermique

Le derme renferme la plupart des constituants de la MEC. Cependant quelques macromolécules sont plus particulièrement représentées : les collagènes, les fibres élastiques et les composants de la substance fondamentale amorphe (glycosaminoglycanes et protéoglycanes).

1.3.1.1. Les collagènes

La composante majeure de la matrice dermique est constituée par les collagènes (80% de type I, et 20% de type III). Les fibres de type I sont plus robustes et retrouvées essentiellement au niveau du derme réticulaire alors que les fibres de type III sont plus fines et demeurent principalement dans le derme papillaire en continuité de la zone fibrillaire de la JDE, ainsi qu'autour des vaisseaux sanguins. D'autres collagènes (type V et VI) sont présents dans le derme mais sont plus éparses et en quantités restreintes. Les fibres de collagène sont formées dans l'espace extracellulaire, et consistent en un assemblage bout à bout et côte à côte de molécules de tropocollagène synthétisées par les fibroblastes. Chaque molécule de tropocollagène est composée de trois chaînes α polypeptidiques s'enroulant en une triple hélice, et de régions globulaires de nature glycoprotéique à chaque extrémité (télopeptides). La partie en triple hélice est composée de la répétition du triplet GXZ, où X est une proline et Z une hydroxyproline dans 30 % des cas. Des liaisons croisées intermoléculaires stabilisent ces fibres et leur confèrent une résistance accrue à l'action d'enzymes catalytiques. Les collagènes sont classés en fonction de leur structure quaternaire : les types I, II, III, V et XI sont de type fibrillaire ; les types IX, XII et XIV sont étroitement associés à des fibrilles de collagènes et sont appelés collagènes FACIT (*Fibre-Associated Collagens with Interrupted Triple Helices*) ; les types VIII et X forment des réseaux hexagonaux.

1.3.1.2. Les fibres élastiques

La matrice dermique est aussi composée de fines fibres élastiques (environ 3%) entrecroisées dans le réseau de collagène, assurant les propriétés rhéologiques de souplesse de la peau. La structure et les propriétés des fibres élastiques, et plus particulièrement de l'élastine, sont développées au chapitre 5 de cette introduction.

1.3.1.3. La substance fondamentale amorphe

Une autre composante importante de cette matrice est la substance fondamentale amorphe (SFA). Composée des mucopolysaccharides acides, cette substance est abondamment retrouvée au niveau du derme papillaire et lors de la cicatrisation. Riche en acide hyaluronique, la SFA est dotée d'un grand pouvoir d'imbibition et de turgescence. Elle dérive soit des fibroblastes dermiques (glycosaminoglycanes, protéoglycanes), soit du plasma sanguin.

Les glycosaminoglycanes sont de longues chaînes polysaccharidiques constituées de la répétition d'un même motif disaccharidique. Les principaux glycosaminoglycanes sont l'acide hyaluronique, le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'héparine et le kératane-sulfate.

Les protéoglycanes sont formés par un noyau protéique sur lequel se lient les glycosaminoglycanes. Les plus répandus sont la décorine, l'aggrécane, le β -glycane, le serglycine et le syndécane-1.

1.3.2. Les cellules dermiques

Les cellules dermiques sont très majoritairement présentes dans le derme réticulaire. Elles assurent le renouvellement de la matrice dermique, et constituent également la première barrière de défense immunitaire contre les pathogènes.

- ☞ Le *fibroblaste dermique* assure la synthèse des macromolécules de la matrice dermique (collagènes, fibres élastiques, SFA) ainsi que les enzymes nécessaires à la dégradation de ces mêmes macromolécules. Cette cellule est ainsi responsable du renouvellement et de la cicatrisation du tissu dermique.
- ☞ Le *myofibroblaste* est une cellule contractile présente dans les tissus cicatriciels.
- ☞ Les *cellules endothéliales* forment des réseaux de fins capillaires responsables de la microcirculation cutanée.
- ☞ Les *lymphocytes*, *macrophages* et *mastocytes* participent à l'immunité cutanée en prévenant l'intrusion de pathogènes et en éliminant les cellules anormales ou mortes du tissu dermique.

1.4. L'hypoderme

Il s'agit de la couche la plus profonde de la peau. Sa structure comprend principalement des lobules graisseux formés par les agrégats d'adipocytes dont le cytoplasme varie de volume selon les stocks lipidiques qu'il contient (variable selon l'âge, le sexe, l'alimentation ou la partie du corps). Les septa interlobulaires sont formés de tissu conjonctif laissant passer les fibres nerveuses et vasculaires.

L'hypoderme, en plus de son rôle de réserve énergétique via les stocks lipidiques qu'il contient, permet d'isoler l'organisme des déperditions de chaleur et

d'absorber les chocs. Enfin, l'hypoderme accueille la base de nombreuses annexes cutanées.

1.5. Les annexes cutanées

1.5.1. Les follicules pilo-sébacés

Ce type de follicule comprend 3 composantes : le poil, la glande sébacée et le muscle arrecteur du poil.

Le *poil* provient d'une invagination de l'épiderme dans le derme. Ceci constitue la gaine épithéliale du poil qui se renfle à son extrémité par un amas de cellules matricielles. La prolifération de ces cellules donne naissance à des cellules épithéliales qui se kératinisent au fur et à mesure de leur progression vers la surface cutanée. La couleur du poil lui étant conférée par la quantité de pigment renfermée.

La *glande sébacée*, annexée au poil, a pour fonction de sécréter un produit lipidique : le sébum. La portion sécrétrice est composée d'alvéoles dilatées et dont la paroi est formée de cellules cubiques. Des cellules polyédriques au centre de la glande se chargent de gouttelettes lipidiques jusqu'à disparition du noyau. Le canal excréteur débouche quant à lui au niveau de la gaine épithéliale du poil.

Le *muscle arrecteur (ou horripilateur) du poil* est un petit muscle lisse à innervation sympathique. Sa contraction entraîne le redressement du poil sous l'effet du froid ou encore de la peur.

1.5.2. Les glandes sudoripares

Il s'agit de glandes exocrines permettant de sécréter la sueur. Ces glandes sont constituées d'un épithélium cubique simple entouré de cellules myo-épithéliales. Les glandes sudoripares logent au niveau du derme profond et le canal excréteur gagne la surface cutanée en suivant un trajet hélicoïdal.

1.5.3. Les ongles

Les ongles sont formés de cellules épithéliales kératinisées. Leur croissance est ininterrompue du fait de l'absence de desquamation.

1.6. Les fonctions immunes de la peau

Bien que le système immunitaire soit disséminé dans l'ensemble des tissus, il s'est adapté afin d'optimiser les besoins spécifiques à chaque organe. Au cours de l'évolution, la peau a développé un environnement immunologique spécifique connu sous le nom de *Skin Associated Lymphoid Tissue* (SALT). Le SALT est principalement constitué i) des cellules de Langerhans et des cellules dermiques présentatrices d'antigènes (CPA) dont les cellules dendritiques qui circulent entre la peau et les ganglions lymphatiques, ii) les kératinocytes et des cellules endothéliales qui produisent une grande variété de cytokines et de facteurs de croissance, iii) de lymphocytes qui sortent de la circulation sanguine par extravasation pour migrer vers le tissu cutané. Tous ces acteurs sont orchestrés de façon à optimiser la détection des antigènes environnementaux [Debenedictis et coll., 2001].

1.6.1. Immunité innée et adaptive

L'immunité innée constitue la première ligne de défense. Elle est capable d'une réponse rapide, et répond de la même façon aux expositions répétées à un même pathogène. L'immunité innée implique i) des barrières physico-chimiques telles que l'épithélium et les substances anti-microbiennes présentes à la surface de l'épithélium ; ii) des cellules phagocytaires (neutrophiles et macrophages) et des cellules *Natural Killer* (NK) ; iii) le système du complément ; iv) des cytokines. L'immunité innée est provoquée par des structures communes trouvées sur les pathogènes (*ie*, ARN double brin des virus ou les lipopolysaccharides (LPS) bactériens), et qui ne sont pas présentes sur les cellules des mammifères [Medzhitov et Janeway, 1997].

L'immunité adaptive est caractérisée par une spécificité et une diversité vis-à-vis de macromolécules antigéniques distinctes et par une capacité à « mémoriser » ou produire une réponse secondaire accrue suite à l'exposition répétée à un antigène. Cette immunité acquise offre une capacité particulière à distinguer des pathogènes et des macromolécules pouvant avoir des structures très proches, par l'intermédiaire de récepteurs très spécifiques à la surface des cellules T (TCR pour *T Cell Receptor*) ou B (BCR pour *B Cell Receptor*).

On distingue deux types d'immunités adaptatives pour éliminer et détruire différentes formes d'antigènes [Parker, 1993]. D'une part la réponse humorale fait

intervenir les lymphocytes B ; c'est le mécanisme principal de défense contre les antigènes extracellulaires. D'autre part, la réponse cellulaire médiée par les lymphocytes T et qui est adaptée à une réponse dirigée contre les antigènes intracellulaires. Les cellules T ont pour cible des virus ou des bactéries qui survivent et prolifèrent à l'intérieur de cellules et qui sont inaccessibles pour les anticorps circulants [Healy et Goodnow, 1998]. Les cellules T exercent leurs effets par une lyse cellulaire directe.

1.6.2. Induction de la réponse immune cutanée

Puisque des toxines et des agents infectieux passent continuellement la barrière épithéliale, une réponse immune rapide doit être mise en place contre ces agents. La nature vive de cette réponse repose sur un mécanisme non-spécifique assurant une protection jusqu'à ce que l'immunité spécifique se développe [Medzhitov et Janeway, 1997]. Les kératinocytes, les cellules endothéliales, les cellules de Langerhans et d'autres types cellulaires médient une réponse immunitaire via des cytokines qui ont pour fonction de moduler l'inflammation cutanée et d'affecter la prolifération cellulaire. Suite à des dommages mécaniques ou chimiques, les kératinocytes vont augmenter leur production d'interleukine (IL)-1 qui initie la cascade inflammatoire. En réponse aux cytokines sécrétées par les kératinocytes, les fibroblastes dermiques vont amplifier le processus en produisant à leur tour de l'IL-1 mais également deux autres cytokines pro-inflammatoires : l'IL-6 et le *Tumor Necrosis Factor* (TNF) α . Les cytokines diffusent alors jusqu'aux cellules endothéliales pour solliciter une réponse inflammatoire dans l'épiderme. L'IL-1 engendre le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles, des leucocytes mononucléés et des lymphocytes depuis la circulation sanguine jusqu'à l'épiderme. L'IL-1 est également responsable de la maturation des cellules dendritiques immunocompétente et de la production de cytokines chimio-attractantes telle que l'IL-8 [Debenedictis et coll., 2001].

Enfin, une sous-classe particulière de lymphocytes T épidermiques (cellules T γ/δ) est capable de se lier directement à de petits antigènes contenant du phosphate. Ces cellules T ne nécessitent pas de présentation d'antigène par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), et apportent une réponse immune immédiate.

1.6.3. Devenir de la réponse immune cutanée

Les lymphocytes T CD4⁺ ayant migré jusqu'au site inflammatoire vont subir une ultime différenciation, soit vers la voie pro-inflammatoire *T helper* de type 1 (Th1), soit vers la voie anti-inflammatoire *T helper* de type 2 (Th2) (voir chapitre 3.2 de cette introduction).

Les cellules T présentes au site inflammatoire sécrètent de l'interferon (IFN) γ , de l'IFN α et du TNF α qui stimulent la production d'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques [Flesch et coll., 1995]. L'IL-12 induit alors la différenciation des cellules T vers un profil de sécrétion de type Th1, ce qui se traduit par une production accrue d'IFN γ . L'importante production d'IFN γ stimule l'activité phagocytaire et induit localement l'expression de E-selectine résultant en une migration préférentielle des cellules Th1 au site inflammatoire.

La réponse Th2 peut être induite si l'antigène est trop encombrant pour subir une phagocytose. Dans ce cas, les leucocytes vont préférentiellement produire de l'IL-10 plutôt que de l'IL-12. Ainsi les cellules T vont entrer dans un environnement très concentré en IL-10 et peu concentré en IFN γ favorisant la différenciation Th2 faisant intervenir la production d'anticorps. De plus ce profil cytokinique va attirer les mastocytes (*i.e.* des réactions médiées par les IgE, pour les parasites ou les allergènes) sans stimuler les cellules phagocytaires, et induire la sécrétion d'IL-4 par les mastocytes dermiques. La présence d'IL-4 peut induire les nouvelles cellules T vers une polarisation Th2.

1.6.4. Résolution de la réponse immune cutanée

L'arrêt de la réponse immunitaire dépend de la mort des lymphocytes et de l'inactivation de la réponse inflammatoire [Sprent, 1994]. Brièvement, les cellules phagocytaires commençant à éliminer un grand nombre de pathogènes, cela diminue l'exposition aux facteurs antigéniques stimulant la réponse innée. Il y a donc une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires, permettant aux molécules suppressives (IL-10, *Transforming Growth Factor*- β :TGF β) de s'accumuler et d'arrêter l'inflammation. De plus, des défenses alternatives se développent si l'élément déclencheur de l'inflammation n'est pas éliminé en quelques jours ou semaines. L'inflammation prolongée conduit à la formation d'abcès ou d'escarre. Sous l'influence des cytokines Th2 (IL-10, IL-4), les macrophages

fusionnent pour former des cellules géantes et une réponse granulomateuse. Ces histiocytes géants et les fibroblastes recrutés isolent le site avec des fils de tissu conjonctif aboutissant à une sphère fibromateuse. La production prolongée de TGF β peut aboutir à une fibrose des tissus endommagés.

1.6.5. L'immunosurveillance tumorale cutanée

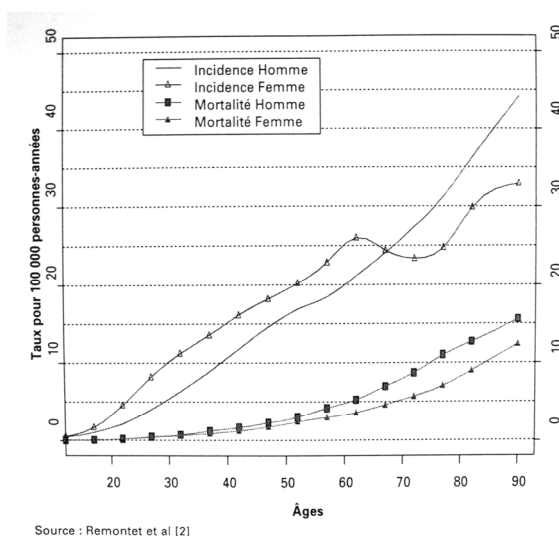
Le concept d'immunosurveillance a été suggéré dans les années 70 par Burnet pour qui le système immunitaire était impliqué dans l'élimination des cellules somatiques aberrantes ou mutées, empêchant ainsi ces cellules de développer des tumeurs [Burnet, 1970]. Cette notion a ensuite été confortée par deux observations. Premièrement, la régression spontanée de tumeurs telles que le mélanome ou le carcinome cutané baso-cellulaire, indique un rôle du système immunitaire cutané dans l'immunité anti-tumorale. Deuxièmement, les patients possédant un système immunitaire déprimé, comme dans le cadre du Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquise (SIDA), des transplantés rénaux ou pour des sujets âgés, ont une incidence tumorale élevée. Cela a particulièrement été bien décrit pour des patients australiens transplantés du rein pour qui les tumeurs cutanées sont communes et un lien avec l'exposition aux U.V. a pu être établi [Marshall, 1974]. Il est intéressant de noter que ces tumeurs cutanées ne sont le plus souvent pas des mélanomes. Ce sont des tumeurs moins antigéniques que les mélanomes, ce manque d'antigénicité combiné à l'immunosuppression leur permet de ne pas être détectées par le système immunitaire cutané. Les mélanomes étant quant à eux des tumeurs très antigéniques, l'avidité des cellules T pour ces cellules reste significative [Woods et coll., 2005].

Ces observations impliquent que les mélanomes sont des tumeurs dont le développement est en continuelle interaction avec le système immunitaire cutané. Pourtant, lorsque qu'un mélanome parvient à échapper au contrôle immunitaire, cette tumeur est extrêmement agressive et devient rapidement métastatique ne laissant que très peu de chance de survie aux patients.

2. Le mélanome

2.1. Epidémiologie

Les mélanomes sont des tumeurs malignes développées aux dépens des mélanocytes. Ce type de tumeur se retrouve principalement au niveau cutané. Parmi les cancers cutanés, le mélanome représente en France comme dans la plupart des pays occidentaux un problème important de santé publique. L'incidence de ce cancer double environ tous les 10 ans. Cette estimation est cependant faussée du fait d'exérèses systématiques permettant de diagnostiquer des mélanomes intraépidermiques qui n'auraient sans doute jamais évolué vers un mélanome invasif et donc n'auraient pas été comptabilisés dans l'incidence il y a 20-25 ans. En 1995, 4255 nouveaux cas de mélanome cutané ont été recensés en France [Ménégoz, La Documentation Française, 1998] contre 7231 en 2000, dont 42% chez l'homme et 58% chez la femme (Schéma 6) [Chérié-Challine et coll., BEH N°2/2004].



Source : Remontet et al [2]

Schéma 6 : Taux d'incidence et de mortalité en fonction de l'âge, France, 2000 (d'après Chérié-Challine et coll., Bulletin d'Epidémiologie Humaine N°2/2004).

Cependant la France, avec 5 à 8 nouveaux cas/100 000 habitants et par an, présente un taux intermédiaire d'incidence en comparaison avec les autres pays européens. C'est en Europe du Nord que l'on observe les taux les plus élevés (Norvège : 14 à 16 nouveaux cas/100 000 habitants/an), les taux les plus faibles étant estimés en Europe du Sud (Italie : 2 à 3 nouveaux cas/100 000 habitants/an)

[Devesa et coll., 1995]. Sur le plan mondial, le taux d'incidence le plus important est enregistré en Australie avec un taux moyen de 40 nouveaux cas/100 000 habitants et par an chez les sujets de race caucasienne. L'Afrique et l'Asie présentent quant à eux des taux très faibles et des valeurs intermédiaires sont observées en Amérique [Parkin, International Agency for Research on Cancer, Scientific publications N°155, 2002]. La mortalité tend à augmenter moins rapidement que l'incidence avec toutefois une croissance de 2,5% par an en France.

2.2. Les facteurs de risque

L'influence de *l'exposition solaire* n'est plus à démontrer, et 90% des mélanomes sont liés à une exposition excessive au soleil. Les rayons U.V.A provoquent certes un vieillissement prématuré de la peau mais affectent également le système immunitaire permettant aux cellules anormales de se multiplier. Les rayons U.V.B quant à eux vont brûler la peau, c'est le « coup de soleil », endommageant ainsi le matériel génétique des cellules cutanées et provoquant des mutations pouvant aboutir au cancer. Mais le risque ne vient pas tant du fait d'expositions chroniques (travail en extérieur) que de l'exposition solaire aiguë d'une peau généralement couverte et qui n'est pas préparée à recevoir une forte dose de rayonnements U.V. pendant quelques semaines par an.

La tolérance au soleil dépend beaucoup des *phototypes de peau*. Ainsi les individus de phénotype I ou II, présentant une peau claire ne bronzant pas ou peu, seront plus sujets au développement d'un mélanome que les individus de phototype III ou IV, présentant une peau pouvant parfois rougir mais bronzant facilement car se trouvant naturellement mieux adaptée. Cependant, même les peaux les mieux adaptées ne doivent pas s'exposer abusivement au soleil car le risque de développer des cancers cutanés reste non négligeable.

Les *naevi*, ou plus communément appelés « grains de beauté », peuvent être à l'origine du développement d'un mélanome. Toutefois, seuls 15 à 30% des mélanomes semblent être issus de la transformation d'un naevus. Le risque peut augmenter selon la quantité de naevi (>50), et d'autant plus fortement s'ils sont atypiques ou congénitaux géants. Dans certains cas, les naevi sont de bons marqueurs de l'exposition solaire pendant l'enfance car leur nombre peut en dépendre comme il peut simplement tenir de l'hérédité.

Environ 10% des mélanomes sont en relation avec les *facteurs génétiques*. En effet, les phénotypes clairs, le nombre de naevi, et la présence de naevi atypiques sont en partie génétiquement transmis. La prédisposition familiale est définie comme au moins 2 mélanomes sur 3 générations.

A partir de ces données, il est possible de repérer de nombreux individus susceptibles de développer un mélanome, mais l'élaboration de marqueurs moléculaires génétiques plus performants reste d'actualité (ex : protéine S100 permet d'identifier un mélanome peu différencié). La prévention ne suffisant pas toujours à éviter l'apparition de nouveaux cas, il convient alors de diagnostiquer clairement les mélanomes.

2.3. Diagnostic et classification

Le diagnostic du mélanome est anatomo-clinique et seule l'interprétation anatomopathologique permet d'affirmer un diagnostic positif ou différentiel, la prise de décision thérapeutique et l'évaluation du pronostic.

2.3.1. Le diagnostic clinique

Il repose sur l'analyse morphologique de la tumeur cutanée ainsi que sur l'histoire rapportée par le patient et obéit aux règles de l'abécédaire. Les critères de malignité sont les suivants :

- A – asymétrie
- B – bords irréguliers
- C – couleur inhomogène
- D – diamètre supérieur à 6 mm
- E – évolution, extension

Les caractères morphologiques B et C peuvent être précisés par la dermatoscopie ou microscopie de surface. La suspicion d'un mélanome après examen clinique aboutit à l'exérèse de la tumeur présumée en vue d'un examen histopathologique.

2.3.2. Le diagnostic histologique

Il est admis que les mélanomes évoluent suivant la théorie biphasique qui postule que le mélanome connaît une première phase de croissance *horizontale* en nappe. On pourra observer une phase intra-épidermique au dessus de la membrane basale, puis une phase micro-invasive touchant le derme superficiel. La tumeur pénètre alors plus profondément dans le derme au cours d'une deuxième phase invasive dite *verticale*. Au cours de cette phase invasive, le risque métastatique devient très élevé alors qu'il reste très faible en phase micro-invasive et apparemment nul en phase intra-épidermique.

Bien qu'il existe une infinité de profils évolutifs du mélanome, l'examen histologique permet d'affirmer la nature mélanocytaire et la malignité de la tumeur.

2.3.3. La classification anatomo-clinique

Cette classification réduit les différents profils évolutifs des mélanomes à quatre grandes variétés (Schéma 7).

Le mélanome *nodulaire* représente 10 à 20% des cas et possède la triste particularité d'évoluer très rapidement en phase verticale.

Le mélanome *superficiel extensif* représente la majorité des mélanomes détectés avec 60 à 70% des cas. Ce type de mélanome évolue également vers la phase verticale.

Le mélanome *acral lentigineux* représente 2 à 10% des cas et se trouve localisé au niveau des extrémités : doigts, orteils, paumes, plantes.

Le *lentigo malin de Dubreuilh* représente 5 à 10% des cas. Ce mélanome touche généralement des sujets âgés au niveau de zones cutanées atrophiques dégradées par des expositions solaires régulières pendant des décennies.

Ces variétés de mélanomes se différencient donc par leur aspect et la durée de leur phase horizontale. Plus cette phase horizontale est longue et plus on dispose de temps pour le diagnostic avant l'invasion verticale. Cependant, à invasion tumorale identique, toutes ces formes ont le même pronostic.

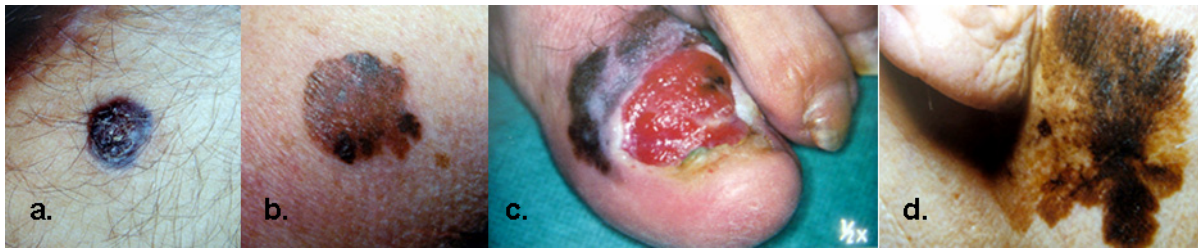


Schéma 7 : Illustration des quatre grandes variétés de mélanomes. **a.** mélanome nodulaire, **b.** mélanome superficiel extensif, **c.** mélanome acral lentigineux ulcéré unguéal et péri unguéal du gros orteil, **d.** lentigo malin de Dubreuilh (d'après *Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles*, 3^{ème} édition, édition Masson)

2.3.4. Critères du pronostic

Au stade de la *tumeur primaire*, il existe 2 systèmes de mesure se basant sur l'histologie de la tumeur : l'indice de Breslow et le niveau d'invasion selon Clark et Mihm (Schéma 8).

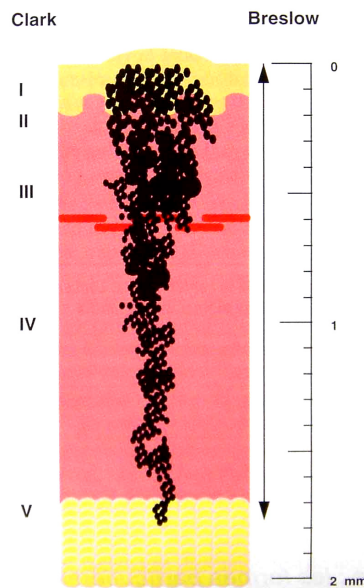


Schéma 8 : Illustration des marqueurs pronostiques selon Breslow et Clark et Mihm (d'après *Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles*, 3^{ème} édition, édition Masson)

L'épaisseur tumorale selon Breslow représente la mesure à l'oculaire micrométrique sur coupe histologique standard de l'épaisseur maximum comprise

entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la base de la tumeur. Il existe une corrélation entre indice de Breslow et survie (tableau 1).

Mélanome primitif, après exérèse	Risque de récurrence	Risque d'être décédé après 5 ans	Risque d'être décédé après 10 ans
Intra-épithélial	0 %	/	/
Breslow : 0,20-0,75 mm	< 10 %	< 5 %	< 5 %
Breslow : 0,75-1,5 mm	20 %	10 %	15 %
Breslow : 1,5-4 mm	40 %	30 %	40 %
Breslow : > 4 mm	70 %	40 %	50 %

Tableau 1 : Corrélation entre l'indice de Breslow et les risques de récurrence et décès après 5 et 10 ans (d'après *Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles*, 3^{ème} édition, édition Masson)

Le niveau d'invasion selon Clark et Mihm est basé sur le concept de franchissement de « barrières anatomiques » (tableau 2).

Niveau I	mélanome intra-épidermique sans risque métastatique
Niveau II	invasion d'une partie du derme papillaire
Niveau III	invasion de tout le derme papillaire ne dépassant pas l'interface avec le derme réticulaire
Niveau IV	invasion du derme réticulaire
Niveau V	invasion de l'hypoderme

Tableau 2 : Niveau d'invasion selon Clark et Mihm

Le stade d'atteinte régionale ganglionnaire : dès la phase invasive, il y a possibilité de *métastase ganglionnaire* régionale, d'abord infraclinique, ce qui peut durer des mois et des années ; puis cliniquement parlante avec adénomégalie tumorale. Parfois des *métastases in situ* apparaissent sur le site tumoral initial, ou

des *métastases en transit* entre la tumeur et le premier site ganglionnaire. Les *métastases viscérales* surviennent le plus souvent après les tumeurs ganglionnaires régionales et peuvent toucher n'importe quel organe. A ce stade, le délai de récurrence est très court (<1 an). Les marqueurs histologiques tels que le nombre de ganglions atteints et les ruptures capsulaires sont des marqueurs péjoratifs.

Enfin, il existe un pronostic au stade d'*atteinte métastatique à distance*. Les patients avec atteinte initiale cutanée ou ganglionnaire sans atteinte viscérale, ou avec un site métastatique viscéral unique y compris cérébral ont en règle générale une survie plus prolongée, tandis que ceux qui développent rapidement de multiples métastases viscérales ont une survie très courte quel que soit le traitement.

Cependant, d'autres facteurs très importants peuvent également être pris en compte dont l'ulcération de la tumeur, le taux de cellules en mitose, la présence de régression, mais également le sexe et l'âge du patient ainsi que la localisation de la tumeur.

2.3.5. Classification internationale

Un système de classification des mélanomes s'est imposé à l'échelle internationale (tableau 3). Validée par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) en 2002 [American Joint Committee on Cancer staging manual, 6th edition. New York : Springer-Verlag, 2002], cette classification se base sur l'examen de 17 600 patients recensés dans 13 centres de traitement du mélanome à travers le monde [Balch et coll., 2001].

Les différents stades décrits dans cette classification font appel à une succession d'étapes séquentielles regroupée dans la notion de *progression tumorale* depuis la transformation du mélanocyte normal jusqu'au développement de métastases distantes.

0	Mélanome <i>in situ</i>
IA	Tumeur ≤ 1,0 mm sans ulcération avec un niveau de Clark II ou III
IB	Tumeur < 1,0 mm avec ulcération ou niveau de Clark IV ou V, ou tumeur de 1,01 – 2,0 mm sans ulcération
IIA	Tumeur de 1,01 – 2,0 mm avec ulcération, ou tumeur de 2,01 – 4,0 mm sans ulcération
IIB	Tumeur de 2,01 – 4,0 mm avec ulcération, ou tumeur ≥ 4,0 mm sans ulcération
IIC	Tumeur > 4,0 mm avec ulcération
IIIA	Toute tumeur sans ulcération avec 1– 3 ganglions microscopiques
IIIB	Toute tumeur avec ulcération avec 1– 3 ganglions microscopiques, ou toute tumeur sans ulcération avec 1– 3 ganglions macroscopiques, ou toute tumeur avec ou sans ulcération mais avec métastase(s) satellite(s) ou en transit, sans métastase ganglionnaire
IIIC	Toute tumeur avec ulcération et 1 – 3 ganglions macroscopiques ou métastase(s) satellite(s) ou en transit, ou toute tumeur avec ≥ 4 ganglions métastatiques ou métastases satellites ou en transit avec ganglions métastatiques
IV	Toute tumeur, tous nombres de ganglions, et toutes métastases distantes, ganglionnaires ou viscérales

Tableau 3 : *Système de classification de l’American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2002 (d’après Thompson et coll., Lancet 2005)*

2.4. Physiopathologie

2.4.1. Transformation et régulation du mélanome

La première étape de la progression tumorale consiste à la transformation d’une cellule saine en cellule néoplasique. La cellule cancéreuse est caractérisée par une croissance cellulaire anormale, non coordonnée avec les autres cellules du tissu, et qui persiste dans une prolifération excessive en dépit de l’arrêt du signal ayant initié cette transformation [Willis, 1952].

2.4.1.1. Transformation du mélanocyte

Dans les organismes pluricellulaires, les cellules respectent l'homéostasie cellulaire ; c'est dire une balance coordonnant quatre programmes cellulaires : la division, la différenciation, la sénescence et l'apoptose. La transformation d'un mélanocyte normal en cellule de mélanome se traduit par un dérèglement de l'homéostasie cellulaire visant à activer la prolifération cellulaire et à inactiver les programmes apoptotiques de manière exacerbée. La principale cause de cette transformation du mélanocyte normal est allouée aux radiations U.V. provenant de la lumière solaire. Ces radiations peuvent entraîner de multiples altérations génétiques et épigénétiques aboutissant à l'activation d'oncogènes [Polsky et Cordon-Cardo, 2003].

2.4.1.2. Les oncogènes du mélanome

Les mutations permettant l'activation des oncogènes sont soit ponctuelles et se traduisent par une modification de la fonction de la protéine, soit sont la conséquence d'une translocation d'un promoteur actif à proximité d'un oncogène [Hodgson et Maher, 1997]. Dans le cadre du mélanome, la majeure partie des oncogènes est en relation avec la voie de prolifération RAS/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) tels que N-RAS, B-RAF, Cycline-D1 et CDK4 [Polsky et Cordon-Cardo, 2003]. D'autres mutations d'oncogènes ont également été mises en évidence dans de nombreux cas de mélanomes comme le suppresseur de tumeur p53, la voie de survie AKT et son régulateur négatif PTEN [Rodolfo et coll., 2004], mais aussi la voie β -caténine, c-MYC, APC et WNT dont la responsabilité dans le fait qu'une tumeur devienne invasive a été montré [Nelson et Nusse, 2004].

Cependant l'apparition d'oncogènes codant pour des protéines intracellulaires n'est pas l'unique raison de la dérégulation cellulaire. L'homéostasie cellulaire est également assurée par l'échange de facteurs solubles incluant les hormones, les facteurs de croissance et les cytokines, présents dans l'espace péri-cellulaire du mélanome et capables d'induire les différentes cascades protéiques citées précédemment.

2.4.1.3. Les facteurs solubles régulant le mélanome

En se fixant à leurs récepteurs membranaires, de très nombreux facteurs solubles sont capables d'influencer la prolifération et la progression du mélanome. Ces facteurs peuvent être sécrétés par les cellules du mélanome elles-mêmes (effet autocrine) ou par les cellules stromales ou inflammatoires avoisinantes du mélanome (effet paracrine) (Schéma 9) [Lazar-Molnar et coll., 2000]. Les facteurs solubles à caractère autocrine ont pour but principal de stimuler la prolifération ; *Melanoma Growth Stimulatory Activity* (MGSA)/*Growth-Regulated Oncogene* (GRO), IL-8 et *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) en sont les principaux acteurs. Les facteurs à caractère paracrine permettent la modulation du microenvironnement du mélanome pour faciliter son invasion. On notera ainsi l'importance de facteurs pro-angiogéniques comme le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), ou encore le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), le TGF β et surtout l'IL-1 dont les effets activateurs sur les cellules stromales et immunocompétentes vont permettre le remaniement de la MEC favorisant la croissance tumorale et l'invasion [Labrousse et coll., 2004].

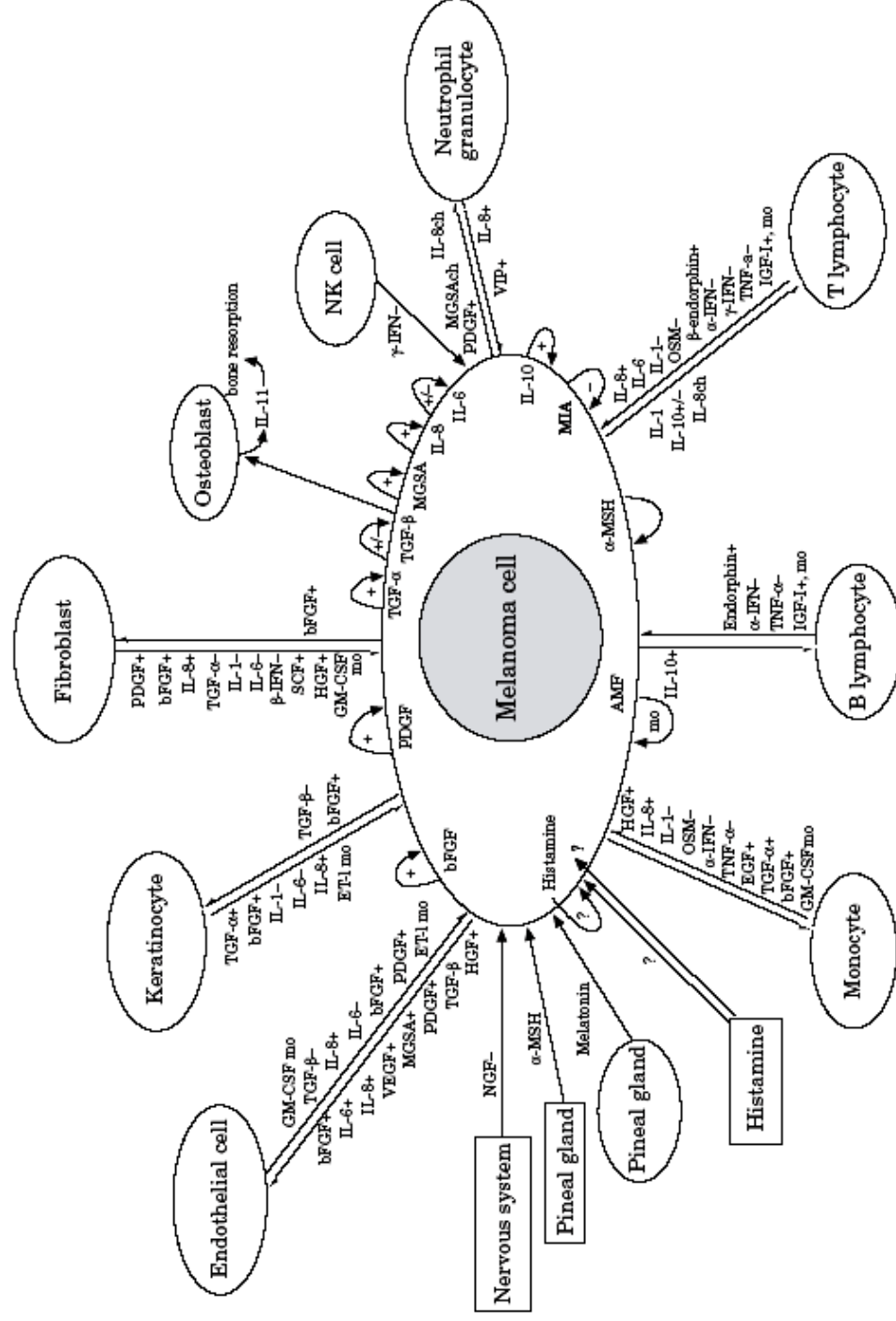


Schéma 9 : Régulation de la croissance du mélanome par les facteurs de croissance et les cytokines autocrines et paracrines (d'après Lazar-Molnar et coll., Cytokine 2000). + = activateur, - : inhibiteur, ch : chimioattractant, mo : facteur de motilité

2.4.1.4. Régulation du mélanome par contacts cellulaires

Dans un contexte tissulaire, les cellules composant le tissu sain sont en contact physique constant ; c'est-à-dire qu'elles sont liées entre elles et à la MEC par des jonctions solides à la surface des cellules. Ces jonctions, selon leur type, sont capables d'activer de multiples voies de signalisation intracellulaires influençant le comportement des cellules.

Le mélanocyte normal est en contact d'une part avec les constituants de la membrane basale et d'autre part avec les kératinocytes qui l'entourent (Schéma 10). Le mélanocyte interagit avec les kératinocytes par des connexines, la desmoglérine 1 et la cadhérine-E. Ces différents points de contact permettent aux kératinocytes de maintenir la croissance et le contrôle phénotypique des mélanocytes. Lors de la transformation en mélanome, les jonctions de cadhérine-E se voient remplacer par de la cadhérine-N bloquant alors le contrôle par les kératinocytes et offrant de nouvelles propriétés d'adhésion mises en jeu dans le processus invasif. En progressant dans le derme, les cellules de mélanome vont ainsi pouvoir se lier à de nouveaux types cellulaires tels que les fibroblastes ou encore les cellules endothéliales. De plus, l'adhésion par la cadhérine-N transduit un signal anti-apoptotique par la voie AKT faisant de ces molécules d'adhésion des activateurs de la prolifération. Le mélanome est une tumeur solide impliquant que les cellules de mélanome sont liées entre elles par le biais de molécules d'adhésion spécifiques, Mel-CAM, dont l'implication dans la progression du mélanome a été établie [Li et coll., 2003] [Perlis et Herlyn, 2004].

D'autres molécules d'adhésion telles que L1-CAM et ALCAM corréleront avec un phénotype métastatique du mélanome. Lorsque la cellule de mélanome passe dans la circulation sanguine, elle exprime alors de grandes quantités d'ICAM-1 qui permet l'agrégation avec les leucocytes ce qui améliore sa survie dans le réseau vasculaire et favorise l'extravasation [Haass et coll., 2005].

Au cours du processus métastatique, les cellules de mélanome se trouvent en contact avec divers types cellulaires mais aussi avec de multiples éléments matriciels capables eux aussi de réguler la progression tumorale.

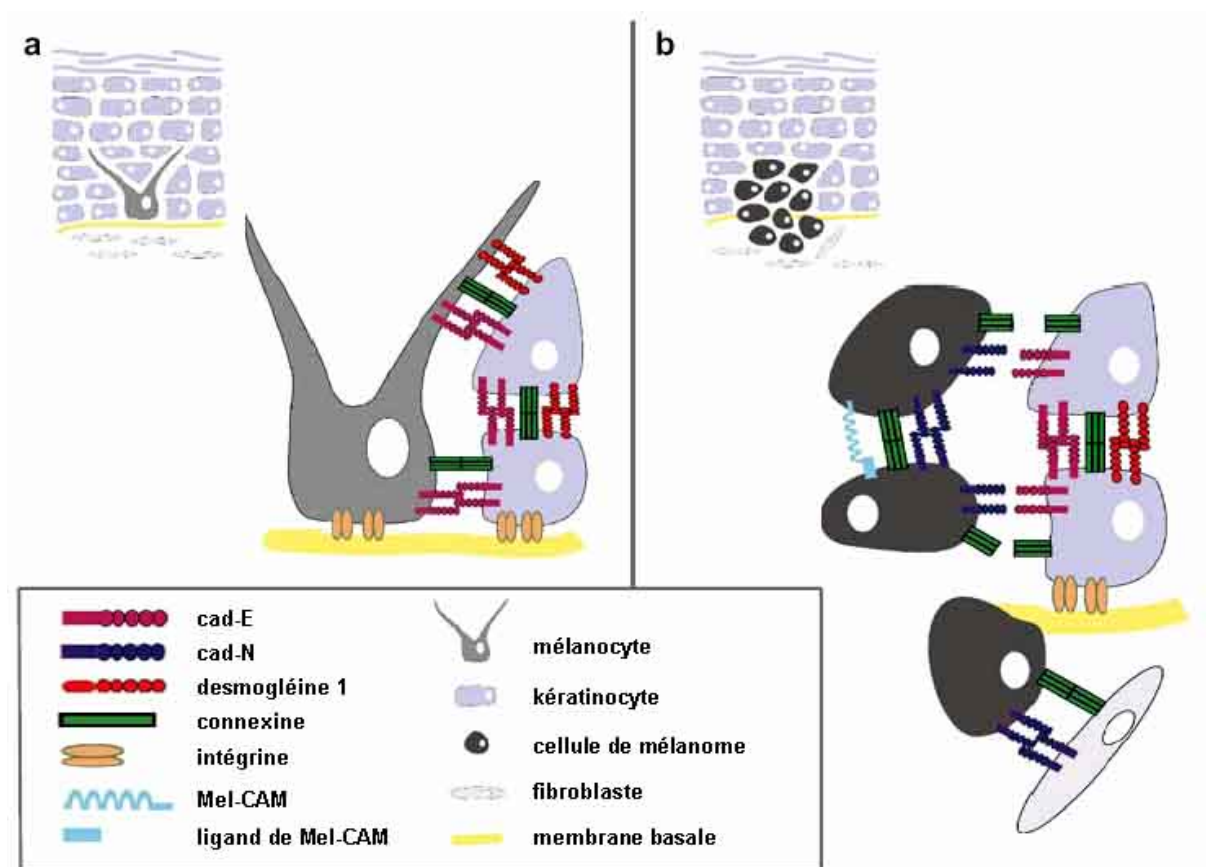


Schéma 10 : Molécules d'adhésion exprimées par le mélanocyte normal (a) et par la cellule de mélanome (b) (d'après Li et coll., *Oncogene* 2003)

2.4.1.5. Régulation du mélanome par la MEC

La phase de croissance verticale du mélanome implique le franchissement et donc la dégradation de la JDE. Les composants des membranes basales comme les macromolécules de la MEC comportent des séquences peptidiques capables d'influencer le comportement des cellules de mélanome. Le tableau 4 regroupe les éléments et matrikines issus des membranes basales pouvant modifier le comportement des cellules de mélanome en se liant directement à leur surface [Pasco et coll., 2004].

Macromolécule	Isoforme (<i>matrikine</i>)	Effet biologique général sur la progression du mélanome
Laminines	Laminine-1	Augmente l'adhésion et les métastases pulmonaires
	Laminine-2	Augmente l'adhésion et la sécrétion de MMP-2
	Laminine-5	Favorise la migration
Protéoglycannes	Décorine	Inhibe la progression
	Perlécane	Favorise la croissance et l'invasion
Collagènes	Type XV (<i>restine</i>)	Inhibe la croissance
	Type IV ($\alpha 1(IV)$ 1263-1277)	Favorise l'adhésion
	Type IV ($\alpha 1(IV)$ CB3)	Favorise l'adhésion
	Type IV ($\alpha 1(IV)$ 531-543)	Favorise l'adhésion
	Type IV ($\alpha 2(IV)$ <i>canstatine</i>)	Inhibe la croissance
	Type IV ($\alpha 6(IV)$)	Inhibe la croissance
	Type IV ($\alpha 3(IV)$ <i>tumstatine</i>)	Inhibe l'expression et l'activation des MMP-2 et -14 Inhibe la croissance

Tableau 4 : *Macromolécules et matrikines issues des membranes basales participant à la régulation de la cellule de mélanome*

Peu de données de la littérature existent quant à l'implication d'autres macromolécules matricielles dans la régulation du mélanome. L'élastine, présente dans le derme, a cependant été montrée, suite à sa dégradation, comme capable d'augmenter la sécrétion de *Matrix Metalloproteinase* (MMP)-2 et -14 favorisant ainsi le processus de progression du mélanome [Ntayi et coll., 2004].

2.4.2. Altération de l'immunosurveillance du mélanome

La réponse immunitaire autologue contre le cancer a naturellement lieu chez les patients atteints de cancer et particulièrement dans le cadre du mélanome. De nombreux auteurs ont identifié la présence de cellules T dirigées contre des antigènes tumoraux de mélanome (MelanA/MART1, tyrosinase et gp100) dans la circulation sanguine périphérique et au sein même de la tumeur (TIL : *tumor infiltrating lymphocyte*) [Monsurro et coll., 2003] [Nagorsen et coll., 2003]. Il a été clairement démontré que les cellules T spécifiques à la tumeur doivent migrer jusqu'au site tumoral pour que la régression clinique soit effective. Cependant, une étude récente a démontré que les TILs retrouvés à l'intérieur de la tumeur sont très souvent inactifs, dépourvus d'activité cytolytique, et seule la présence de lymphocytes péri-tumoraux corrèle avec une amélioration de la survie des patients [Ladanyi et coll., 2004]. L'immunité anti-tumorale dépend également de la polarisation des cellules T et seul un profil Th1 pro-inflammatoire de ces cellules permet une régression spontanée des tumeurs primaires de mélanome [Lowes et coll., 1997].

Dans de très nombreux cas, les cellules T sont déficientes ou trop peu nombreuses pour exercer une immunité efficace contre le mélanome. Ceci est en partie expliqué par une action des U.V.B, qui induisent la transformation des mélanocytes, et exercent également une action immunodépressive [Dandie et coll., 2001]. Cette immunodépression se traduit d'une part, par une altération de la migration des cellules de Langerhans ne leur permettant plus d'aller activer les cellules T ; et d'autre part, par une diminution de la production d'IL-1 β , limitant alors la cascade permettant d'attirer les cellules T du sang périphérique jusqu'au site tumoral.

Pour se rendre sur ce site tumoral, les lymphocytes doivent traverser le tissu conjonctif constitué d'éléments de la MEC qui peuvent alors influencer l'activation de ces cellules et donc leur profil de sécrétion de cytokines [Tschoetschel et coll., 1997]. Lors de l'invasion du derme par les cellules de mélanome, la MEC est dégradée. Cette lyse matricielle libère les nombreux facteurs solubles qui y étaient contenus, mais aussi de nombreux peptides matriciels (matrikines) pourvus d'activités biologiques. En périphérie de la tumeur de mélanome, une forte dégradation de l'élastine a pu être mise en évidence [Ntayi et coll., 2004]. Mais aucune donnée de la

littérature n'indique si ce type de remaniement matriciel peut influencer les fonctions de l'immunosurveillance du mélanome.

3. Le lymphocyte T

3.1. Genèse des cellules T

Le développement des cellules immunitaires, et plus particulièrement des cellules T, implique des mécanismes complexes qui pourraient à eux seuls constituer une thèse bibliographique. C'est pourquoi nous n'aborderons ici qu'une vue générale du développement lymphocytaire nécessaire à la compréhension des interactions cellules T/cellules tumorales. (Pour plus de précisions : [Akashi et coll., 2000] [Busslinger et coll., 2000] [Deftos et Bevan, 2000] [Di Santo et coll., 2000] [Kuo et Leiden, 1999] [Janeway, 1999]).

3.1.1. La cellule précurseur

Pour se développer, les précurseurs des cellules T doivent migrer de la moelle osseuse jusqu'au thymus fonctionnel. Cette observation est avérée depuis la caractérisation des souris *nude* dont le développement du thymus a échoué et cela résulte en une absence totale de cellule T. Les précurseurs isolés de la moelle de ces souris peuvent engendrer des cellules T normales lorsqu'ils sont injectés à des souris possédant un thymus normalement développé [Janeway, 1999]. Il apparaît alors que le microenvironnement joue un rôle primordial dans les signaux conduisant au développement intrathymique des cellules T [Savino et coll., 2002].

La nature du précurseur dérivé de la moelle osseuse ainsi que les signaux conduisant à la différenciation des cellules T ont fait l'objet de nombreuses études. Un précurseur lymphoïde commun a été décrit d'abord comme une cellule capable de se différencier en lignées de cellules T et B [Wu et coll., 1991], puis également en cellule dendritique [Shortman et coll., 1998] et NK [Poggi et Mingari, 1995]. Cette cellule précurseur ne semble pas posséder l'aptitude de se renouveler [Akashi et coll., 2000].

3.1.2. La différenciation des cellules T

La différenciation du précurseur lymphoïde commun en lignées lymphoïdes est dépendante de l'action de facteurs de transcription (Pax-5 ou GATA-3) [Nutt et

coll., 1999], de ligands et récepteurs transmembranaires (Notch et ses ligands) [Pui et coll., 1999] [Radtke et coll., 1999] et de cytokines (IL-7 et IL-15) [Di Santo et coll., 2000]. Cette interaction entre le précurseur et son microenvironnement engendre des changements qui peuvent être corrélés avec l'expression du *T cells receptor* (TCR) et du marqueur de surface CD3 [Janeway, 1999]. Il est possible de caractériser le stade de développement par l'expression de marqueurs membranaires. Les récepteurs CD4 et CD8 corréleront au niveau de développement des cellules T : depuis la forme immature double négatif (DN) ($CD4^-CD8^-$), à la forme mature simple positif (SP) ($CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$), en passant par une étape immature double positif (DP) ($CD4^+CD8^+$) [Akashi et coll., 2000] (Schéma 11).

Au stade de thymocyte DN immature, la différenciation des cellules T connaît une subdivision à partir d'autres marqueurs de la surface cellulaire. Ces marqueurs sont la molécule d'adhésion CD44 et la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25). La séquence de maturation est la suivante :

$CD44^+CD25^- \rightarrow CD44^+CD25^+ \rightarrow CD44^-CD25^+ \rightarrow CD44^-CD25^-$. Ces étapes de maturation sont également connues sous la dénomination DN1, DN2, DN3 et DN4 respectivement [Godfrey et Zlotnik, 1993].

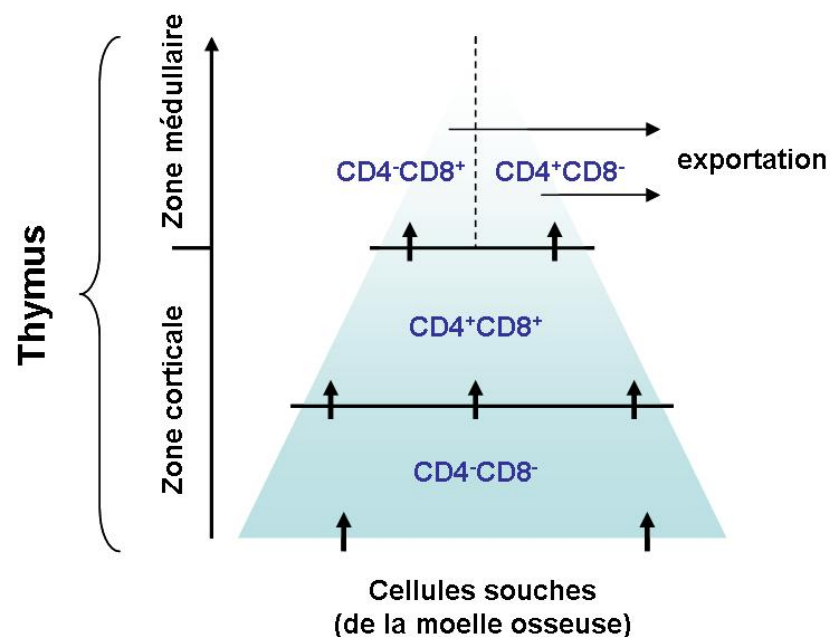


Schéma 11 : Schéma de différenciation des cellules T dans le thymus

3.1.3. Exportation vers les pools périphériques.

Le système immun périphérique est constitué de plusieurs tissus lymphoïdes secondaires. C'est au sein de ces tissus secondaires que le nombre de cellules T est maintenu constant par les mécanismes de contrôles homéostatiques. C'est également dans les organes secondaires que réside un certain nombre de CPA faisant de ces tissus une structure propice aux interactions conduisant à l'immunité. La majeure partie des cellules T se situe dans la rate et les ganglions lymphatiques. Ces organes opèrent de la même façon, c'est-à-dire la capture d'antigènes à partir des sites d'infection et leur présentation aux lymphocytes pour induire la réponse immunitaire [Janeway, 1999].

Les lymphocytes ne sont pas sédentaires et peuvent circuler d'un organe secondaire à l'autre. Ce mouvement lymphocytaire est primordial car il permet de dispatcher le répertoire immunitaire dans l'individu. De plus, les lymphocytes vont de ce fait pouvoir entrer en contact de microenvironnements particuliers capables d'induire la survie et la différenciation de ces cellules T ; un phénomène nommé « ecotaxisme » [de Sousa, 1971].

Les lymphocytes circulant peuvent également être sub-divisés en des populations distinctes :

☞ La cellule T *naïve* est une cellule provenant directement du thymus (SP CD4⁺ ou CD8⁺). Par définition le lymphocyte T naïf n'a jamais rencontré d'antigène. Ce pool cellulaire circulant permet d'apporter une réponse à un nouvel antigène [Sprent et Surh, 2002]. La fonction de cette cellule dépend de son activation, qui dépend elle-même de l'antigène rencontré à la surface des CPA. Les signaux induits par le complexe peptide/CMH et les cytokines conduisent la cellule naïve à l'activation et donc à la prolifération et à la différenciation des cellules T selon la voie cytotoxique ou « auxiliaire » (cellules T CD8⁺ ou CD4⁺ respectivement).

☞ Les cellules T *effectrices* ont perdu leur statut naïf suite à l'activation médiée par le TCR. Le compartiment effecteur différencie les cellules T CD8⁺ cytotoxiques tueuses et les cellules T CD4⁺ « auxiliaire ». La fonction des

cellules T effectrices, et particulièrement pour les cellules T CD4⁺, est reflétée par leur capacité à sécréter certaines cytokines. Ainsi, il a pu être défini qu'un profil de sécrétion cytokinique donné pouvait être associé à une fonction spécifique nommée soit cellulaire, soit humorale (Th1 et Th2 respectivement) [Glimcher et Murphy, 2000].

3.2. Les polarisations Th1 et Th2

La classification des cellules T CD4⁺ en sous-groupes Th1 et Th2 a originellement été définie chez la souris par Mosmann et Coffman [Mosmann et coll., 1986]. Ces sous-groupes ont été caractérisés selon le profil cytokinique des clones observés. La différenciation (ou polarisation) des cellules T CD4⁺ réside dans la présence de cytokines qui conduisent la différenciation d'un clone CD4⁺ Th0 vers un profil (Th1 ou Th2) et inhibent la différenciation vers l'autre profil (Schéma 12) [Glimcher et Murphy, 2000].

3.2.1. La polarisation Th1

Le profil Th1 correspond à une sécrétion massive d'IL-2 et d'IFN γ , (dans une moindre mesure TNF α et *lymphotoxin* (LT)). Ces cytokines sont impliquées dans le recrutement des macrophages et donc activent la réponse immunitaire cellulaire conduisant à la phagocytose des pathogènes.

L'orientation d'un clone CD4⁺ Th0 vers le profil Th1 semble dépendre de la présence d'une cytokine particulière : l'IL-12. En effet, les cellules T CD4⁺ sont absentes de souris déficientes en IL-12 [Kaplan et coll., 1996]. Des études de signalisation ont montré que l'IL-12 induit la différenciation par l'activation de la voie *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-4 capable de recruter le facteur de transcription T-bet [Murphy et coll., 2000]. Ce facteur de transcription est exprimé par les cellules NK et CD4⁺ Th1, deux types cellulaires capables de produire l'IFN γ . T-bet est également capable de réprimer l'expression de l'IL-4 et de l'IL-5, les cytokines caractéristiques du profil Th2, confortant l'idée que T-bet est un élément primordial de la polarisation Th1 [Szabo et coll., 2000].

3.2.2. La polarisation Th2

Le profil Th2 correspond à une sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-10. Ces cytokines permettent l'activation des cellules B impliquées dans la réponse humorale dirigée contre les allergènes.

L'orientation d'un clone $CD4^+$ Th0 vers le profil Th2 semble être sous le contrôle de l'IL-4. La voie Th2, comme Th1, possède un facteur de transcription caractéristique, GATA-3, sous contrôle de la voie STAT-6 [Murphy et coll., 2000]. L'utilisation d'antisenses de GATA-3 (invalidant ce facteur) inhibe l'expression de tous les gènes caractéristiques du profil sécrétoire Th2. De plus, la surexpression de GATA-3 dans des clones Th1 réoriente ces clones vers un profil sécrétoire Th2 [Zheng et Flavell, 1997].

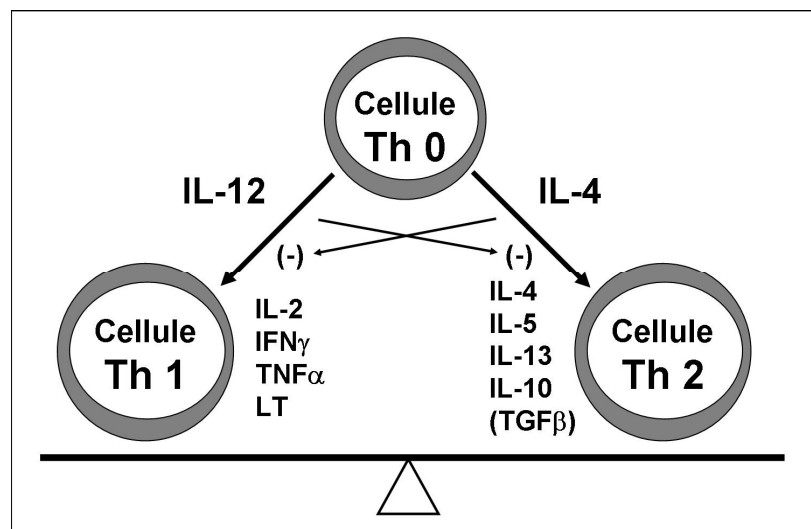


Schéma 12 : Schématisation de la balance Th1 / Th2 (d'après Amit Bar-Or, conférence du 27 octobre 2004 à Montréal)

4. L'interleukine-1 β

Lors de l'initiation du processus immunitaire anti-tumoral, nous avons vu que l'IL-1, et plus particulièrement l'IL-1 β , est impliquée dans le recrutement des lymphocytes mais aussi dans les mécanismes favorisant l'invasion du mélanome.

4.1. Généralités

4.1.1. Les cytokines

Les cytokines sont de petites protéines dont la masse moléculaire apparente varie de 8 à 40 kDa. Préalablement nommées « lymphokines » ou « monokines » pour indiquer leur provenance (lymphocytes et monocytes), le terme « cytokines » paraît à présent plus approprié dans la mesure où presque la totalité des cellules nucléées sont capables de synthétiser ces protéines et d'y répondre par une activité biologique. Il n'existe pas de similitude de séquence primaire ou de structure tridimensionnelle entre toutes les cytokines et seules leurs activités biologiques permettent de les classer en différents groupes. Les cytokines sont en majeure partie impliquées dans la réponse hôte aux infections, la réponse immunitaire et l'inflammation. Elles sont principalement classées en fonction de leur comportement vis-à-vis des processus inflammatoires. Ainsi, les cytokines capables de promouvoir l'inflammation sont dites *pro-inflammatoires* (IL-1, TNF) en opposition aux cytokines limitant ce phénomène (IL-4,-10) dites *anti-inflammatoires* [Dinarello, 2000].

4.1.2. La famille de l'IL-1

L'organisation intron-exon des gènes de l'IL-1 suggère des duplications d'un gène commun il y a 350 millions d'années. Il se pourrait qu'un gène encore plus ancien soit également commun avec celui du FGF en raison des homologies de séquences en acides aminés et du repliement tertiaire tout en feuillets beta. Jusqu'à présent, dix membres de la superfamille de l'IL-1 ont été décrits et une nouvelle nomenclature a dû être définie avec l'expression « IL-1F » pour concrétiser leur appartenance à une famille (tableau 5). Parmi eux, quatre ont été particulièrement étudiés, les six autres membres ont été décrits dans certains tissus humains mais leurs rôles physiologiques sont encore inconnus. Les quatre membres principaux sont : IL-1 α , IL-1 β , l'IL-18 et l'IL-1 antagoniste du récepteur (IL-1Ra) [Dinarello, 2002].

Nouveau Nom	Ancien(s) Nom(s)	Propriété
IL-1F1	IL-1 α	Agoniste
IL-1F2	IL-1 β	Agoniste
IL-1F3	IL-1Ra	Antagoniste
IL-1F4	IL-18 ; IFN γ inducing factor	Agoniste
IL-1F5	IL-1Hy1 ; FIL1 δ ; IL-1H ζ ; IL-1RP ζ ; IL-1L1 ; IL-1 δ	Inconnu
IL-1F6	FIL-1 ; IL-1 ϵ	Inconnu
IL-1F7	FIL-1 ζ ; IL-1H4 ; IL-1RP1	Inconnu
IL-1F8	FIL-1h ; IL-1H2	Inconnu
IL-1F9	IL-1H1 ; IL-1RP2	Inconnu
IL-1F10	IL-1Hy2 ; FKSG75	Inconnu

Tableau 5 : Nouvelle nomenclature des dix membres de la superfamille de l'IL-1 (d'après Dinarello, Clin Exp Rheumatol 2002)

4.2. Expression du gène de l'IL-1 β

L'IL-1 β est une cytokine très inflammatoire et son utilisation médicale est extrêmement délicate tant la limite entre le bénéfice clinique et sa toxicité chez l'Homme est étroite. En revanche, les agents capables de limiter la production et/ou l'activation de l'IL-1 β sont prometteurs pour les traitements cliniques.

4.2.1. Contrôle de l'expression

Dans les monocytes humains, le niveau d'ARNm de l'IL-1 β augmente très rapidement, dans les 15 minutes suivant la stimulation, et commence à décroître après 4 heures en fonction de l'agoniste. Cette décroissance est due à la synthèse d'un répresseur transcriptionnel ou à la diminution de la demi-vie des ARNm [Fenton et coll., 1988] [Jarrous et Kaempfer, 1994]. Cependant, la stimulation par l'IL-1 β lui-même ou par des agents stimulant la voie Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPC) peuvent prolonger l'augmentation du taux d'ARNm jusqu'à 24 heures [Schindler et coll., 1990] [Serkkola et Hurme, 1993].

Les régions régulatrices du promoteur de l'IL-1 β sont dispersées sur plusieurs milliers de paires de bases (pb) en amont du site de départ de la transcription (Schéma 13).

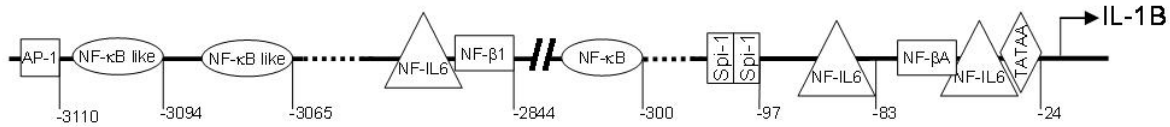


Schéma 13 : Schématisation des éléments régulateurs du promoteur du gène de l'IL-1 β .

Ce promoteur peut-être découpé en quatre zones :

- ☞ La partie proximale du promoteur s'étend de +14 à -131 pb autour du site de départ et comprend une véritable boîte TATAA en position -24. Cette région est requise pour obtenir une expression maximale du gène de l'IL-1 β . Cette partie proximale montre un site de fixation pour le facteur de transcription NF- β A, très abondant dans les monocytes, et indispensable à la transactivation par les cytomégalovirus [Hunninghake et coll., 1992]. Le facteur de transcription NF-IL6 a été décrit en deux endroits dans cette portion du promoteur, mais le site en position -33 pb est controversé en raison du chevauchement avec NF- β A. Néanmoins NF-IL6 est impliqué dans l'induction du gène [Zhang et Rom, 1993]. Enfin, les séquences de fixation du facteur de transcription Spi-1 sont requises pour l'expression tissu spécifique de l'IL-1 β dans la mesure où ce facteur n'est pas présent dans tous les types cellulaires [Kominato et coll., 1995].
- ☞ Des travaux sur les lignées myéloïdes U937 et PLB-985 ont permis de mettre en évidence un site *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) en position -288 à -297 pb du promoteur du gène de l'IL-1 β [Hiscott et coll., 1993]. Cet élément de régulation semble intervenir lors de l'autorégulation positive de l'IL-1 β .
- ☞ Plusieurs études ont rapporté que la fixation de divers facteurs de transcription dans une région très distale du promoteur de l'IL-1 β , était impliquée dans la stimulation de ce gène par le LPS par un mécanisme de transactivation. Un premier site en position -2855 à -2844 pb est capable de lier NF- β 1 [Shirakawa et coll., 1993]. Un autre site en position -2884 à -2871 pb fixe quant à lui le facteur de transcription NF-IL6 [Tsukada et coll., 1994].

☞ La région la plus distale est reconnue comme un élément « enhancer » du promoteur. Cet élément comprend deux sites NF- κ B-like (*i.e.* des séquences proches du motif consensus de NF- κ B et capable de fixer les mêmes protéines), et un site AP-1. Cependant, seul le site NF- κ B-like en position -3094 semble réellement impliqué dans la sur-expression du gène de l'IL-1 β [Goto et coll., 1999].

4.2.2. Les inducteurs de l'IL-1 β

Tous les microbes, ou presque, ainsi que les produits microbiens sont capables d'induire la production d'IL-1 β . Mais de nombreux produits non-microbiens sont également capables d'induire la transcription, voire la synthèse de cette cytokine. Dans la mesure où cette thèse est dédiée à la régulation des cytokines par les produits de dégradation de l'élastine, seuls les produits matriciels sont énumérés ici. Les données de la littérature concernent toutes l'utilisation de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Ainsi, il a pu être montré que la fibronectine [Graves et Roman, 1996], le collagène de type I [Pacifi et coll., 1991], la fibrine [Perez et Roman, 1995], le fibrinogène [Perez et coll., 1999] et la laminine [Roman et coll., 1999] sont capables d'induire la sur-expression de l'IL-1 β .

L'induction de la transcription du gène de l'IL-1 β peut engendrer de grandes quantités d'ARNm sans pour autant augmenter significativement la synthèse de la protéine. Les mécanismes de transcription et de traduction de la protéine d'IL-1 β sont particulièrement dissociés comme pour le TNF α [Schindler et coll., 1990].

4.3. Synthèse et sécrétion de la protéine d'IL-1 β

4.3.1. Signal additionnel de traduction

La nécessité de signaux différentiels induisant la transcription et la traduction de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF α et l'IL-1 β , est apparue suite à l'utilisation de composés pyridinyl-imidazole. Ces substances sont capables de bloquer la synthèse de ces cytokines sans affecter l'augmentation de leur taux d'ARNm induit par le LPS. Aujourd'hui ces drogues anti-inflammatoires sont nommées « cytokine suppressing anti-inflammatory drugs » (CSAIDs) [McDonnell et

coll., 1995]. Le principe actif de ces drogues consiste à lier et bloquer l'activation de la MAPK p38 [Lee et coll., 1994]. En résumé, quelque soit la voie utilisée par l'inducteur pour la transcription du gène de l'IL-1 β , la traduction ne sera effective que si la voie p38 est également activée.

4.3.2. Clivage de la protéine d'IL-1 β

La protéine d'IL-1 β est d'abord synthétisée en un précurseur de 31 kDa correspondant à la pro-IL-1 β . Cette pro-forme ne possède pas de peptide signal et ne transite donc pas par la voie classique de sécrétion (*i.e.* réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) mais reste stockée dans le cytoplasme où elle a été traduite. La production d'IL-1 β active nécessite une modification post-traductionnelle qui consiste à convertir la pro-IL-1 β en sa forme mature de 17 kDa [Burns et coll., 2003]. Cette étape requiert l'action de l'*IL-1 β converting enzyme* (ICE ; également nommée caspase-1), qui clive la pro-IL-1 β après le résidu d'acide aspartique en position 116 [Howard et coll., 1991] [Cerretti et coll., 1992] [Thornberry et coll., 1992]. Des données plus récentes suggèrent l'intervention d'une deuxième caspase pro-inflammatoire, la caspase-5, dans la génération de la forme active de l'IL-1 β [Martinon et coll., 2002].

D'autres protéases sont capables de cliver la pro-IL-1 β dont la trypsine et la plasmine [Matsushima et coll., 1986], mais aussi l'élastase leucocytaire [Black et coll., 1988] ou certaines MMPs (MMP-2,-3 et -9) [Schonbeck et coll., 1998] qui sont par ailleurs co-localisées avec l'IL-1 β active au niveau des sites inflammatoires. S'agissant d'une activation extracellulaire, leur action n'est effective que dans le cas où l'IL-1 β est sécrétée sous sa pro-forme [Beuscher et coll., 1990].

4.3.3. Les mécanismes de sécrétion

Contrairement à l'IL-1 α , l'IL-1 β n'a pas de rôle intracellulaire et doit donc être sécrétée pour exercer son action biologique [Stevenson et coll., 1992]. Le potassium (K⁺) intracellulaire semble joué un rôle déterminant dans la sécrétion d'IL-1 β . La stimulation par de l'Adénosine 5'-triphosphate (ATP) exogène entraîne l'ouverture de pores de la membrane plasmique permettant l'efflux du K⁺ intracellulaire. La culture de monocytes en présence de concentrations élevées de K⁺ dans le milieu, bloquant alors la sortie de K⁺ intracellulaire, empêche la sécrétion d'IL-1 β induite par l'ATP

[Perregaux et Gabel, 1994]. Cependant, le mécanisme déclenché par l'ATP pour libérer l'IL-1 β est très controversé et trois modèles de sécrétion ont été proposés (Schéma 14) [Wewers, 2004].

☞ Le premier et plus ancien modèle suggère que l'ATP déclenche simplement la mort cellulaire et la lyse cellulaire [Hogquist et coll., 1991]. Bien qu'il soit exact que la stimulation par l'ATP puisse éventuellement conduire à la mort cellulaire, les études cinétiques qui ont suivi ont pu montrer que l'IL-1 β était sécrétée dans le milieu extracellulaire avant la formation des pores induits par la lyse cellulaire [Mehta et coll., 2001]. Il y a certes un lien avec la mort cellulaire mais le mécanisme de sécrétion semble plus complexe qu'une simple lyse cellulaire.

☞ Le second modèle propose un mécanisme selon lequel l'IL-1 β sortirait de la cellule par l'intermédiaire de microvésicules qui bourgeonneraient à la membrane plasmique (« blebbing »). Ce modèle a été montré dans la lignée monocyttaire humaine THP-1. 2 à 5 secondes après la stimulation par l'ATP, des bourgeons se forment à la membrane plasmique. Des microvésicules contenant de l'IL-1 β bioactif s'échappent de la membrane et peuvent se rompre pour libérer l'IL-1 β [MacKenzie et coll., 2001]. Ce concept a été remis en question dernièrement par l'observation selon laquelle les bourgeonnements étaient dépendant de kinases de la voie Rho dont l'inhibition empêchait certes le bourgeonnement mais pas le clivage ni la sécrétion d'IL-1 β [Verhoef et coll., 2003].

☞ Le troisième modèle implique l'exocytose de lysosomes sécrétoires [Bakouche et coll., 1987]. Andrei et collaborateurs se sont inspirés des travaux de Bakouche et y ont intégré de nouvelles données expérimentales pour établir un modèle cohésif [Andrei et coll., 2004]. Ils ont pu montrer que la pro-IL1 β était transportée dans des vésicules d'endocytose. Dans ces vésicules, la pro-IL-1 β se trouve dans le même compartiment que la caspase-1 qui peut alors activer l'IL-1 β sans que la caspase-1 n'induisse l'apoptose. Ce modèle permet d'expliquer comment la caspase-1 peut être activée sans induire la mort

cellulaire, pourquoi l'IL-1 β et la caspase-1 sont secrétées de façon synchrone et pourquoi il est difficile de détecter la caspase-1 active lors du clivage et de la sécrétion.

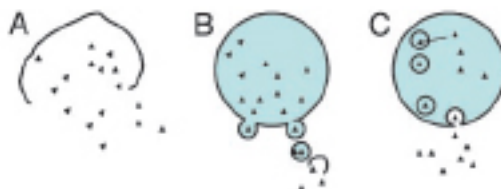


Schéma 14 : Les trois mécanismes proposés pour la sécrétion d'IL-1 β par des macrophages. **a.** lyse cellulaire, **b.** « blebbing » (extrusion de microvésicules contenant l'IL-1 β), **c.** exocytose. (D'après Wewers, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004)

4.4. Les récepteurs de l'IL-1 β

La famille du récepteur de l'IL-1 comprend actuellement neuf membres codés par des gènes distincts (tableau 6) [Dinarello, 2002]. Il existe deux protéines principales (récepteurs) capables de fixer l'IL-1 β (IL-1RI, IL-1RII), et une protéine accessoire du récepteur (IL-1R-AcP). Les domaines extracellulaires de ces trois entités en font des membres de la superfamille des immunoglobulines et comprennent chacun 3 domaines IgG-like [Sims et coll., 1988].

Nouveau Nom	Ancien(s) Nom(s)	Ligand(s)
IL-1R1	IL-1RI	IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra
IL-1R2	IL-1RII	IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra
IL-1R3	IL-1R-AcP	IL-1 α , IL-1 β
IL-1R4	ST2/Fit-1	Inconnu
IL-1R5	IL-18R α /IL-1Rrp1	IL-18
IL-1R6	IL-1Rrp2	IL-1 ϵ , IL-1 δ
IL-1R7	IL-1R18 β /IL-1RAcPL	IL-18
IL-1R8	IL-1RAPL	Inconnu
IL-1R9	IL-1R9	Inconnu

Tableau 6 : Nouvelle nomenclature des neuf membres de la famille du récepteur de l'IL-1 (d'après Dinarello, *Clin Exp Rheumatol* 2002)

4.4.1. Le récepteur de type 1 (IL-1RI)

L'IL-1RI est une glycoprotéine de 80 kDa trouvée à la surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des hépatocytes, des fibroblastes, des kératinocytes, des cellules dendritiques épidermiques et des lymphocytes T. Bien que ce récepteur soit peu exprimé à la surface des cellules primaires (50 à 200 par cellule), il est retrouvé en abondance à la surface de nombreuses lignées cellulaires (jusqu'à 5000 par cellule) [Dinarello, 1996]. L'IL-1RI nécessite de nombreuses glycosylations pour fixer l'IL-1 [Mancilla et coll., 1992]. L'affinité de l'IL-1RI vis-à-vis de l'IL-1 β est relativement faible (500 pM – 1 nM) et ce récepteur doit se conjuguer avec une protéine accessoire (IL-1R-AcP) pour être capable de transduire un signal intracellulaire (Schéma 15) [Greenfeder et coll., 1995].

Comme le montre le schéma 15, l'IL-1RI possède un unique segment transmembranaire. La partie cytosolique ne semble pas posséder d'activité tyrosine-kinase intrinsèque, mais lorsque l'IL-1 se lie à quelques récepteurs, les récepteurs libres semblent subir des phosphorylations [Gallis et coll., 1989]. La séquence en acides aminés du domaine cytoplasmique partage 45 % d'homologie avec le domaine cytoplasmique de la protéine transmembranaire *Toll-like receptor* (TLR) [Gay et Keith, 1991]. Cette homologie d'organisation de gène et d'acides aminés suggère que l'IL-1RI et le TLR dérivent d'un même gène ancestral et déclenchent des signaux similaires [Heguy et coll., 1992].

4.4.2. La protéine accessoire du récepteur (IL-1R-AcP)

Les domaines extracellulaire et cytoplasmique de l'IL-1R-AcP sont comparables à ceux de l'IL-1RI. Le domaine cytoplasmique de ces entités contient un site accepteur de PKC très conservé ; toutefois, les agents inducteurs de PKC ne reproduisent pas le message intracellulaire de l'IL-1 [Kuno et Matsushima, 1994]. D'un point de vue fonctionnel, l'IL-1R-AcP ne reconnaît pas l'IL-1 libre. Le modèle proposé nécessite une fixation de l'IL-1 sur l'IL-1RI engendrant un changement conformationnel reconnaissable par l'IL-1R-AcP. La formation du complexe IL-1RI/IL-1/IL-1R-AcP permet la transduction du signal [Greenfeder et coll., 1995].

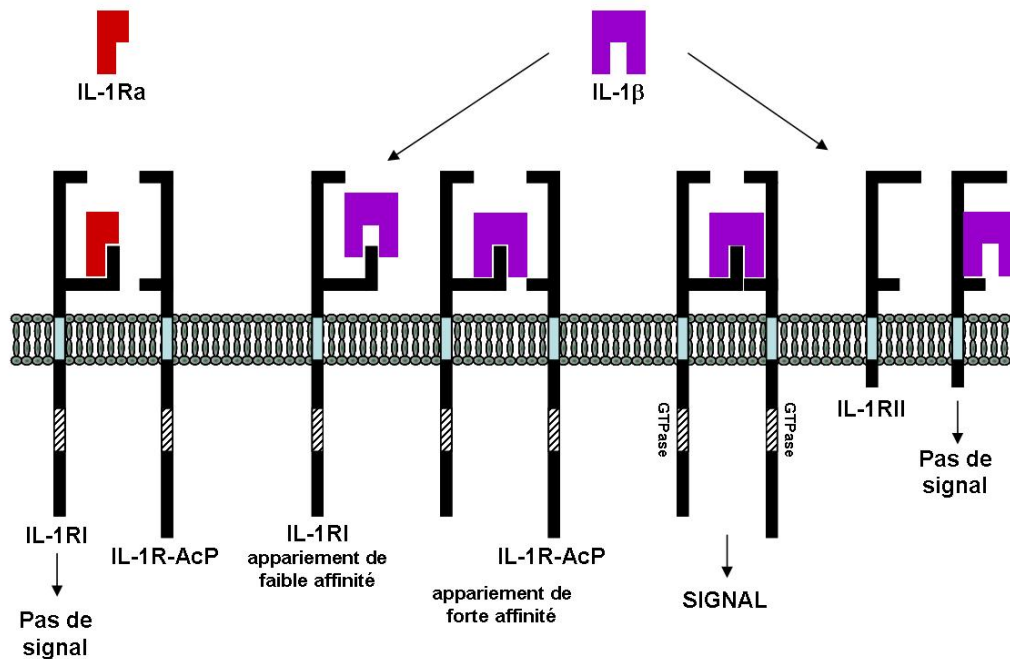


Schéma 15 : *Modèle de liaison de l'IL-1 β à son récepteur membranaire et ses antagonistes (d'après Dinarello, Blood 1996)*

4.4.3. Le récepteur de type 2 (IL-1RII)

L'IL-1RII possède un court domaine cytoplasmique de vingt neuf acides aminés. Ce récepteur est vraisemblablement un « leurre » pour l'IL-1 et particulièrement pour l'IL-1 β . L'IL-1RII lie fortement l'IL-1 β , empêchant ainsi la fixation sur l'IL-1RI et donc de transduire un signal intracellulaire [Colotta et coll., 1993]. L'absence de domaine cytoplasmique fait de l'IL-1RII un récepteur négatif fonctionnel.

4.4.4. La transduction du signal

Dans les cellules primaires la quantité d'IL-1RI est très faible et la réponse biologique peut avoir lieu lorsque quelques récepteurs (2 à 3 %) seulement sont occupés [Gallis et coll., 1989]. Le signal induit par la fixation de l'IL-1 β à son récepteur n'est pas encore totalement élucidé et semble dépendre du type cellulaire considéré. Les voies principales sont regroupées sur le schéma 16.

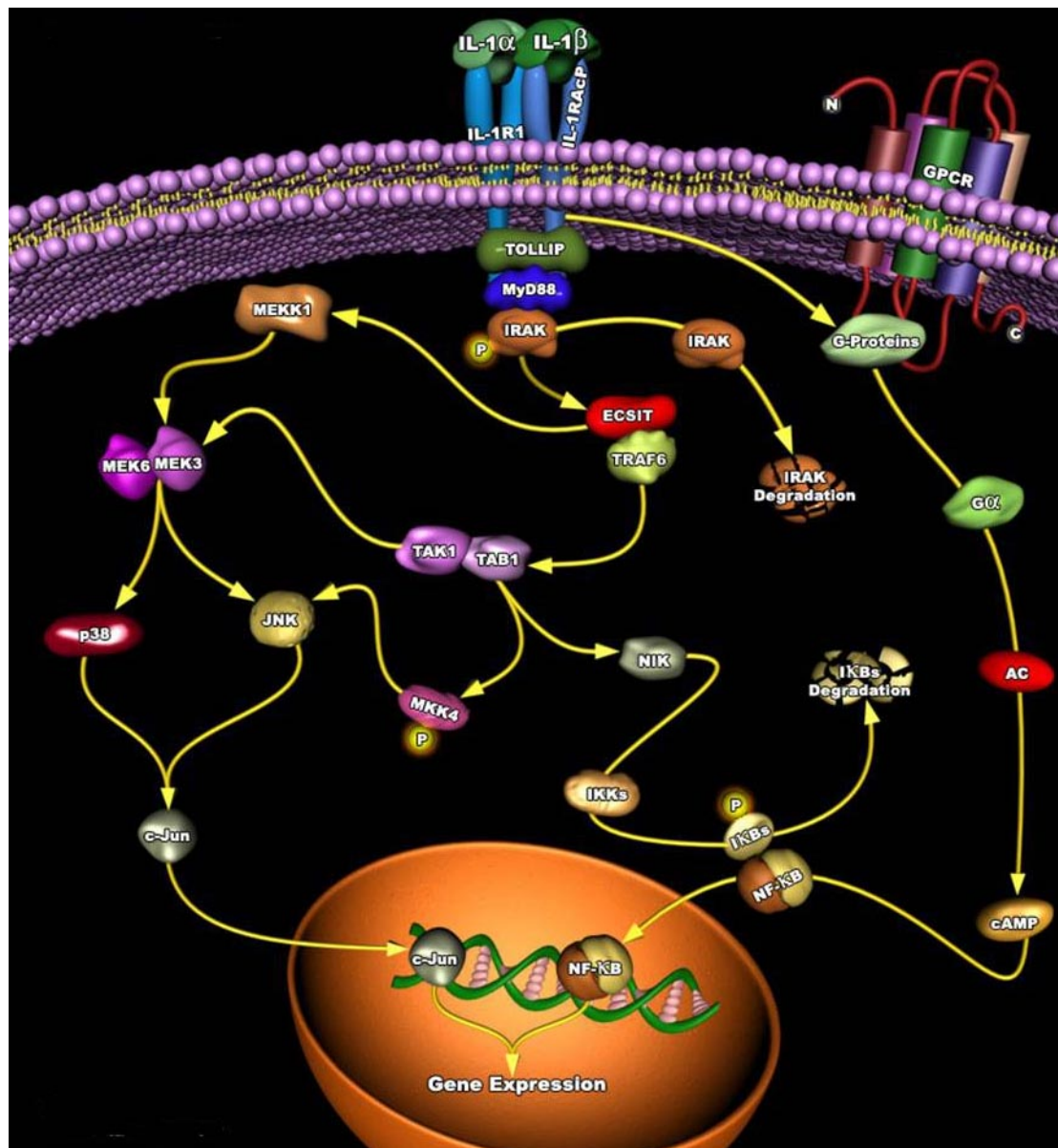


Schéma 16 : Voies de signalisation induites par l'IL-1 β (tiré de la page web : www.proteinlounge.com)

4.4.4.1. Les événements précoces

Certains événements de signalisation cellulaire prennent place dans les 2 à 5 minutes suivant la formation du complexe récepteur. Une activité GTPase semble définir un événement très précoce de la cascade signalétique résultant en l'hydrolyse d'un résidu guanosine 5'-trisphosphate (GTP). Parallèlement, il a été noté une activité adénylyl cyclase provoquant la formation d'AMPc [Munoz et coll., 1990].

L'hydrolyse de phospholipides [Rosoff et coll., 1988], l'accumulation de céramides [Mathias et coll., 1993] et d'acide arachidonique suite à l'activation d'une phospholipase A₂ cytosolique sont également rapidement observés [Gronich et coll., 1994].

4.4.4.2. Les voies MAPK (mitogen-activated protein kinases)

Dans les 15 minutes suivant la formation du complexe récepteur, de nombreuses phosphorylations ont été démontrées au niveau des MAPK. Les phosphorylations induites par la fixation de l'IL-1 β à son récepteur ressemblent à celles induites par les esters de phorbol par la voie Protéine Kinase C (PKC) et seraient dépendantes de la libération de Diacylglycérol (DAG) [Schutze et coll., 1994].

Les MAPK constituent un réseau complexe de cascades enzymatiques activé par divers stimuli au niveau des récepteurs membranaires (facteurs de croissance, cytokines, stress, protéines d'adhésion,...) et conduit des signaux jusqu'au noyau pour influencer les différents programmes cellulaires (prolifération, différenciation, mort cellulaire, migration cellulaire,...) [Schaeffer et Weber, 1999] [Kyriakis et Avruch, 2001].

Parmi l'ensemble des voies MAPK, trois ont été particulièrement décrites :

- La voie Erk 1/2 (*Extracellular signal regulated kinase 1/2*)
- La voie p38
- La voie JNK 1/2 (*c-Jun N-terminal kinase 1/2*) / SAPK (*stress activated protein kinase*)

D'autres voies MAPK, activées par le stress, ont également été décrites : ERK3 et ERK 5 [Schaeffer et Weber, 1999] [Kyriakis et Avruch, 2001].

Les cascades MAPK ont été très conservées au cours de l'évolution des eucaryotes et reposent sur une architecture impliquant trois niveaux de kinases successifs (Schéma 17). Cette structure comporte une MAPK, un activateur de MAPK (MEK, MKK, ou MAPK kinase), et un activateur de MEK (MEK kinase [MEKK] ou MAPK kinase kinase). La transmission du signal s'effectue par des phosphorylations séquentielles et l'activation des composants respectifs de chaque cascade (Schéma 17).

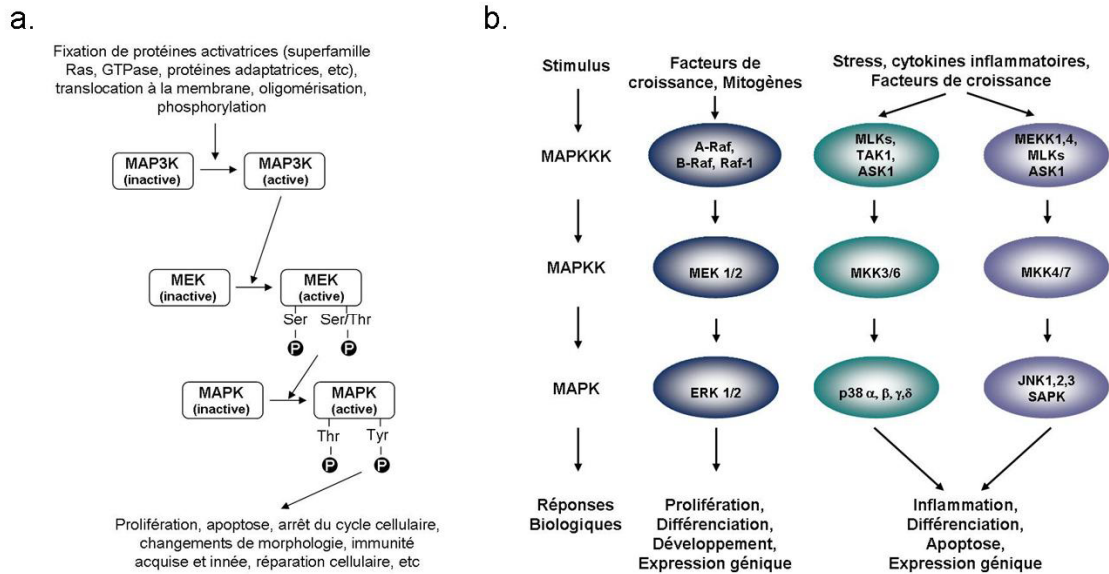


Schéma 17 : Cascades de signalisation MAPK. **a.** phosphorylations et activations séquentielles d'après un schéma commun à toutes les voies (d'après Kyriakis et Avrush, *Physiol Rev* 2001), **b.** les composés respectifs des trois voies MAPK principales (d'après Garrington et Johnson, *Curr Opin Cell Biol* 1999)

L'activation des MAPK par l'IL-1 β semble spécifique du type cellulaire. Ainsi, certaines cellules appréhendent l'IL-1 β comme un facteur de croissance et la signalisation est associée avec la phosphorylation de résidus sérine/thréonine de la MAPK p42/44 dans les cellules mésangiales [Huwiler et Pfeilschifter, 1994]. La MAPK p38 est phosphorylée dans les fibroblastes [Freshney et coll., 1994], de même que la MAPK p54a dans les hépatocytes [Kracht et coll., 1994].

4.4.4.3. Les facteurs de transcription

Les signaux induits par la fixation de l'IL-1 β à son récepteur abouti à l'activation de plusieurs facteurs de transcription. La majeure partie des effets biologiques de l'IL-1 β est médiée par la translocation au noyau de NF- κ B et du facteur *Activator Protein* (AP)-1, deux facteurs de transcription présents dans la plupart des gènes cibles de l'IL-1 β [Li et coll., 2001].

4.4.4.3.1. Les facteurs de transcription AP-1 (activated protein-1)

Le facteur de transcription AP-1 est constitué de deux sous-familles de protéines : la famille Jun regroupant les protéines c-Jun, JunB et JunD, et la famille Fos regroupant les protéines c-Fos, Fra-1, Fra-2 et FosB. Le facteur de transcription AP-1 se lie à l'ADN sous forme d'homo- ou hétérodimères composés de ces différentes entités protéiques [Shaulian et Karin, 2001]. Cependant ces protéines présentent des profils et des potentiels de transactivation distincts. Alors que les composés de la famille Jun peuvent se lier entre eux ou avec les composés de la famille Fos, les composés de la famille Fos ne forment pas d'homodimère [O'Shea et coll., 1992]. Les dimères Jun-Fos se fixent préférentiellement sur des séquences heptamères consensus 5'-TGA(C/G)TCA-3' connues initialement sous la terminologie *TPA response element* (TRE) et communément défini « site AP-1 » [Bakiri et coll., 2002]. Toutefois, les protéines de la famille AP-1 peuvent également former des complexes avec des facteurs de transcription hétérologues tels que ATF2, MAF et leurs protéines apparentées [Chinenov et Kerppola, 2001]. La formation de telles interactions modifie l'affinité et la spécificité de ces complexes pour les séquences d'ADN.

La régulation de l'activité AP-1 se présente à deux niveaux : les stimuli extracellulaires modifient la quantité et l'activité des protéines AP-1 [Karin, 1995]. La quantité des protéines AP-1 est principalement contrôlée par l'expression de leurs gènes [Karin, 1995]. Cependant d'autres études montrent que la quantité de c-Jun et c-Fos peut également être régulée par la modification de leur stabilité par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation impliquant différentes kinases/phosphatases selon les étapes d'activation [Treier et coll., 1994] [Tsurumi et coll., 1995].

La stimulation des cellules par différents stimuli induit la transcription de c-Fos très rapidement et de façon transitoire [Piechaczyk et Blanchard, 1994] [Treisman, 1992]. Plusieurs éléments *cis* peuvent médier l'induction de c-Fos :



Un site *cAMP Response Element* (CRE), disposé dans la région proximale de la boîte TATA de c-Fos, peut être occupé par les protéines *CRE-binding protein* (CREB) ou ATF [Sheng et coll., 1991].

- ☞ Un site *Sis-inducible enhancer* (SIE) qui est reconnu par le groupe des facteurs de transcription STAT [Darnell et coll., 1994].
- ☞ Un site *serum-response element* (SRE) reconnu par un dimère du *serum-response factor* (SRF) tel que Elk-1 dont l'activation est sous le contrôle des voies MAPK Erk 1/2, p38 et JNK.

c-Jun est le composé central de la plupart des complexes AP-1 [Karin, 1995]. Le gène de c-Jun est exprimé constitutivement dans de nombreux types cellulaires à un niveau basal qui peut être augmenté par de nombreux stimuli dont les facteurs de croissance, les cytokines et les U.V. [Karin, 1995] :

- ☞ L'induction de c-Jun est couramment médiée par un site TRE sur lequel se fixe un dimère c-Jun/ATF2 plutôt qu'un dimère AP-1 conventionnel [van Dam et coll., 1993].
- ☞ L'activation de c-Jun dépend également de l'activation des voies MAPK JNK et p38 [Hibi et coll., 1993] [Rangneaud et coll., 1995] [Derijard et coll., 1994]. Les voies JNK et p38 activent et phosphorylent ATF2, et JNK phosphoryle le domaine d'activation de c-Jun [Karin et coll., 1997]. Enfin, Erk 1/2 et p38 peuvent contribuer à l'expression de c-Jun par l'activation de protéines *MADS box transcription enhancer factor* (MEF)-2, qui sont d'autres facteurs de transcription capables d'induire l'expression de c-Jun [Derijard et coll., 1995].

4.4.4.3.2. La voie NF-κB (nuclear factor-κB)

Dans les années 1980 Sen et Baltimore décrivaient NF-κB comme un facteur nucléaire capable de se lier à l'élément *enhancer* du gène de l'immunoglobuline κ dans les cellules B [Sen et Baltimore, 1986]. Dans les années qui ont suivies il a été montré que des sites fonctionnels pour NF-κB se trouvaient au sein de promoteurs de nombreux gènes non spécifiques des cellules B.

NF-κB appartient à la famille Rel qui compte cinq protéines chez les mammifères (Schéma 18) : p65 (RelA), c-Rel, RelB, p105/p50 (NF-κB1) et p100/p52 (NF-κB2) [Baldwin, 1996]. RelA, c-Rel et RelB sont synthétisés sous leur forme mature alors que p50 et p52 sont d'abord synthétisés sous la forme de précurseurs

(p105 et p100 respectivement) et nécessitent une modification post-traductionnelle par le clivage de leur extrémité C-terminale par le protéasome [Lin et Karin, 2003].

La famille de l'inhibiteur de NF- κ B ($I\kappa$ B) comprend également plusieurs isoformes dont les plus connues sont $I\kappa$ B α et $I\kappa$ B β (Schéma 18). Cette famille de protéines constitue des inhibiteurs naturels/endogènes de la voie NF- κ B.

La forme active de NF- κ B se lie à l'ADN sous forme de dimère. Le dimère dont l'activation est la plus connue est la forme p50/p65(RelA). Il existe cependant d'autres homo- ou hétérodimères. Certains dimère n'ont apparemment jamais été identifiés ; par exemple RelB ne dimérise qu'avec les protéines p50 ou p52 [Ryseck et coll., 1995]. L'activation d'un promoteur par un dimère plutôt qu'un autre se fait d'une part en fonction de la voie d'activation en amont (*i.e.* dans le cytoplasme), et d'autre part en fonction de la séquence nucléotidique au niveau de l'ADN. Ainsi, le dimère p50/p65 se fixe préférentiellement sur une séquence du type 5'-GGGRNNYYCC-3', alors que le dimère p65/c-Rel a une grande affinité pour une séquence du type 5'-HGGARNYYCC-3' (où N= A, C, T ou G ; H= A, C ou T ; R= purine ; Y= pyrimidine) [Parry et Mackman, 1994]. Seul le dimère p50/p65 ayant été décrit dans les mécanismes régulant l'expression de l'IL-1 β , nous ne détaillerons pas les voies d'activation des autres dimères. Pour plus de précision sur les autres voies : [Viatour et coll., 2005] [Lin et Karin, 2003] [Baldwin, 1996].

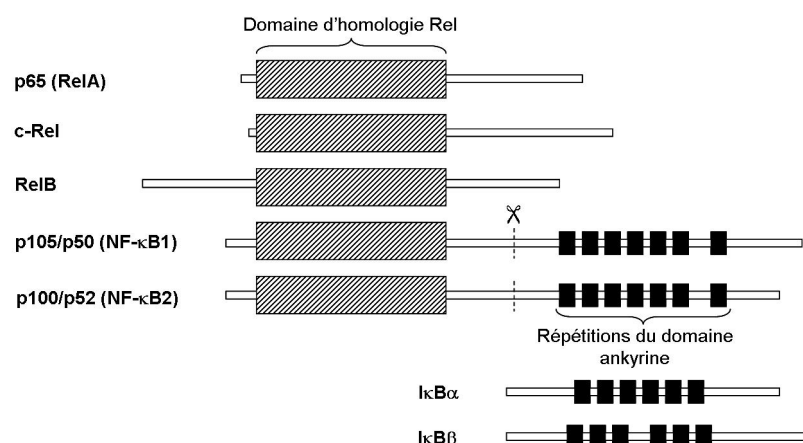


Schéma 18 : Les protéines des familles NF- κ B et $I\kappa$ B. Les protéines de la famille NF- κ B/Rel sont caractérisées par un domaine d'homologie Rel. Les protéines $I\kappa$ B possèdent des domaines répétés d'ankyrine. Les protéines p105 et p100 possèdent les 2 types de domaines avant leur clivage (d'après Baldwin, *Annu Rev Immunol* 1996)

Le dimère p50/p65 est maintenu dans le compartiment cytoplasmique par une liaison à la protéine inhibitrice I κ B α . L'activation de la voie NF- κ B consiste en une cascade séquentielle de protéines kinases aboutissant à la phosphorylation (sur les sérine 32 et 36) et l'ubiquitination (sur les Lysine 20 et 21) de I κ B α entraînant sa dégradation par le protéasome-26S [Karin et Ben-Neriah, 2000]. La dégradation de I κ B α libère ainsi le dimère p50/p65 qui migre dans le noyau pour activer les gènes cibles.

Plusieurs voies de signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B (p50/p65) ont été décrites (Schéma 19) [Viatour et coll., 2005] :

- ☞ La première voie, dite classique, est induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 β . La liaison de ces cytokines avec leurs récepteurs induit l'activation du complexe *I κ B-kinase* (IKK) comprenant l'ensemble protéique *NF- κ B essential modulator* (NEMO ; également appelé IKK γ), et les kinases IKK α et IKK β [Zandi et coll., 1997]. Une fois activé, ce complexe IKK phosphoryle I κ B α sur les sérines 32 et 36. L'inhibiteur est ensuite ubiquitinisé et dégradé par le protéasome.
- ☞ D'autres voies d'activation de NF κ B ont été classifiées d'atypiques car elles ne font pas intervenir le complexe IKK mais engendrent néanmoins la dégradation d'I κ B α par le protéasome. L'une d'entre elles est activée lors de dommages causés à l'ADN par des radiations U.V.. Ces radiations provoquent la phosphorylation de I κ B α , sur des résidus sérine regroupés en position C-terminale, par la *caséine kinase 2* (CK2) elle-même activée par la voie MAPK p38 [Kato et coll., 2003]. Une autre voie atypique est induite par le stress oxydatif (H₂O₂) via la protéine kinase Syk qui phosphoryle I κ B α sur la tyrosine en position 42 [Takada et coll., 2003].

Il a pu être démontré que l'induction strictement NF- κ B dépendante de l'IL-6 par le TNF nécessite également l'activation des voies MAPK p38 et Erk. En effet, l'inhibition pharmacologique de ces voies entraîne une atténuation de l'induction d'IL-6 par le TNF sans affecter la dégradation d'I κ B ni la translocation du dimère p50/p65 au noyau de même que sa capacité de liaison à l'ADN. Ces observations ont amené l'hypothèse que les MAPK pouvaient influencer l'activation transcriptionnelle de NF-

κ B de façon indirecte. Bien que ni p50 ni p65 ne soient des substrats directs des protéines Erk et p38, p65 peut être phosphorylée par la *mitogen- and stress-activated protein kinase-1* (MSK-1), une kinase située en aval des voies MAPK p38 et Erk. La protéine MSK-1 étant une enzyme nucléaire, elle phosphoryle p65 sur la sérine en position 276, ce qui est un événement nécessaire à l'activité transcriptionnelle [Vermeulen et coll., 2003].

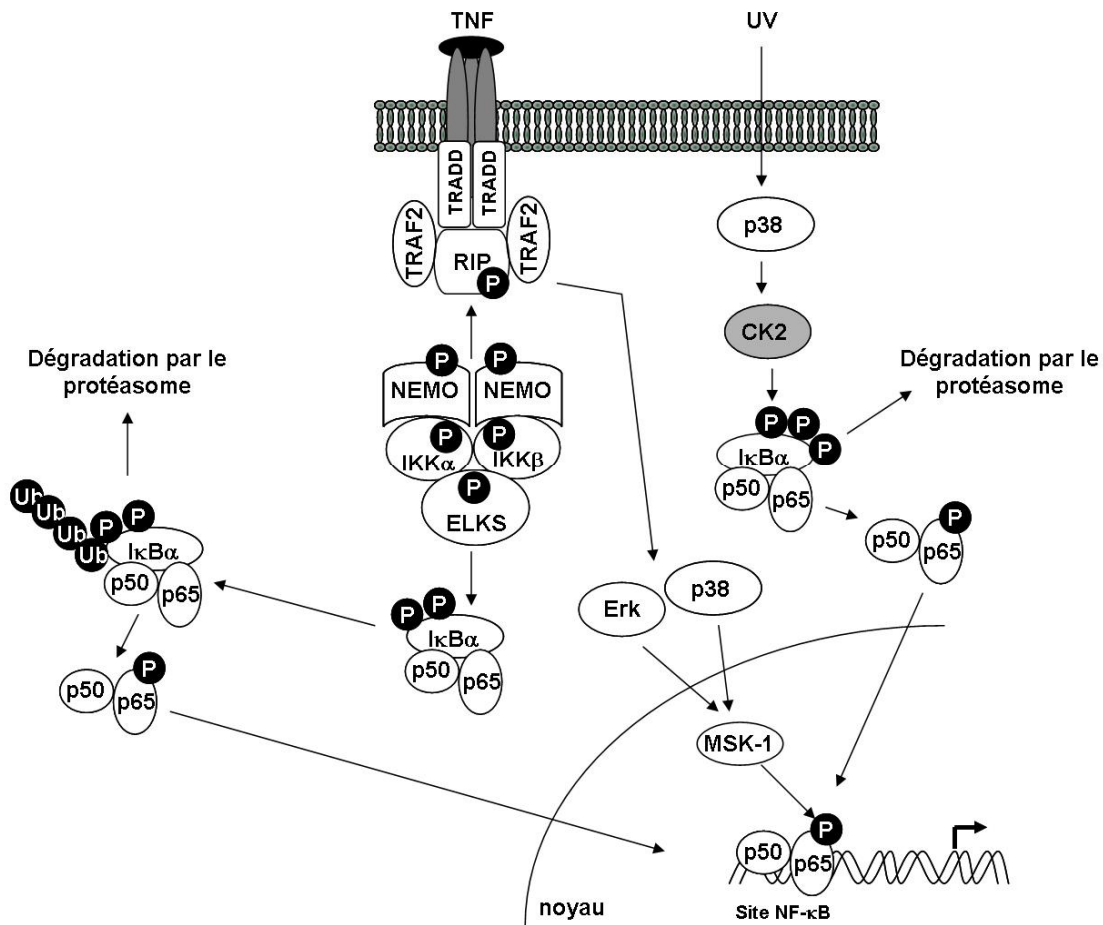


Schéma 19 : Activation de NF- κ B p50/p65. Schématisation des voies d'activation du complexe p50/p65 : voie classique par le récepteur au TNF, voie atypique d'activation par les UV, activation transcriptionnelle par MSK-1

4.5. Rôles physiopathologiques de l'IL-1 β

4.5.1. Rôle dans les pathologies inflammatoires chroniques

Une sécrétion excessive d'IL-1 β a pu être démontrée à partir de culture de PBMC provenant de patients atteints de divers syndromes inflammatoires chroniques acquis généralement traités par de l'IL-1Ra [Hoffman et coll., 2004]

[Hawkins et coll., 2004] [Lovell et coll., 2005]. Dans ces syndromes, l'augmentation de l'activité de l'IL-1 β est généralement due à la mutation du gène NALP-3 qui contrôle l'activation de la caspase-1 [Agostini et coll., 2004]. Les symptômes tels que la fièvre, l'anémie, la leucocytose et la thrombocytose ainsi que la production de protéines de la phase aiguë sont liés à cet excès d'IL-1 β (Schéma 20). Il est en effet plus probable d'imputer ces effets biologiques directement à la surproduction d'IL-1 β (100 fois supérieur à la normale) plutôt qu'à son récepteur dont la synthèse augmente peu au cours de ces processus (2 à 3 fois supérieure) [Dinarello, 2005].

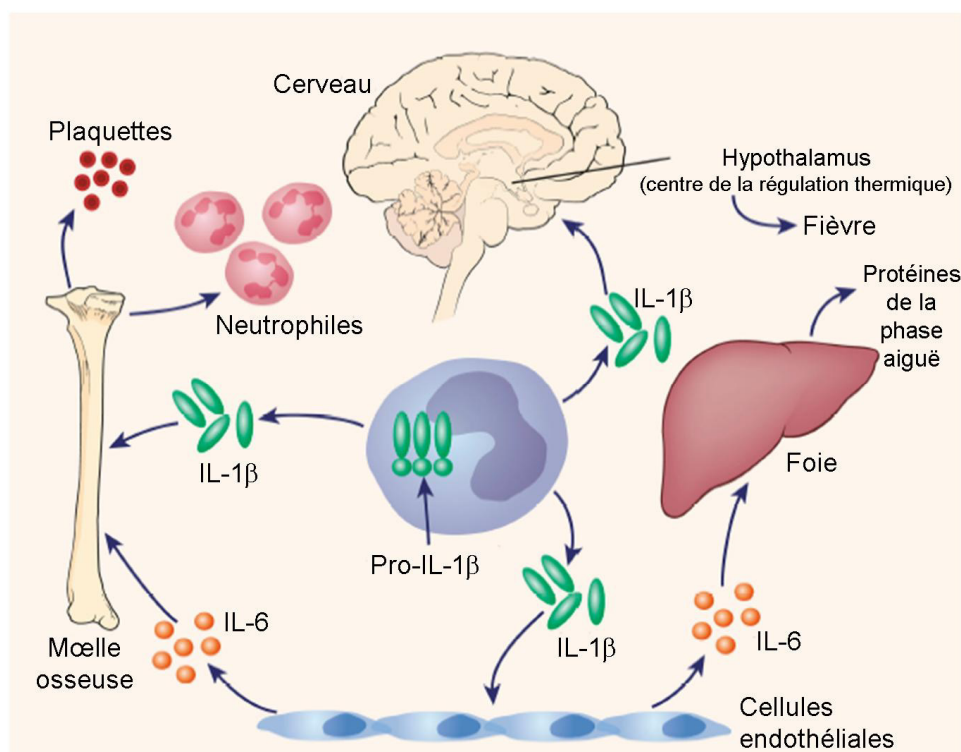


Schéma 20 : *Participation de l'IL-1 β dans la manifestation de l'inflammation systémique (d'après Dinarello, J Exp Med 2005)*

4.5.2. Rôle dans le mélanome

Dans une étude portant sur diverses lignées dérivant de mélanomes humains, la production spontanée d'IL-1 α (qui présente une activité biologique identique à l'isoforme β) semble coïncider avec la mutation de l'oncogène N-RAS très souvent observée dans ce type de tumeur [Castelli et coll., 1994]. De plus une corrélation

positive a pu être faite entre la production d'IL-1 β et des mélanomes métastatiques issus d'exérèses [Tyler et coll., 1995].

Pour la plupart des tumeurs, l'IL-1 β est un facteur de mauvais pronostic et son implication dans l'invasion et l'angiogenèse du mélanome a été démontrée *in vivo* [Voronov et coll., 2003]. Dans ces expériences, les auteurs ont remarqué une réduction de la taille de la tumeur primaire et une absence de métastase dans des souris déficientes pour l'IL-1 β comparativement à des souris normales. L'administration d'IL-1 β exogène dans les souris déficientes restaure une progression tumorale normale. La raison principale de ces différences entre les deux groupes de souris réside dans l'absence de néo-vascularisation en absence d'IL-1 β . Les expériences *in vitro* de co-cultures de macrophages péritonéaux et de cellules tumorales ont permis de mettre en évidence que l'IL-1(α et β) contribue à la production du VEGF. Dernièrement, il a été démontré que l'IL-1 α est un intermédiaire du dialogue entre les cellules de mélanome et les fibroblastes du stroma [Loffek et coll., 2005]. Ce dialogue résulte en une potentialisation de l'invasion des cellules tumorales. L'IL-1 α sécrétée par les cellules de mélanome participe à l'activation des fibroblastes péri-tumoraux qui synthétise la proMMP-1 en retour. Une fois activée, cette MMP contribue à la dégradation de la MEC et favorise l'invasion des cellules de mélanome.

Toutes les tumeurs n'appréhendent pas l'IL-1 β comme un facteur de croissance ; l'IL-1 β peut éventuellement avoir une action inhibitrice sur le développement de certains mélanomes [Onozaki et coll., 1985]. Itoh et collaborateurs ont pu caractériser le mécanisme par lequel l'IL-1 β inhibe la prolifération de la lignée A375-C2-1 [Itoh et coll., 1999]. Dans cette étude, les auteurs ont comparé cette lignée avec une lignée résistante à l'IL-1 β , les cellules A375-R8. Il ressort de ces expériences que la voie MAPK p38 induite en présence d'IL-1 permet d'inhiber la prolifération cellulaire via la régulation négative de l'ornithine décarboxylase, une enzyme conduisant à la synthèse des polyamines qui participent activement au cycle cellulaire [Heby et coll., 1975]. Les cellules résistantes sont déficientes dans la signalisation cellulaire entre l'activation de la voie p38 et la régulation négative de l'activité ornithine décarboxylase.

Enfin, l'IL-1 β sécrétée par les cellules de mélanome est capable de renforcer l'action immunitaire des cellules T contre ces cellules tumorales et semble être un candidat prometteur pour la thérapie génique [Bjorkdahl et coll., 2000].

5. L'élastine

L'élastine, présente dans le derme, est dégradée en périphérie de la tumeur de mélanome. Les peptides ainsi libérés peuvent alors influencer le comportement des cellules de mélanome, mais également celui des lymphocytes péritumoraux.

5.1. Les fibres élastiques

Les tissus tels que les poumons, les artères, les ligaments et la peau sont soumis à de fortes contraintes mécaniques tout au long de l'existence d'un individu. Pour absorber ces contraintes, ces tissus se déforment et reviennent à leur état d'origine continuellement. Leur bon fonctionnement est ainsi dépendant de leurs propriétés élastiques assurées par les fibres élastiques contenues dans leur MEC [Kielty et coll., 2002].

L'analyse morphologique de ces fibres en microscopie électronique met en évidence une partie externe, dense aux électrons, matérialisant un réseau microfibrillaire formé principalement de glycoprotéines (fibrillines et microfibril-associated glycoprotein). La partie centrale paraît amorphe, peu dense aux électrons, et est constituée très majoritairement d'élastine mais aussi de quelques microfibrilles [Rosenbloom et coll., 1993].

Les études ultrastructurales qui ont suivi ont révélé que l'élastine n'est pas un composé amorphe comme il l'était d'abord supposé. Bien au contraire, l'élastine est structurée et constituée de véritables fibres. La disposition des fibres composant l'élastine lui confère ses propriétés rhéologiques qui peuvent être différentes selon le tissu considéré [Pasquali-Ronchetti et Baccarani-Contri, 1997].

5.2. Structure de l'élastine

5.2.1. Modèles structuraux

L'élastine est une protéine abondante pouvant représenter 50% de la masse sèche des ligaments, 30% de l'aorte thoracique et des grands vaisseaux, 7% du poumon et 3% de la peau [Uitto, 1979].

Par définition, l'élastine ne possède pas de structure stable dans la mesure où elle est en perpétuel mouvement. Cependant quatre modèles ont été décrits et répondent au mécanisme d'élasticité (Schéma 21). Le modèle le moins controversé

actuellement est celui de la « goutte liquide » qui répond à la théorie d'élasticité bi-phasique. En effet, la déformation des domaines globulaires par étirement expose les groupements hydrophobes internes à l'eau environnante baissant ainsi l'entropie du système. La force de restitution est conduite par l'augmentation de l'entropie remettant le système dans son état initial (Schéma 22) [Weis-Fogh et Anderson, 1970]. Les résultats obtenus en spectroscopie optique confortent cette architecture en monomères globulaires reliés par des liaisons croisées [Debelle et coll., 1995].

Une caractéristique majeure de l'élastine est son extrême insolubilité. Cette particularité provient de sa composition en acides aminés très hydrophobes tels que V, A, P et G pouvant représenter 75% de la protéine chez les vertébrés supérieurs [Rosenbloom et coll., 1993]. Pendant très longtemps, l'insolubilité de l'élastine a gêné les recherches sur les mécanismes conduisant à la mise en place des fibres élastiques jusqu'à la découverte d'un précurseur soluble : *la tropoélastine*.

5.2.2. La tropoélastine

Les tropoélastines de diverses espèces, à savoir l'Homme [Indik et coll., 1987], le poulet [Bressan et coll., 1987], le bœuf [Raju et Anwar, 1987] [Yeh et coll., 1989] et le rat [Pierce et coll., 1990], ont été séquencées et présentent toutes une forte homologie tant au niveau du gène que de la protéine. La protéine est caractérisée par deux types de domaines majeurs : des domaines hydrophobes riches en G, V, P et A présentant des motifs répétés tels que VGVAPG ; des domaines hydrophiles généralement riches en K et A impliqués dans les liaisons croisées.

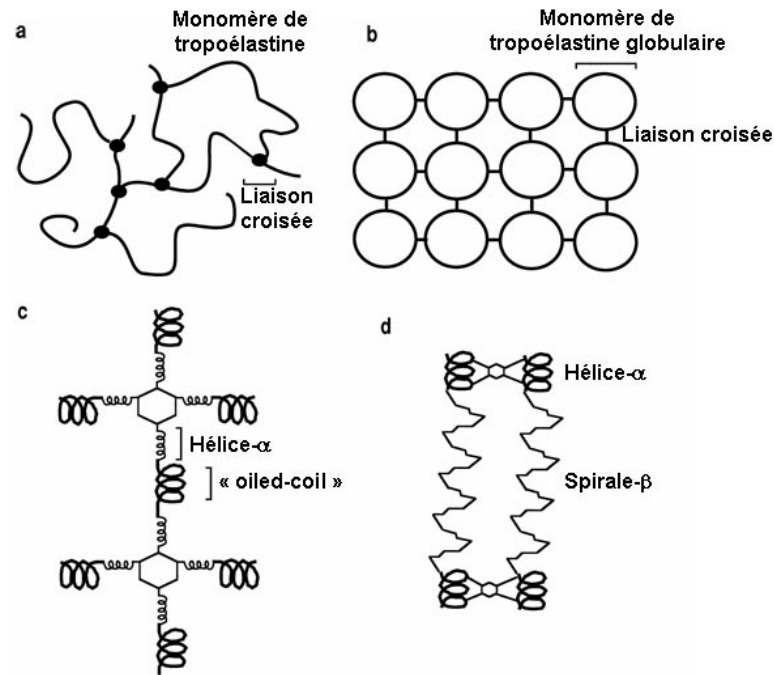


Schéma 21 : Modèles structuraux proposés de l'élastine. **a.** modèle du "réseau aléatoire" correspondant à des chaînes pontées arrangées aléatoirement dans une architecture tridimensionnelle quelconque, **b.** modèle de la "goutte liquide" correspondant à des molécules de tropoélastine globulaire liées par des liaisons croisées, **c.** modèle "oiled coil" dans lequel des domaines de liaison croisée α -hélicoïdaux joignant deux chaînes ou plus ainsi qu'un "oiled coil" formé par les domaines hydrophobes, **d.** modèle "fibrillaire" consistant en des liaisons croisées α -hélicoïdales et d'une hélice lâche, la spirale β , formée par les domaines hydrophobes répétitifs. Les spirales β peuvent s'associer pour former de longs filaments qui, avec l'aide des liaisons croisées, maintiennent plusieurs chaînes ensemble. (d'après Vrhovski et Weiss, Eur J Biochem 1998).

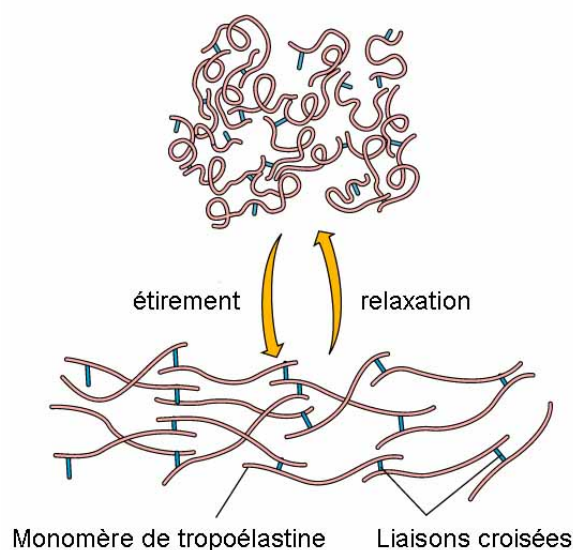


Schéma 22 : Schématisation de l'étirement des fibres d'élastine (tiré de la page web : www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/CellBio11/CB11_4.html)

5.2.2.1. Structure du gène de l'élastine

Le gène de l'élastine est en exemplaire unique dans le génome humain et localisé sur le chromosome 7 en position 7q11.1-21.1 [Fazio et coll., 1991]. Il s'étend sur 45 kb et contient 34 exons avec un ratio intron : exon de 20 pour 1 rendant compte d'exons relativement petits intercalés au milieu de grands introns [Bashir et coll., 1989].

La structure de l'ADNc de l'élastine (Schéma 23) est caractéristique de la structure de son produit, la tropoélastine, en cela que les exons codant pour les domaines hydrophobes et ceux des liaisons croisées sont placés en alternance sur le gène. L'exon 26A est spécifique de l'espèce humaine mais sa fonction est encore inconnue aujourd'hui. Les exons 34 et 35 de l'élastine bovine sont absents du gène humain prouvant que des variations inter-espèces existent [Vrhovski et Weiss, 1998]. Enfin, l'exon 36 est particulièrement conservé (>70 %) entre les différentes espèces. Cet exon code pour la partie C-terminale de la protéine en amont d'une longue région 3' non traduite et dont la fonction est liée à la stabilisation de l'ARNm affectant alors la synthèse d'élastine [Hew et coll., 1999].

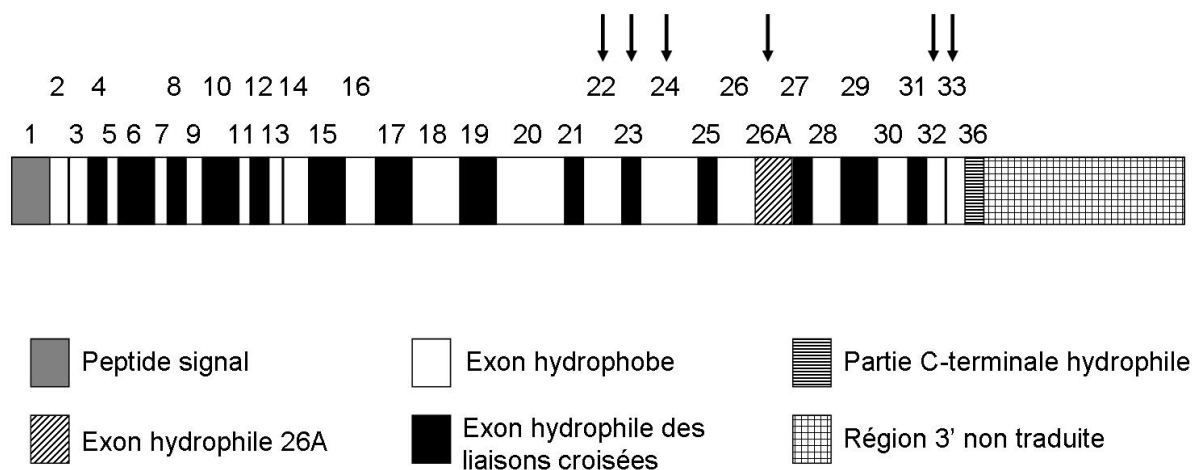


Schéma 23 : Structure de l'ADNc de la tropoélastine humaine. Les exons marqués d'une flèche sont potentiellement éliminés lors de l'épissage alternatif (d'après Vrhovski et Weiss, Eur J Biochem 1998).

5.2.2.2. Contrôle de l'expression

L'élastogénèse est un mécanisme mis en place essentiellement au stade précoce du développement des individus. Il a été démontré *in vivo* que l'activité du promoteur de l'élastine décroît en fonction de l'âge [Hsu-Wong et coll., 1994]. Ce promoteur peut être divisé en plusieurs régions régulatrices (Schéma 24) [Rosenbloom et coll., 1993]. Le promoteur basique du gène semble se situer dans la région comprise entre -1 et -128 pb dans la région 5' flanquant le gène de l'élastine. Ce promoteur basique possède deux sites AP-2 potentiels ; en revanche aucune boîte TATA n'a pu être mise en évidence et les boîtes CAAT présentes ne sont pas fonctionnelles. D'autres sites AP-2 et *Specific Protein* (SP)-1 ont pu être établis dans la région s'étendant de -129 à -495 pb expliquant une forte régulation positive du promoteur basique par cette région notamment par la voie AMPc. Une deuxième région de régulation positive a pu être montrée dans la séquence -987 à -1553. Cette région étant encadrée par deux régions de régulation négative de -496 à -986 et de -1554 à -2260.

Les mécanismes régulant l'expression du gène de l'élastine ne se limitent pas à l'activation de son promoteur puisque plus de huit sites de départ de transcription ont été relevés [Rosenbloom et coll., 1993] [Bashir et coll., 1989] [Rosenbloom et coll., 1991]. De plus, les régions introniques du gène semblent posséder elles aussi des éléments de régulation. Il a été montré que le premier intron du gène bovin, dont la séquence est très proche de celui de l'Homme, possède des éléments de régulation négative [Manohar et Anwar, 1994].

Dans les cellules activées en présence de facteurs de croissance ou d'hormones, la synthèse d'élastine peut être affectée soit au niveau transcriptionnel en régulant l'activité du promoteur, soit au niveau post-transcriptionnel en affectant la stabilité de l'ARNm de l'élastine. Ainsi, le TNF- α et le b-FGF induisent une répression de l'expression du gène [Kahari et coll., 1992] [Brettell et McGowan, 1994] [Rich et coll., 1999], alors que les glucocorticoïdes, l'*Insulin Growth Factor* (IGF)-1, l'IL-10 et l'IL-1 β ont un effet opposé [Pierce et coll., 1995] [Mauviel et coll., 1993] [Reitamo et coll., 1994] [Rich et coll., 1993]. Le TGF- β 1 a été montré comme un régulateur positif de la synthèse d'élastine en augmentant la stabilité de l'ARNm par le biais de protéines cytosoliques se fixant à des endroits particuliers de l'ARNm de la tropoélastine [Kahari et coll., 1992] [Zhang et Parks, 1999] [Kucich et coll., 2002].

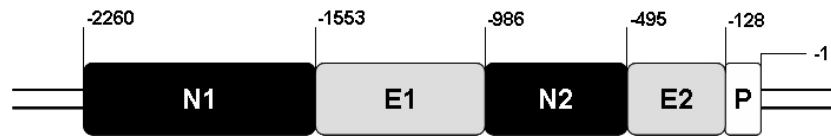


Schéma 24 : Représentation schématique des domaines fonctionnels du promoteur du gène de l'élastine. (P) est le promoteur basique, (E1) et (E2) sont les éléments de régulation positive, (N1) et (N2) sont les éléments de régulation négative (d'après Rosenbloom, Faseb J 1993).

5.2.2.3. Modifications post-traductionnelles

La tropoélastine ne subit que très peu de modifications post-traductionnelles et aucune glycosylation n'a pour l'instant été mise en évidence. La principale modification subie par la tropoélastine consiste en l'hydroxylation de résidus prolyls par la prolyl hydroxylase sur 0 à 20 % des résidus P [Uitto et coll., 1976] [Uitto et coll., 1991]. Cependant, cette modification n'est pas nécessaire à la synthèse des fibres élastiques et l'inhibition de la prolyl hydroxylase n'affecte pas la sécrétion de tropoélastine [Uitto et coll., 1976] [Rosenbloom et Cywinski, 1976]. En revanche l'hydroxylation excessive des résidus prolyls par un ajout d'ascorbate, co-facteur de la prolyl hydroxylase, peut engendrer une diminution de la production d'élastine [Faris et coll., 1984] [Barone et coll., 1985] [Davidson et coll., 1997]. L'hyperhydroxylation pourrait résulter en la déstabilisation des structures secondaires de la tropoélastine diminuant ses capacités à former des fibres élastiques à température physiologique [Urry et coll., 1979]. Toutefois, il semblerait que l'hydroxylation de la tropoélastine puisse être soit une conséquence d'une hydroxylation aspécifique du collagène se trouvant dans le même compartiment cellulaire, soit totalement artéfactuelle et due à une contamination des préparations de tropoélastine par du collagène [Vrhovski et Weiss, 1998].

Les autres modifications post-traductionnelles consistent en un clivage de la séquence signal et un pontage de résidus lysyl intervenant dans l'assemblage des monomères d'élastine à l'extérieur de la cellule.

5.2.2.4. Sécrétion et assemblage

Avant d'être sécrétée, la molécule de tropoélastine est synthétisée à la surface du réticulum endoplasmique rugueux (RER) puis les chaînes polypeptidiques sont libérées dans le lumen du RER en même temps que la chaîne s'acquitte de sa séquence signal [Saunders et Grant, 1984].

Pour être sécrétée, la tropoélastine se complexe à l'*Elastin Binding Protein* (EBP) qui joue alors le rôle de protéine chaperonne empêchant l'agrégation intracellulaire de la tropoélastine (Schéma 25). Ce complexe EBP-tropoélastine est incorporé dans des vésicules de transport jusqu'à la surface cellulaire où l'EBP se lie avec une protéine protectrice (PP) de 55 kDa et une neuraminidase (Nase) de 61 kDa. Les résidus de galactosucres provenant de la fibrilline, protéine des microfibrilles, se lient au site lectine de l'EBP engendrant une baisse de l'affinité entre l'EBP et la tropoélastine. Cette dernière est alors libre de se fixer à un site d'assemblage d'une *microfibril-associated glycoprotein* (MAGP). Ainsi assemblés, les monomères d'élastine sont ensuite liés par des liaisons croisées à l'élastine insoluble. L'EBP se détache de son complexe membranaire et peut être en grande partie ré-internalisée par endocytose. Dans l'endosome, l'EBP est recyclée en se réassociant avec une nouvelle molécule de tropoélastine. Ce recyclage semble essentiel pour une sécrétion et un assemblage extracellulaire efficace de l'élastine [Hinek, 1996].

Dès sa libération dans l'espace extracellulaire, la tropoélastine est transférée à un site d'assemblage localisé sur la MAGP responsable de l'ancrage de la tropoélastine par sa cystéine C-terminale sur l'architecture microfibrillaire [Brown et coll., 1992] [Mecham, 1991]. La tropoélastine est ensuite rendue insoluble par la formation de liaisons croisées avec l'élastine déjà présente [Bressan et Prockop, 1977].

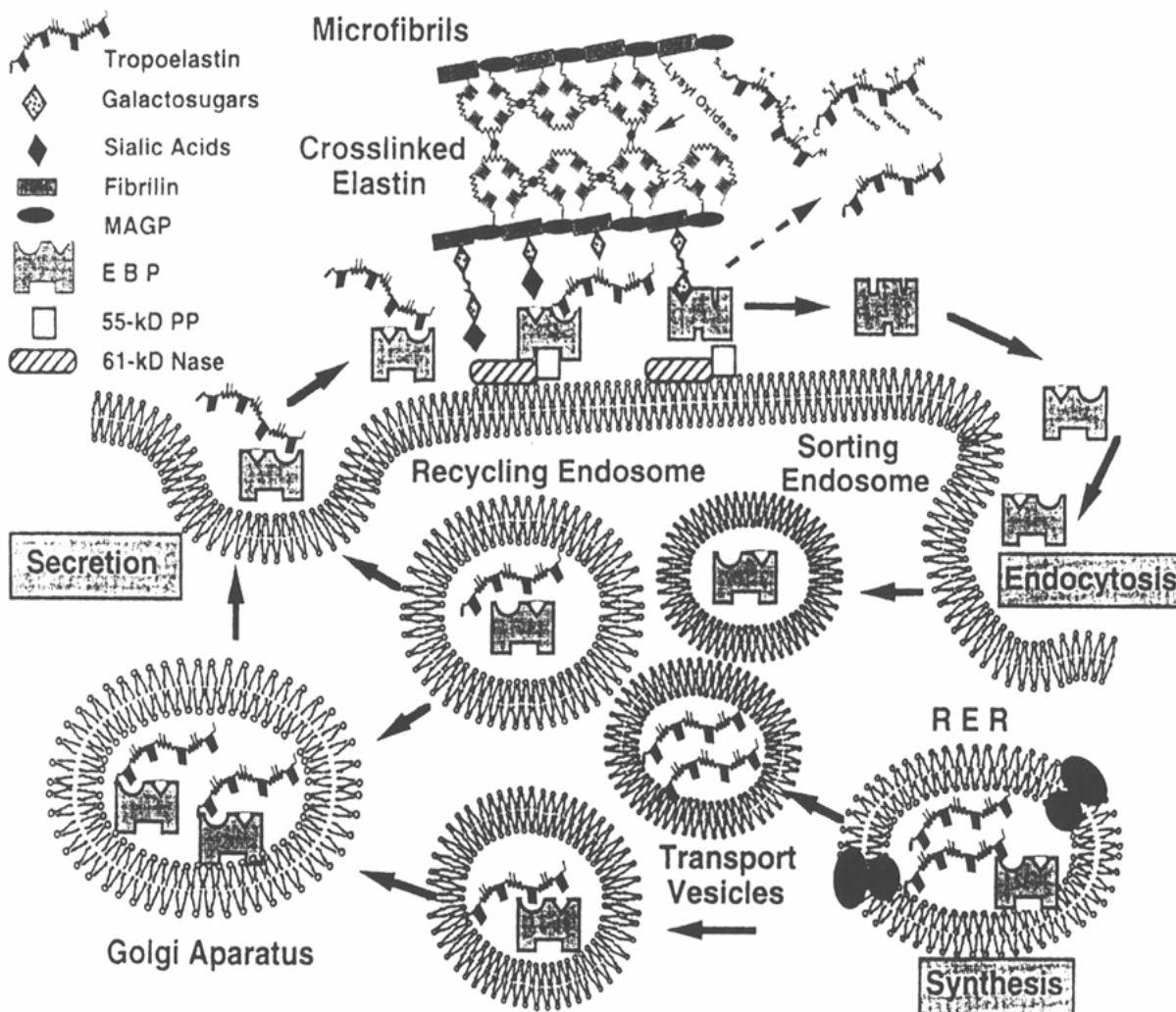


Schéma 25 : Schématisation de la sécrétion et assemblage de l'élastine (d'après Hinek, *Biol Chem* 1996).

La formation des liaisons croisées est initiée par une enzyme particulière : la lysyl oxydase (LOX). Cinq enzymes lysyl-oxydase-like (LOXL) ont été caractérisées (LOX, LOXL, LOX2, LOX3 et LOXC). Ces isoformes possèdent de grandes homologies au sein de leur domaine catalytique C-terminal mais diffèrent par leur région N-terminale susceptible de leur conférer leur spécificité. Jusqu'à présent, seules les formes LOX et LOXL semblent impliquées dans la formation des liaisons croisées de l'élastine [Borel et coll., 2001]. La réaction initiale consiste en une désamination oxydative des résidus lysyls par la lysyl oxydase pour former un groupement allysine (Schéma 26). Toutes les autres réactions faisant suite à cette modification sont spontanées et ont lieu entre des résidus lysyls et allysines

suffisamment proches pour former les liaisons croisées comme l'allysine aldol, la lysonorleucine, la merodesmosine et les liaisons croisées tétrafonctionnelles propres à l'élastine, comme la desmosine ou l'isodesmosine [Reiser et coll., 1992].

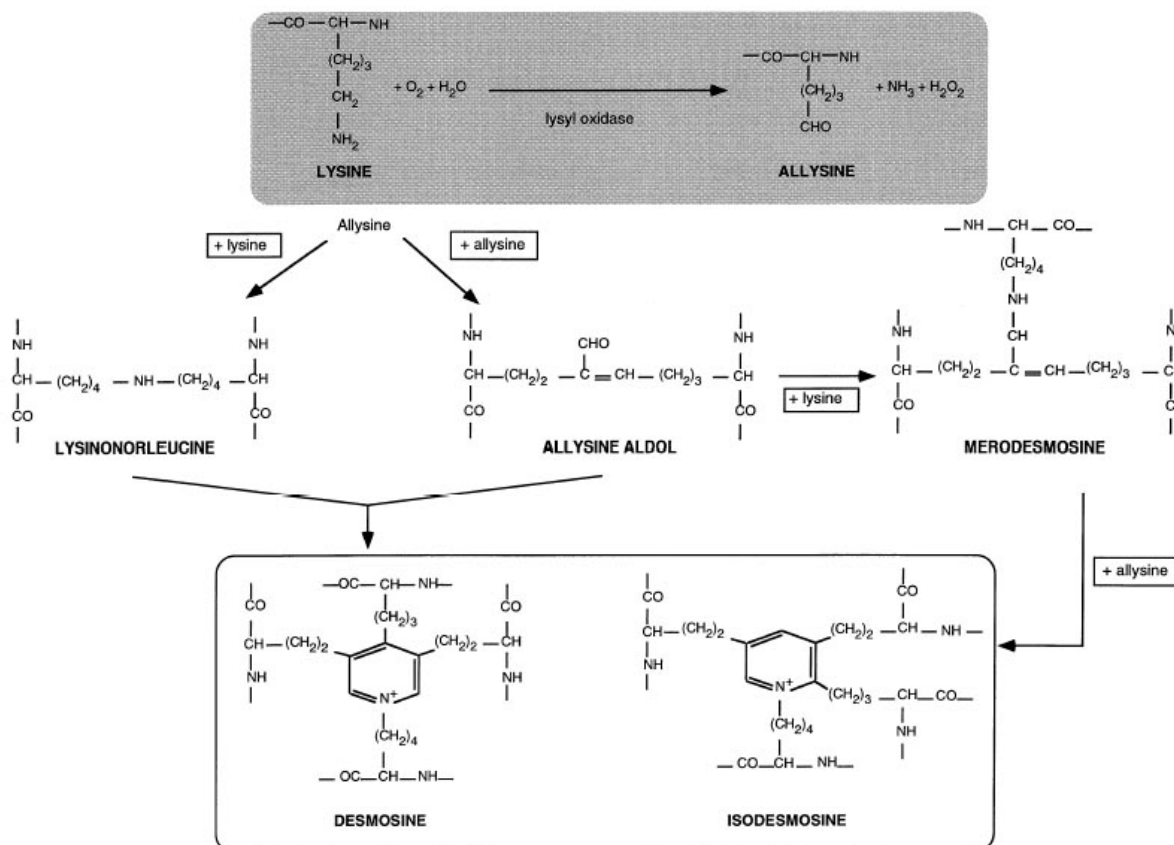


Schéma 26 : Structure et formation des liaisons croisées de l'élastine (d'après Vrhovski et Weiss, Eur J Biochem 1998).

5.2.3. Les peptides d'élastine

Les propriétés hydrophobes de l'élastine et sa richesse en liaisons croisées font de cette macromolécule un polymère très résistant. Cependant, plusieurs protéases sont capables de dégrader l'élastine insoluble et sont regroupées sous le nom d'élastases [Menashi et coll., 1989]. Le remplacement de l'élastine étant quasiment inexistant dans les conditions physiologiques normales, ces élastases sont donc sécrétées au cours de processus physiopathologiques comme la progression tumorale ou au cours d'un processus inflammatoire. Les sérine-élastases, représentées par l'élastase pancréatique, l'élastase leucocytaire et la cathépsine G, sont les élastases les plus abondantes chez les mammifères [Stone et

coll., 1982]. Certaines MMPs, comme les MMP-2, -9, -7 et -12, sont également des élastases efficaces [Hornebeck et coll., 2002] [Pardo et Selman, 1999] [Fulop et Larbi, 2002].

Le terme de « peptide d'élastine » ne s'apparente pas uniquement aux produits de digestion enzymatique de l'élastine (lysate enzymatique) mais également aux produits issus de la chimie. Cette dernière permet d'obtenir soit des peptides synthétiques, soit un mélange peptidique obtenu par hydrolyse de l'élastine insoluble par l'acide oxalique conduisant à l' α -élastine [Partridge et coll., 1955], ou par l'hydroxyde de potassium conduisant à la κ -élastine [Jacob et coll., 1984].

Les peptides issus de la dégradation de l'élastine (PDE) ne sont pas de simples produits de dégradation inertes de la matrice. Ces PDE sont capables de modifier le comportement de nombreux types cellulaires et répondent en ce sens à la définition de « matrikine » dont les effets biologiques sont décrits dans les tableaux 7 et 8.

La plupart des effets biologiques induits par les PDE ont été imputés à la présence d'un complexe membranaire faisant office de récepteur cellulaire [Duca et coll., 2004].

			Chimiotactisme								Prolifération					Synthèse de protéases						
			Monocytes	Neutrophiles	Fibroblastes	Cellules musculaires lisses	Cellules Endothéliales	Carcinomes 3LL-HM	Carcinomes pulmonaires M27	Mélanomes A2058	Lymphocytes	Fibroblastes	Cellules musculaires lisses	lignées cellulaires d'Astrocytomes	lignées cellulaires de Gliomes	Leucocytes	Fibroblastes	Fibrosarcomes HT-1080	Mélanomes M1Dor et M3Da			
Nature	Origine	κE ou αE	[263] [121]			[185]			[256]	[288]			[204]	[122] [252] [74]	[170]	[117]	[96]	[88] [68]	[6] [24]	[25]		
		κE coatée																				[181]
		Lysat Enzymatique	[234] [87]		[166]						[288]	[166]								[24]		
		VGVPAG	[235] [18] [87]		[235]		[147]				[21] [288] [22]				[122] [252]	[170]			[88]	[24]	[25]	
		PGAIPG		[84]	[85]						[84]									[24]		
		GFGVGAGVP			[148]		[147]															
		GLGVGAGVP					[147]															
		LREGDPSS	[17]																			
		LGTPG			[166]														[24]			

Tableau 7 : Effets biologiques des PDE en fonction de leur nature et des cellules cibles 1^{ère} partie. Pour des raisons de présentation, les données bibliographiques indiquées dans ce tableau le sont par des numéros se rapportant aux publications citées dans la section Références (d'après Duca, thèse d'Université, 2004).

Nature	Origine	Modifications de flux ioniques			Augmentation de la consommation d'oxygène		Vasorelaxation et libération de NO	Inhibition de la synthèse de cholestérol	Induction de l'apoptose	Induction de l'angiogénèse
		Fibroblastes	Cellules musculaires lisses	monocytes	Monocytes	Leucocytes	Cellules endothéliales	Monocytes	Lymphocytes	HUVECS
κE	Elastine Bovine	[113]			[68]	[273]	[62]	[272]	[199]	[216]

Tableau 8 : Effets biologiques des PDE en fonction de leur nature et des cellules cibles 2^{ème} partie. Pour des raisons de présentation, les données bibliographiques indiquées dans ce tableau le sont par des numéros se rapportant aux publications citées dans la section Références (d'après Duca, thèse d'Université, 2004).

5.3. Le complexe récepteur de l'élastine

5.3.1. Mise en évidence d'un récepteur membranaire

L'induction d'un effet chimiotactique par la tropoélastine, ou des fragments issus de l'élastine insoluble, sur des fibroblastes ou des leucocytes humains a amené l'hypothèse selon laquelle l'élastine devait posséder un véritable récepteur à la surface de ces cellules [Senior et coll., 1984]. Cette hypothèse fut largement consolidée suite à la démonstration d'un réel appariement entre des fibres élastiques purifiées et des cellules musculaires lisses et des fibroblastes [Hornebeck et coll., 1986]. Enfin, des études chromatographiques d'affinité ont révélé la présence d'un complexe récepteur à la surface de nombreux types cellulaires tels que des fibroblastes, des myocytes vasculaires, des neutrophiles, des monocytes et diverses cellules tumorales humaines dont des cellules de mélanomes [Hinek et coll., 1988]. Le complexe récepteur de l'élastine est constitué de deux sous-unités (de 55 et 61 kDa) liées à la membrane, et une sous-unité périphérique capable de se fixer à l'élastine et nommée EBP [Mecham et coll., 1989]. Si la plupart des études menées sur l'EBP lui confère une masse moléculaire apparente de 67 kDa, il est toutefois intéressant de noter que certains auteurs ont pu associer cette protéine à une masse apparente de 59 kDa à la surface de cellules telles que la lignée cellulaire de carcinome pulmonaire de Lewis, et de fibroblastes issus du ligament cardinal de patientes atteintes d'un prolapsus utérin [Blood et coll., 1988] [Yamamoto et coll., 2002].

5.3.2. Description des sous-unités

5.3.2.1. L'EBP

Le séquençage partiel de l'EBP à partir de cellules musculaires lisses de mouton a révélé une grande homologie entre cette protéine et un variant d'épissage de la β -galactosidase (β -Gal) humaine conduisant à un mutant enzymatique inactif [Hinek et coll., 1993]. Cette protéine proche de la β -Gal, nommée S-gal (spliced galactosidase), a perdu son activité enzymatique mais a conservé un domaine de fixation des galactosucres. De plus, cette protéine n'est plus adressée au lysosome mais à la surface cellulaire [Morreau et coll., 1989]. Enfin, une séquence de 32 acides aminés dans la partie centrale de S-gal comportant le motif VVGSPSAQDEASPL correspond au domaine de fixation de l'élastine (Schéma 27)

[Hinek et coll., 1993]. Il est aujourd'hui accepté que S-gal et EBP ne sont qu'une seule et même entité [Privitera et coll., 1998].

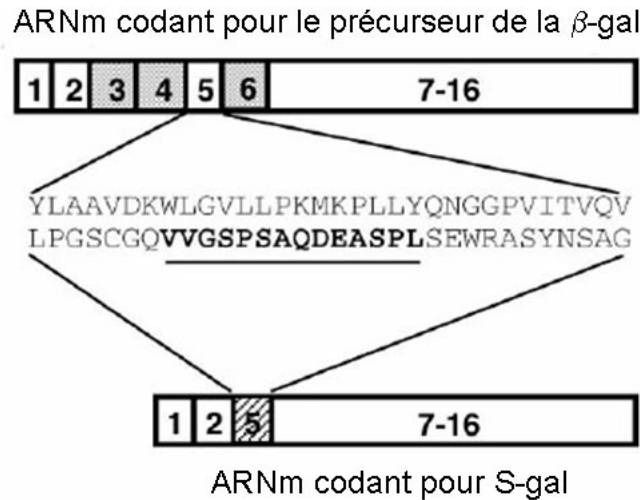


Schéma 27 : Schématisation de l'épissage alternatif du transcrit primaire de la β -Gal. Les exons 3, 4 et 6 sont épissés et le cadre de lecture de l'exon 5 est décalé pour faisant apparaître une région de 32 acides aminés caractéristique de S-gal (d'après Privitera et coll., J Biol Chem 1998).

Les similitudes entre le complexe récepteur de l'élastine et le mécanisme d'action de la β -Gal ne se limitent pas à S-gal puisque l'EBP, comme la β -Gal, est reliée à deux autres sous-unités: une PP de 55 kDa, et une Nase de 61 kDa.

5.3.2.2. La protéine protectrice (ou cathepsine A)

La présence d'une sous-unité de 55 kDa au sein du complexe récepteur de l'élastine pouvant correspondre à une PP a été démontrée par immuno-marquage à la surface de cellules musculaires lisses aortiques et dans le complexe retenu par affinité dans des colonnes contenant de l'élastine [Hinek, 1996]. La PP est d'abord synthétisée en un précurseur de 55 kDa puis clivée en sa forme mature correspondant à deux peptides de 20 et 32 kDa reliés par des ponts disulfures [Morreau et coll., 1992]. Cette protéine porte son nom en raison de son rôle au sein du lysosome où elle protège la β -Gal et la Nase d'une digestion lysosomale. Pour la Nase, cette protection semble dépendante d'une simple interaction entre les deux molécules [Lukong et coll., 2001]. Indépendamment de sa fonction protectrice, la PP est dotée d'activités sérine estérase (E.C. 3.2.1.23). Ainsi, la PP peut se comporter d'une part comme une carboxypeptidase à pH acide, et

d'autre part comme une estérase et une désaminase carboxy-terminale à pH neutre [Galjart et coll., 1991].

5.3.2.3. La neuraminidase

La Nase liée au complexe récepteur est la Nase lysosomale (NEU1 ; E.C. 3.2.1.18) sécrétée sous la forme d'une pré-pro-enzyme de 45,5 kDa pouvant être glycosylée et tronquée pour former une protéine transmembranaire mature de 48,3 kDa [Callahan, 1999]. Cependant, le degré de glycosylation variable peut engendrer des masses moléculaires pouvant atteindre 66 kDa pour la Nase lysosomale placentaire humaine [van der Horst et coll., 1989]. La fonction enzymatique de la NEU1 consiste à libérer un résidu d'acide sialique non réducteur situé en position N-terminale des glycoprotéines, oligosaccharides, polysaccharides, gangliosides ou encore des glycolipides. La distribution cellulaire de la Nase dépend de la phosphorylation d'une région C-terminale ⁴¹²YGTL⁴¹⁵. Ainsi, en absence de phosphorylation, la Nase et sa PP associée ont une localisation préférentielle à la membrane du lysosome. Lorsque la ⁴¹²Y est phosphorylée, la majeure partie des complexes Nase/PP est retrouvée à la membrane plasmique [Lukong et coll., 2001].

L'implication d'une Nase dans la transduction d'un signal a déjà pu être démontrée, et notamment dans l'activation de cellules T et la sécrétion d'IL-4 par ces mêmes cellules en présence de Nase bactérienne [Chen et coll., 1997]. De même, l'ajout de cette enzyme sur des monocytes provoque la désialylation de glycoconjugués non identifiés à la surface cellulaire, conduisant à l'activation de la voie Erk 1/2 [Stamatos et coll., 2004]. Ces différentes données ont amené l'hypothèse que la NEU1 pourrait être au cœur du mécanisme de transduction du signal induit par le complexe récepteur de l'élastine [Duca, thèse d'Université, 2004].

5.3.3. Transduction du signal intracellulaire

La signalisation intracellulaire induite par le complexe récepteur de l'élastine n'est pas encore totalement élucidée. Les divers éléments bibliographiques font apparaître des mécanismes distincts selon l'effet observé (chimiotactisme, prolifération, sécrétion de protéases,...) mais également selon le type cellulaire étudié. Les principales voies activées par les PDE sont résumées dans le schéma 28.

Les premières études sur la signalisation induite par les PDE ont été menées sur des monocytes et ont montré que la stimulation par de la κ -élastine induit une augmentation du taux intracellulaire en AMPc, Guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique (GMPc) et Ca^{2+} ainsi qu'une stimulation de l'explosion respiratoire de ces cellules [Fulop et coll., 1986]. Ces auteurs ont suggéré que l'augmentation du taux de GMPc pouvait être relié au chimiotactisme. Cette hypothèse fut confirmée un peu plus tard avec l'implication d'une Protéine Kinase G (PKG) [Uemura et Okamoto, 1997] [Kamisato et coll., 1997]. Le chimiotactisme des cellules de carcinome pulmonaire M27 par les PDE fait intervenir une PKC [Blood et Zetter, 1989].

Dans les polynucléaires neutrophiles, la stimulation par des PDE active l'explosion respiratoire. Dans ces cellules, le complexe récepteur de l'élastine semble couplé à une protéine-G sensible à la toxine pertussique, et l'inositol 3,4,5-trisphosphate (IP_3) est formé à partir de phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) induisant une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire [Varga et coll., 1989] [Varga et coll., 1990]. Une telle augmentation de la concentration de calcium a également pu être mise en évidence dans des cellules endothéliales suite à l'ouverture de canaux calciques [Faury et coll., 1998].

L'induction de la prolifération cellulaire par les PDE a été étudiée dans les cellules musculaires lisses de porc [Mochizuki et coll., 2002]. Cette étude a révélé le recrutement de la cascade Raf/MEK/Erk par les PDE suite à l'activation d'une protéine-G sensible à la toxine pertussique. De manière très intéressante, Duca et collaborateurs ont également pu mettre cette voie en évidence dans des fibroblastes dermiques humains dans le cadre d'une étude portant sur l'induction de sécrétion de MMP-1 par des PDE. Ces expériences ont permis de définir plus précisément les activateurs de cette voie et de montrer que deux mécanismes parallèles pouvaient intervenir dans l'activation de MEK ; d'une part la voie AMPc/Protéine Kinase A (PKA)/B-Raf, et d'autre part le système protéine-G/phosphatidylinositol 3-kinase ($\text{PI}_3\text{-K}$)/Raf-1. L'activation de la cascade MEK/Erk aboutit au recrutement du facteur de transcription AP-1 intervenant dans l'activation de promoteurs de nombreux gènes [Duca et coll., 2002] [Duca et coll., 2005].

Le mécanisme d'action du complexe récepteur permettant de transmettre ces messages intracellulaires n'est pas totalement élucidé. Cependant, des travaux récents montrent que ce complexe récepteur est localisé au sein de « radeaux » lipidiques (« Rafts ») et que la clé du système semblerait résider dans l'activité

sialidase de la NEU1. En effet, la stimulation de fibroblastes dermiques par des PDE est capable d'entraîner la libération d'acide sialique et la formation de lactosyl céramide (LacCer) à partir d'un glycoconjugué lipidique, le GM3, qui est un substrat préférentiel de la NEU1. Ce mécanisme est inhibé en présence de lactose [Duca, thèse d'université, 2004].

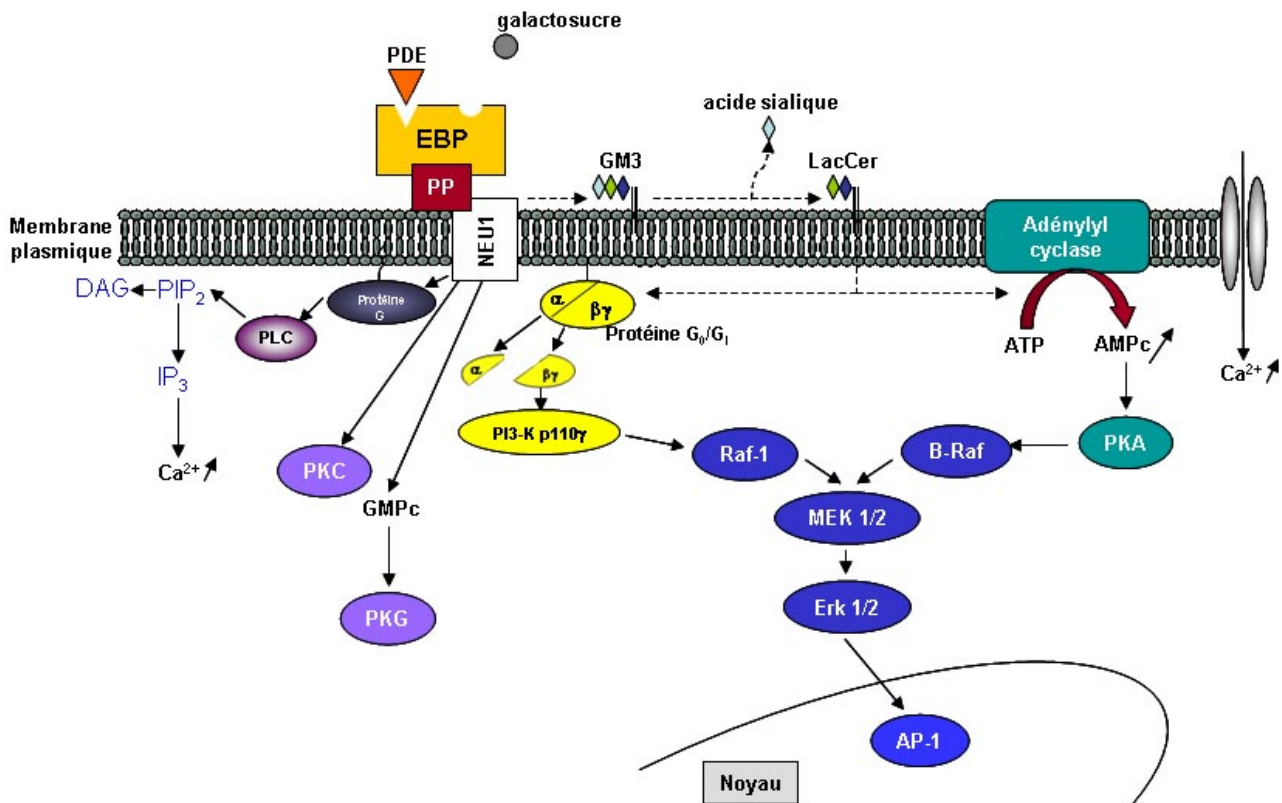


Schéma 28 : Résumé des données de la littérature concernant les voies de signalisation induites par le complexe récepteur de l'élastine.

But du Travail

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Dermatologie de l'UFR Médecine de Reims, appartenant à l'UMR CNRS 6198 « Matrice Extracellulaire et Régulation Cellulaire » d'une part ; et le Laboratoire d'Immunologie, Virologie et Bactériologie de l'UFR Pharmacie de Reims, appartenant à l'EA 3796, IPCM, d'autre part. Ces deux laboratoires travaillent sur une thématique commune dans le cadre d'un projet de l'IFR-53 concernant l'importance de la dégradation de la matrice extra-cellulaire sur la relation inflammation-cancer.

Lors de travaux précédents réalisés dans le laboratoire de dermatologie portant sur « l'implication des métalloprotéinases matricielles-1 et -2 dans l'invasion du mélanome : régulation par le collagène de type I et les peptides d'élastine » [Ntayi, Thèse d'Université, 2003], il a pu être montré :

- ☞ Que le processus d'invasion intradermique du mélanome engendre une élastolyse au niveau du front de migration du mélanome libérant de nombreux peptides d'élastine bioactifs.
- ☞ Que les peptides d'élastine potentialisent l'invasion *in vitro* des cellules de mélanome, dans une matrice tridimensionnelle de collagène de type I, en augmentant préférentiellement l'activation de la MMP-2.
- ☞ Que des lymphocytes T sont présents en périphérie et au sein de la tumeur de mélanome (collaboration avec A.L. Labrousse).

Notre but a consisté à poursuivre ces travaux en étudiant la régulation des cytokines par les peptides d'élastine et leur rôle dans la réaction inflammatoire liée au mélanome. Pour cela nous avons procédé en plusieurs étapes :

- ☞ Nous avons d'abord analysé l'influence des peptides d'élastine sur la régulation de l'IL-1 β , une cytokine décrite comme étant impliquée dans les mécanismes d'invasion tumorale, dans les cellules de mélanome.
- ☞ Parallèlement nous avons étudié l'influence des peptides d'élastine sur la polarisation Th1/Th2 des lymphocytes T, une étape de différenciation souvent défailante dans les processus d'immunité anti-cancéreuse.
- ☞ Enfin, nous avons initié une étude visant à conjuguer nos résultats obtenus sur les cellules de mélanome et les lymphocytes.

MATERIELS ET METHODES

Bien que les matériels et méthodes soient décrits dans les différents articles, les contraintes éditoriales du journal *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* ne permettaient pas d'établir un protocole détaillé de chaque expérimentation. C'est pourquoi nous nous proposons ici de revenir sur les techniques utilisées dans cette étude ainsi que celles employées dans la troisième partie consacrée aux résultats complémentaires.

1. Préparation de la kappa-élastine (κ -élastine)

L'élastine fibreuse insoluble extraite du ligament de la nuque de bœuf peut être solubilisée par la potasse en milieu éthanolique ; cette méthode d'hydrolyse génère des peptides d'élastine solubles en milieu aqueux appelés κ -élastine.

Le ligament (1 g) est mis en solution dans 100 ml d'un mélange éthanol-eau 80/20 (v/v) contenant de la potasse 1M. Le mélange est agité pendant 1 h à 37°C. Cette température favorise la solubilisation de l'élastine. Le surnageant est récupéré par centrifugation à 12500 g pendant 10 min à 4°C. Le culot d'élastine fibreuse non hydrolysée est soumis à un nouveau cycle d'hydrolyse organo-alcaline avec une nouvelle solution éthanol-eau 80/20 (v/v) contenant de la potasse 1M. Toutes les heures, le surnageant obtenu est neutralisé par de l'acide perchlorique puis décanté pendant la nuit à 4°C. Après centrifugation, les sels de perchlorate formés qui ont sédimenté au fond du tube sont éliminés. Le surnageant contenant la κ -élastine est dialysé contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

Les peptides ainsi générés présentent une grande hétérogénéité de masse moléculaire. Ils sont fractionnés en fonction de leur masse moléculaire par chromatographie d'exclusion-diffusion (gel de Séphadex G-100). La fraction homogène majoritaire de masse moléculaire de 75 kDa a été retenue pour nos différentes expérimentations.

2. Isolement des lymphocytes à partir du sang veineux de donneurs sains

Le sang veineux est obtenu à partir de donneurs sains séronégatifs pour le VIH-1, le VIH-2, le virus de l'hépatite B et C, et pour les virus HTLV.

2.1. Elutriation à contre-courant

L'élutriation est réalisée à l'aide d'un élutrieur Beckman J6-MC (Beckman Coulter, USA). Le tampon d'élutriation est une solution de chlorure de sodium complétée de 1 % d'albumine sérique humaine afin d'éviter l'adhérence des différentes populations cellulaires dans le circuit d'élutriation. Le débit du tampon est ajusté à 40 ml/min. Le sang (poche de cytophérèse de 220 ml) est introduit dans la chambre d'élutriation à un gradient de force allant de 1000 g à l'entrée de la chambre à 1500 g à la sortie de la chambre (schéma 29). Une première fraction contenant des plaquettes, des hématies et des débris cellulaires est récoltée. La vitesse de rotation est alors diminuée parallèlement au débit du tampon d'élutriation permettant ainsi de replacer les cellules de la chambre à l'opposé de la sortie et évite une perte de cellule liée à la décélération. Une fois la vitesse baissée à la valeur désirée, le débit est réajusté à 40 ml/min et la seconde fraction est récoltée. Pour chaque fraction récupérée, un comptage (automate Channelyseur C-100 – Coultronics, USA), un spectre de taille cellulaire et une formule leucocytaire (Multisizer VCS Coulter – Coultronics, USA) sont réalisés. La fraction d'élutriation contenant les cellules nécessaires à notre étude est la seconde. Cette technique permet d'isoler les lymphocytes du sang périphérique avec un rendement de l'ordre de 85 % et une pureté supérieur à 95 %. Cependant la fraction lymphocytaire est toujours contaminée par 2 à 5 % de monocytes. En outre, compte tenu de la grande quantité d'hématies présentes, il est nécessaire de les éliminer par la technique au Ficoll.

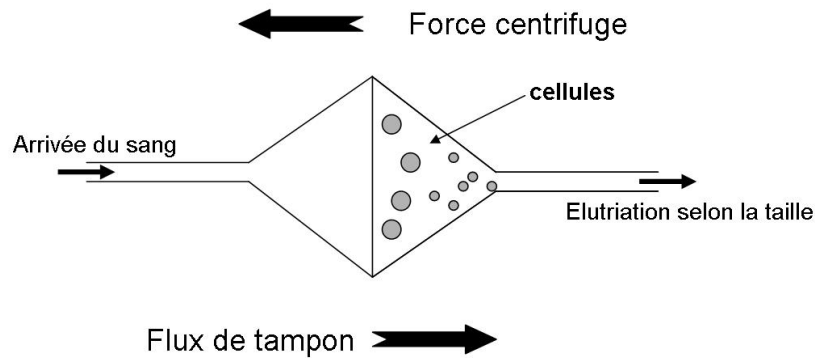


Schéma 29 : Schématisation du principe d'élutriation

2.2. Elimination des hématies par gradient de densité

30 ml de la deuxième fraction d'élutriation sont déposés sur un coussin de 15 ml de Ficoll (Lymphoprep ©). Le Ficoll est une solution de viscosité et de densité déterminées ($d=1,077$) qui permet une séparation des cellules mononucléées en une seule étape. Le mélange cellules / Ficoll est centrifugé à 900 g pendant 25 min permettant l'obtention d'un anneau lymphocytaire. Cet anneau, situé à la surface du coussin de Ficoll, est prélevé par aspiration et lavé dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) par centrifugation à 400 g pendant 10 min.

3. Culture cellulaire

3.1. Mise au repos

Une fois les lymphocytes isolés, un comptage est effectué sur la cellule de Malassez puis les lymphocytes sont placés dans des flasques ou des plaques de culture adéquates à la concentration de 10^6 cellules / ml à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé est composé de milieu RPMI 1640 complémenté de L-glutamine (300 µg/ml), pénicilline (100 U/ml), streptomycine (50 µg/ml) et sérum de veau fœtal (SVF) à 10% (Invitrogen).

Dans la mesure où nous avons étudié une voie de signalisation intracellulaire, les cellules sont mises au repos en absence de SVF pendant les 16 heures précédant la stimulation. L'absence de facteur de croissance permet d'une part

d'éteindre les voies de signalisation, et d'autre part de synchroniser les cellules au même stade du cycle cellulaire rendant plus coordonnée la stimulation par un agoniste.

3.2. Stimulation des lymphocytes

Après la mise au repos, les cellules sont récoltées et lavées avec du milieu RPMI 1640 thermostaté à 37°C par centrifugation à 400 g pendant 10 min. Cette étape permet notamment d'éliminer les monocytes contaminant puisque ces cellules auront adhéré au plastique pendant la mise au repos alors que les lymphocytes restent en suspension. Les lymphocytes sont ensuite stimulés pendant différentes périodes avec de la κ -élastine à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$. Pour les expériences faisant appel au marquage intracytoplasmique des cytokines, les cellules sont incubées pendant 4 heures avec les différents agonistes (κ -élastine 10 $\mu\text{g/ml}$; phytohémagglutinine A (PHA) 10 $\mu\text{g/ml}$; rhIL-4 ; rhIL-12) en présence de bréfeldine A (BFA) à 10 $\mu\text{g/ml}$. La BFA permet d'inhiber la sécrétion des protéines néosynthétisées en bloquant la transition du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. Cette drogue perdant son effet après 4 heures, elle est donc le facteur limitant les périodes d'incubation. Pour les autres analyses, les lymphocytes sont stimulés pendant 24 heures.

4. Immunomarquage fluorescent des lymphocytes T

4.1. Anticorps et élastine couplés à des fluorochromes

Réactif	Concentration finale (µg/ml)	Fluorochrome	Provenance
Mouse $\gamma 1$	2,5	PerCP	BD Pharmingen
Mouse IgG ₁ , κ	2,5	FITC	BD Pharmingen
Mouse IgG _{2a} , κ	2,5	APC	BD Pharmingen
Anti-CD3	2,5	PerCP	BD Pharmingen
Anti-CD4	2,5	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD69	2,5	APC	BD Pharmingen
Anti-IL-2	1	APC	BD Pharmingen
Anti-IL-5	1	APC	BD Pharmingen
Anti-IL-10	1	APC	BD Pharmingen
Anti-IFN γ	1	APC	BD Pharmingen
Elastine	10	FITC	Elastin Product Company
Anti-S-gal	10	Ø	Neosystem

Tableau 9 : Anticorps et réactifs couplés à des fluorochromes utilisés pour les analyses de marquages membranaires et intracytoplasmiques. APC : Allophycocyanine ; FITC : Fluorescein isothiocyanate ; PerCP : Peridinin-chlorophyll-protein complex.

4.2. Marquage membranaire des lymphocytes T CD3⁺CD4⁺

Afin d'isoler la population lymphocytaire T CD4⁺ au sein de la fraction lymphocytaire d'élutriation, nous avons réalisé un double marquage en présence des anticorps monoclonaux anti-CD3-PE et anti-CD4-FITC. Le marqueur CD3 est présent sur tous les lymphocytes et permet d'exclure les quelques cellules contaminantes résiduelles. Le marqueur CD4 permet au sein de la population lymphocytaire de discriminer les cellules T CD4⁺ des cellules T CD8⁺.

Dans cette étude nous avons également mis en évidence le marqueur CD69, exprimé transitoirement à la surface cellulaire lorsque le lymphocyte est activé. La présence du récepteur de l'élastine, EBP (S-gal), a pu être démontré à l'aide d'un anticorps anti-S-gal bloquant la fixation d'élastine marquée au FITC.

Pour les différents marquages membranaires, 10⁶ cellules, traitées ou non par les divers agonistes, ont été incubées avec les anticorps ou l'élastine couplés à leurs fluorochromes respectifs selon les préconisations fournies par Becton Dickinson. Après

une incubation de 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées 3 fois avec une solution saline, *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1x (Invitrogen), par centrifugation à 400 g pendant 10 min à 4°C.

4.3. Marquage intracytoplasmique des cytokines

Pour permettre le marquage à l'intérieur du cytoplasme, les cellules subissent une étape de perméabilisation membranaire rendant les cytokines accessibles à leur anticorps fluorescent spécifique. Cependant, afin d'optimiser la perméabilisation, les cellules sont incubées préalablement à l'abri de la lumière et à température ambiante avec 2 ml d'une solution *FACS lysing 1x* (Becton Dickinson). Cette solution permet la fixation des épitopes membranaires. Après 10 min d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois en PBS 1x par centrifugation à 400 g pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est alors repris par 500 µl d'une solution *FACS permeabilizing 1x* (Becton Dickinson) pendant 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec de la PBS 1x par centrifugation à 400 g pendant 10 min et à 4°C.

Le culot cellulaire préalablement perméabilisé est mis en contact avec les différents anticorps monoclonaux fluorescents pendant 30 min, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après 3 lavages en PBS 1x par centrifugation à 400 g pendant 10 min à 4°C, le culot cellulaire marqué est repris par 500 µl d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 1 % dans de la PBS 1x. La PFA permet une meilleure stabilité de la fluorescence lorsque l'analyse au cytomètre n'est pas effectuée le jour même.

4.4. Principe d'analyse par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant la mesure simultanée des différentes caractéristiques d'une cellule isolée entraînée par un flux liquide. Il s'agit d'un procédé multiparamétrique qui peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements à la seconde. Ces mesures sont effectuées au moment où les cellules passent devant une chambre d'analyse traversée par une source lumineuse excitatrice. Le cytomètre utilisé dans notre étude est un FACSCalibur (Becton Dickinson Instruments) qui possède 2 sources d'excitation : une source laser bleue ($\lambda=488$ nm) et une diode laser rouge ($\lambda=655$ nm). Le cytomètre permet d'obtenir 3

types d'informations : d'une part il nous renseigne sur la taille relative de la cellule (Forward Scatter – FSC) qui est évaluée à partir de la diffraction aux petits angles de la lumière incidente ; d'autre part sur la granularité relative de la cellule (Side Scatter – SSC) c'est-à-dire sur son niveau de complexité interne qui est appréciée à partir de la diffraction aux grands angles de la lumière incidente ; et enfin sur l'intensité de fluorescence relative de la cellule qui est obtenue après excitation (illumination) de fluorochromes et réémission de photons d'une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière incidente. Chacune des informations apportées par le cytomètre consiste donc en l'émission, par la cellule excitée, de signaux optiques qui sont récupérés par différents détecteurs (photodiode, photomultiplicateurs) avant d'être convertis en signaux électroniques puis analogiques.

5. Analyse par western-blot

5.1. Obtention d'extraits cellulaires

Après la stimulation, les cellules (10^6) sont centrifugées à 400 g pendant 10 min à 4°C puis sont lavées 3 fois par ajout de PBS 1x glacé contenant 50 μ M de Na_3VO_4 . Le culot cellulaire est ensuite repris dans du tampon de lyse (PBS pH 7,4 ; 0,5 % (v/v) Triton X-100 ; 80 mM β -glycérophosphate ; 50 mM EGTA ; 15 mM MgCl_2 ; 1 mM Na_3VO_4 et un mélange d'inhibiteurs de protéases dilué au 1/1000^{ème} provenant de chez Sigma (réf. P8340)). Les lymphocytes sont ensuite soumis à sonication 3 fois 10 sec dans ce tampon et placés à 4°C pendant 20 min. Le matériel insoluble est mis de côté par centrifugation à 20 000 g pendant 30 min et à 4°C et sera utilisé pour la détection de S-gal. Le surnageant est quant à lui transféré dans un tube neuf.

5.2. Western-blot (immunodétection des protéines)

Les extraits cellulaires sont soumis à un dosage de protéines (kit de dosage Pierce (distribué par Interchim, Montluçon, France) basé sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique, ou BCA). Une quantité égale de protéines est diluée dans du tampon échantillon 5 x (0,5 M Tris/HCl pH 6,8 ; 0,5 % Bleu de Bromophénol (p/v) ; 10 % SDS (p/v) ; 20 % saccharose (p/v) ; 25 % β -mercaptoéthanol (v/v)).

Les échantillons protéiques sont ensuite chauffés 5 min à 100°C et analysés par SDS-PAGE. La migration s'effectue une nuit sous une tension constante de 50V dans un tampon de migration (25 mM Tris pH 8,3 ; 192 mM glycine ; 0,1% de SDS (p/v)). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert Bio-Rad (Marne la Vallée, France). Le transfert est effectué dans un tampon de transfert (20 mM Tris ; 150 mM glycine ; 20 % méthanol (v/v)) pendant 1h30, sous une tension constante de 70 V et à 4°C. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration pendant 5 min de la membrane avec une solution de rouge ponceau S 0,2% (p/v) dans de l'acide trichloroactétique 3 % (p/v) dilué dans de l'eau distillée, permettant de visualiser les protéines. La membrane est ensuite saturée pendant 1 h à température ambiante dans une solution de blocage composée de 5 % (p/v) de lait non gras dilué dans du TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 0.1 % Tween 20 (v/v)). Les anticorps primaires sont incubés toute la nuit à 4°C sous agitation dans la solution de blocage à la concentration optimale d'utilisation de l'anticorps.

Le lendemain, après 3 lavages de 5 min au TBST, la membrane est incubée une heure à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase adapté à l'anticorps primaire dilué dans du lait à 5 % (p/v) avec du TBST. Après 3 lavages de 5 min au TBST suivis de 2 lavages de 10 min au TBS (50 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 150 mM de NaCl), les protéines sont révélées par chimiluminescence (kit ECL, Amersham Biosciences, Saclay, France).

Lorsque cela est nécessaire, les anticorps sont découplés de la membrane par incubation à 55°C pendant 30 min dans une solution composée de 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7 ; 2 % SDS (p/v) et 100 mM β -mercaptoéthanol. 5 lavages de 1h avec du TBST contenant 0,02 % NaN_3 (p/v) permettent d'éliminer le β -mercaptoéthanol. La membrane est ensuite saturée avec la solution de blocage et incubée avec les anticorps selon le protocole décrit précédemment.

Anticorps	Caractéristiques
Anti-phospho Erk ½ (T202/Y204)	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique phospho T202/Y204 correspondant aux résidus trouvés à proximité de T202/Y204 de Erk ½ humaine (Cell Signaling). Détecte les formes actives de Erk1 et Erk2.
Anti-Erk ½	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique dérivé de la séquence de Erk2 de rat (Cell Signaling). Détecte les formes totales de Erk ½.
Anti-S-gal	Anticorps polyclonal de lapin produit par immunisation avec un peptide synthétique correspondant à 14 résidus de la séquence de 32 acides aminés spécifique de S-gal (Néosystem).
Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase	Anticorps secondaire permettant la détection en électro-chimi-luminescence (Amersham).

Tableau 10 : *Anticorps utilisés en western-blot.*

6. Analyse par EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

6.1. Extraction des protéines nucléaires

Après stimulation, les cellules ($2 \cdot 10^6$) sont lavées 3 fois avec du PBS glacé contenant $50 \mu\text{M Na}_3\text{VO}_4$ par centrifugation à 400 g pendant 10 min et à 4°C . Après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans 0,4 ml de tampon A (10 mM Hépès (pH 7,8) ; 10 mM KCl ; 2 mM MgCl_2 ; 0,1 mM EDTA ; 0,2 mM NaF) contenant le mélange d'inhibiteurs de protéases cité et 1 mM Na_3VO_4 . Après incubation pendant 15 min dans la glace, 25 μl de tampon B (10 % Nonidet P40 (v/v) dans de l'eau distillée stérile) sont ajoutés afin de rompre la membrane plasmique. Le mélange est homogénéisé pendant 15 secondes. Après centrifugation à 10000 g pendant 30 sec à 4°C , le surnageant est congelé à -80°C et le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 50 μl de tampon C (50 mM Hépès (pH 7,8), 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10 % (v/v) glycérol, 0,2 mM NaF) contenant des inhibiteurs de protéases et 1 mM Na_3VO_4 . Après 20 min d'incubation en homogénéisant toutes les 5 min et centrifugation à 10000 g pendant 5 min et à 4°C , le surnageant contenant les protéines nucléaires est collecté et conservé à -80°C avant analyse.

6.2. Gel-shift (ou retard sur gel)

Tous les réactifs utilisés ont été achetés chez Promega (Charbonnières, France). Cette technique permet d'étudier l'activation de facteurs de transcription en mettant en évidence leur liaison à l'ADN. Pour cela, une sonde d'ADN double brin correspondant au site consensus de liaison à l'ADN du facteur de transcription étudié est synthétisée et diluée à une concentration de 1,75 pmoles/ μ l dans de l'eau distillée stérile contenant du diéthylpyrocarbonate 0,2 % (v/v) (DEPC, un inhibiteur de DNase). Cette sonde est marquée avec du phosphore radioactif à son extrémité 5' en utilisant la T4-polynucléotide kinase en présence d' ATP[γ - 32 P]. Dans le cas des facteurs de transcription de la famille AP-1, l'oligonucléotide utilisé est 5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'. Et pour NF- κ B : 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3'. Le marquage s'effectue dans 10 μ l : 3,5 pmoles de cette sonde sont mis en présence de 1 μ l de T4-polynucléotide kinase (10 000 U/ml), de 10 μ Ci d' ATP[γ - 32 P], de 1 μ l de tampon de réaction 10 x, et de 5 μ l d'H₂O DEPC. La réaction est effectuée pendant 10 min à 37°C puis est stoppée par ajout de 0,5 μ l d'EDTA 0,5M. Le milieu réactionnel est ensuite dilué en ajoutant 45 μ l de Tris-EDTA (Tris 10 mM pH 8 ; EDTA 1 mM). 2 μ g de protéines nucléaires sont incubés pendant 30 min à température ambiante dans un volume final de 20 μ l de tampon de liaison (4 μ l de tampon de liaison 5 x (50 mM Tris/HCl pH 7,5 ; 500 mM KCl ; 2,5 mM MgCl₂ ; 40 % glycérol (v/v)) ; 4 μ L de DTT 25 mM ; 0,1 μ l de polydIdC à 2 mg/ml ; 1 μ l de la sonde préparée précédemment ; qsp à 20 μ l avec H₂O DEPC). Les échantillons sont ensuite déposés sous tension (25 V) sur un gel de polyacrylamide 4 % contenant du TBE 0,5 x et la migration s'effectue dans du TBE 0,5 x. A la fin de la migration, le gel est séché puis les complexes ADN-protéines sont révélés par autoradiographie.

Dans les expériences de compétition permettant de déterminer la spécificité de liaison du facteur de transcription à l'ADN, un oligonucléotide froid double brin est mis en excès (100 fois) dans le tampon de liaison. Il est incubé 10 min à température ambiante puis la sonde radioactive est ajoutée dans les conditions précédemment décrites. Pour déterminer la spécificité de liaison de la sonde AP-1, un oligonucléotide différent est utilisé en plus de la sonde AP-1 froide. Il s'agit d'un oligonucléotide correspondant à la séquence consensus de liaison à l'ADN du facteur NF- κ B n'ayant pas la capacité de se lier aux facteurs de transcriptions AP-1.

Pour déterminer, la spécificité de liaison à la sonde NF- κ B, nous avons procédé à l'inverse.

7. Analyse zymographique

7.1. Préparation des milieux conditionnés

Pour l'obtention de milieux conditionnés, les lymphocytes (10^6) sont stimulés (κ E ou cytokines) pendant 24 heures puis centrifugés à 400 g pendant 10 min à 4°C. Les surnageants correspondant aux milieux de culture sont stockés à -80°C jusqu'à leur analyse.

7.2. Zymographie en gel de gélatine

Cette technique d'électrophorèse en gel-substrat permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire, et la détection des gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) présentes dans les milieux conditionnés. Un volume égal de milieu est dilué dans du tampon échantillon 5 x non réducteur (0,5 M Tris/HCl pH 6,8 ; 0,5 % Bleu de Bromophénol (p/v); 10 % SDS (p/v) ; 20 % saccharose (p/v)). Les échantillons sont ensuite analysés par SDS-PAGE contenant 0,1 % de gélatine (p/v). La migration s'effectue pendant 30 min sous une tension constante de 90 V dans un tampon de migration (25 mM Tris pH 8,3 ; 192 mM glycine ; 0,1% de SDS (p/v)) puis 1h30 à 140 V à 4°C. A l'issue de la migration, le gel est lavé 2 fois pendant 30 min dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (v/v). Ce détergent permet d'éliminer les traces de SDS. Le gel est alors mis à incuber une nuit à 37°C dans un tampon d'incubation (52 mM Tris/HCl pH 7,2 ; 200 mM NaCl, 5 mM $\text{CaCl}_2(2\text{H}_2\text{O})$) favorisant la protéolyse de la gélatine par les gélatinases initialement présentes dans le milieu de culture. Après incubation, le gel est coloré pendant 30 min dans une solution de bleu brillant G-250 de Coomassie (1 g dans un mélange (215 ml d'eau ; 250 ml d'éthanol ; 35 ml d'acide acétique)) et décoloré pendant 1 h dans la même solution sans bleu G-250. Les MMPs ayant une activité gélatinolytique laissent apparaître une plage de lyse blanche sur un fond bleu.

8. Analyse par ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Les sécrétions d'IL-2 et d'IFN γ par les lymphocytes stimulés pendant 24 heures sont analysées et quantifiées à partir des milieux conditionnés (voir chapitre 6.1) en utilisant des kit de dosage ELISA (R&D systems, Lille, France), dont le principe est celui d'un ELISA « double sandwich ». Les échantillons sont déposés dans des plaques 96-puits pré-coatés avec un anticorps monoclonal de capture correspondant. Après 2 heures d'incubation, les puits sont lavés 3 fois avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) (sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) à 2 % (p/v) dans de la PBS 1x. Un 2^{ème} anticorps polyclonal de détection couplé à la peroxydase est ensuite ajouté. Cet anticorps a pour fonction de détecter les protéines fixées sur le 1^{er} anticorps. Un complément de streptavidine est ajouté pour augmenter la sensibilité de la technique. La quantité de peroxydase-streptavidine fixée est déterminée par addition d'un substrat chromogénique, le tétraméthylbenzidine (TMB) (sigma), dont la dégradation par la peroxydase développe une coloration bleue. Cette réaction colorimétrique est stoppée par l'ajout d'acide sulfurique 2 M et la densité optique est lue à 450 nm par un spectrophotomètre. Les quantités d'IL-2 et d'IFN γ sont déterminées à l'aide d'une courbe standard réalisée à partir de gammes étalons.

9. Analyse en RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction)

9.1. Préparation des ARN

Après les stimulations, les lymphocytes ($2 \cdot 10^6$) sont lavés 3 fois avec de la PBS 1x par centrifugation à 400 g pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite lysé avec du Trizol (Invitrogen). Le lysat cellulaire est complété avec du chloroforme (200 μ l/ml de Trizol) puis centrifugé 15 min à 12000 g et à 4°C. La phase supérieure chloroformique contenant les ARN est transférée dans un nouveau tube. Les ARN sont ensuite précipité par l'ajout d'isopropanol absolu (500 μ l/ml de Trizol) pendant 10 min à température ambiante. Le précipité est centrifugé 10 min à 12000

g et à 4°C. Le culot d'ARN est ensuite lavé avec de l'éthanol 75 % (v/v), dilué dans de l'eau DEPC, et centrifugé à 7500 g pendant 5 min à 4°C. Le culot est brièvement séché à l'air libre pour évaporer les traces d'éthanol, puis repris dans 40 µl d'eau DEPC. La quantité d'ARN extraite ainsi que sa pureté sont évalués en mesurant l'absorbance de la solution à 260 nm et à 280 nm. Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 40 µg/ml d'ARN simple brin. Enfin les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à la transcription inverse.

9.2. Transcription inverse

La transcription inverse de l'ARNm en ADNc est effectuée sur 1 µg d'ARN total comme suit :

ARN	13 µl
Oligo(dT) (0,5 mg/ml)	1 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Tampon 5x	4 µl
RT M-MLV (200 U/µl)	1 µl

Les différents réactifs proviennent de chez Promega. Le mélange ARN+Oligo(dT) est incubé 3 min à 65°C puis refroidi 2 min dans la glace. Les autres réactifs sont ensuite ajoutés et le tout est incubé 1 heure à 37°C. En fin de transcription inverse, les ADNc sont dilués au 1/10^{ème} et 10 µl seront utilisés pour chaque PCR.

9.3. PCR

Les fragments d'ADNc sont amplifiés par PCR dans le tampon suivant (les réactifs proviennent de chez Invitrogen) :

Tampon Taq polymérase 10x	2,5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µl
DMSO	1,25 µl
W-1%	1,125 µl
Amorces (10 pmol/µl)	1 µl de chaque amorce (5' + 3')
ADNc	10 µl
Taq DNA polymérase	0,2 µl (soit 1 U)
Eau	QSP 25 µl

Les séquences des amorces ainsi que leurs températures d'hybridation et le nombre de cycle effectués sont répertoriés dans le tableau 11

Un cycle PCR comprend :	Dénaturation	95°C	1 min
	Hybridation	en fonction des amorces	1 min
	Elongation	72°C	1 min

Après une élongation finale de 5 min à 72°C, les produits de PCR sont additionnés d'un tampon de charge, puis déposés sur un gel d'agarose (invitrogen) à 1,5 % complété en bromure d'éthidium, un agent intercalent fluorescent sous UV. La migration se fait dans un tampon TBE 0,5x (45 mM Tris-Borate pH8, 1 mM EDTA) pendant 35 min à 90 V.

Gène	Séquences des oligonucléotides	Température	Nombre de cycles
18S	S 5'-GCGAATTCCTGCCAGTAGCATATGCTTG-3' AS 5'-GGAAGCTTAGAGGAGCGAGCGACCAAAGG-3'	55 – 65°C	21
IL-2	S 5'-AACTCCTGTCTTGCAATTGCACTA-3' AS 5'-TTGCTGATTAAGTCCCTGGG-3'	55°C	32
IFN γ	S 5'-AGTTATATCTTGGCTTTTCA-3' AS 5'-ACCGAATAATTAGTCAGCTT-3'	55°C	32
β -Gal	S 5'-TGGAAGGACCGGCTGCTGAA-3' AS 5'-GGAGAGGCTTCATCTTGGG-3'	65°C	35
IL-1 β	S 5'-TACGAATCTCCGACCACCACTACAG-3' AS 5'-GTACAGGTGCATCGTGACATAAGC-3'	65°C	32
GRO α	S 5'-ACTGAACTGCGCTGCCAGTG-3' AS 5'-GGCATGTTGCAGGCTTCCTCA-3'	62°C	32
IL-8	S 5'-ATTTCTGCAGCTCTGTGTGAA-3' AS 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA-3'	62°C	32

Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés pour les analyses en PCR

10. Analyse statistique des résultats obtenus

Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne des données obtenues à partir de trois expériences indépendantes au minimum. Les valeurs moyennes sont exprimées avec l'écart standard à la moyenne (SEM). Le test de Student a été utilisé pour l'étude statistique des résultats obtenus (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Les images montrées sont représentatives des triplicatas obtenus.

RESULTATS

1^{ère} partie : induction de la production d'IL-1 β par les peptides d'élastine dans les cellules de mélanome

Des études antérieures réalisées au laboratoire de dermatologie ont permis de mettre en évidence une dégradation importante de la composante élastique du derme au niveau du front d'invasion de la tumeur de mélanome. Cette dégradation engendre la libération de fragments d'élastine capables de se fixer sur leurs récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules de mélanome et ainsi d'induire la synthèse accrue de protéases matricielles telles que les MMP-2 et MMP-14 [Ntayi et coll., 2004]. La MMP-2 a pour substrat préférentiel la gélatine, mais peut également cliver et activer d'autres composés comme l'IL-1 β [Schonbeck et coll., 1998]. Cette cytokine pro-inflammatoire qui se trouve sous sa forme inactive (pro-IL-1 β) dans le cytoplasme des cellules, est généralement activée avant sa sécrétion. Cependant, de grandes quantités de pro-IL-1 β sont libérées au cours du mécanisme d'apoptose des cellules de mélanome [Wang et coll., 2005]. Les enzymes matricielles telles que la MMP-2, capables d'activer la pro-IL-1 β en IL-1 β dans le milieu extracellulaire, pourraient donc avoir un rôle important dans l'activation de l'IL-1 β dans les mécanismes favorisant la progression tumorale.

Sachant que les PDE activent la synthèse de la MMP-2, nous avons étudié l'influence de ces peptides d'élastine sur la production de l'IL-1 β dans deux lignées de mélanome à caractères invasifs différents, et leur rôle sur l'activation des voies de signalisation impliquées dans ce mécanisme. Cette étude est actuellement soumise pour publication dans *Journal of Investigative Dermatology* sous l'intitulé : « Elastin Fragments Induce IL-1 β up-regulation via NF- κ B Pathway in Melanoma Cells ».

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

1/ Les PDE induisent une surproduction d'IL-1 β aux niveaux protéique et transcriptionnel dans la lignée la plus invasive (M₃Da). Cet effet n'est pas retrouvé dans la lignée la moins invasive (M₁Dor) alors même que le récepteur (S-gal) est présent à la surface des deux types cellulaires.

2/ La régulation positive de l'expression du transcrit de l'IL-1 β induite par les PDE est dépendante de l'interaction spécifique avec leur récepteur membranaire (S-gal). Cet effet est démontré d'une part, en mimant les effets des PDE par le peptide VGVAPG, qui est la séquence minimale et spécifique permettant la liaison de l'élastine à son récepteur ; et d'autre part, en inhibant les effets des PDE sur l'expression de l'IL-1 β en utilisant le lactose, un galactosucrose qui s'oppose à la fixation des PDE à leur récepteur.

3/ Les PDE activent les voies de signalisation MAPK (Erk 1/2 et p38) ainsi que le facteur de transcription AP-1 dans les cellules M₃Da. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de ces voies montre que ces activations ne sont pas associées à l'augmentation de l'expression de l'IL-1 β induite par les PDE dans ces cellules.

4/ La voie NF- κ B est activée et impliquée dans les effets des PDE sur l'expression de l'IL-1 β dans les cellules M₃Da. L'inhibition de cette voie, soit par un inhibiteur peptidique (SN-50), soit par la sur-expression d'un inhibiteur endogène (I κ B), a pour conséquence une inhibition totale de l'augmentation d'expression de l'IL-1 β induite par les PDE.

5/ Les expériences de fixations comparatives sur l'élément distal du promoteur de l'IL-1 β montrent une fixation préférentielle de NF- κ B par rapport à AP-1, et confirment l'effet prédominant de la voie NF- κ B dans la surexpression de l'IL-1 β induite par les PDE.

**Elastin Fragments Induce IL-1 β up-regulation via NF- κ B Pathway in
Melanoma Cells**

Romain Debret,^{†‡} Richard Le Naour,[‡] Jean-Michel Sallenave,* William Hornebeck,[†]
Moncef Guenounou, [‡] Philippe Bernard,[†] and Frank Antonicelli[†]

[†]Department of Dermatology, CNRS UMR 6198 Faculty of Medicine and [‡]Department of Immunology, Virology and Bacteriology, IPCM, EA 3796, Faculty of Pharmacy, IFR 53 Biomolecules, University of Reims, Champagne-Ardenne, France. *Rayne Laboratories, Medical School, The University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

Corresponding Author : Frank Antonicelli, PhD

Laboratoire de Recherche en Dermatologie - UFR Médecine

51, rue Cognacq Jay

F-51095 Reims Cedex

e-Mail : frank.antonicelli@univ-reims.fr

Phone : +33 3 26 91 81 53 Fax : +33 3 26 91 35 24

Short Title: Elastin-induced IL-1 β in melanoma cells

Abbreviations: AP-1, activator protein-1; ChIP, chromatin immuno-precipitation; ECM, extracellular matrix; EFs, elastin fragments; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; Erk 1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; IL-1 β , interleukin-1 β ; I κ B, inhibitor κ B; MAPK, mitogen activated protein kinase; MMPs, matrix metalloproteinases; NF- κ B, nuclear factor- κ B; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; S-Gal, Spliced-Galactosidase; Th-1 / Th-2, T helper type-1 / T helper type-2

Key words: melanoma, IL-1 β , elastin fragments, NF- κ B

Abstract

In a previous work, we reported the influence of elastin fragments (EFs) on matrix metalloproteinases -2 and -14 expression and activation in melanoma cells *in vitro*. We hypothesized that EFs, might also modulate expression of other mediators involved during melanoma progression. In this study, we investigated the contribution of EFs on IL-1 β expression, a cytokine known for playing a key role in melanoma cells activation. Our results first evidenced that high tumorigenic melanoma cells (M₃Da cells) treated with Efs led to IL-1 β mRNA and protein up-regulation. The effects of EFs on M₃Da cells were found to be mediated by receptor (S-gal) occupancy, as being suppressed by lactose and reproduced by cell stimulation with the VGVAPG peptide. Binding of EFs to their receptor induced a rapid activation of Erk 1/2 and p38 MAP Kinase pathways. However, activation of these pathways was not associated with IL-1 β mRNA up-regulation by EFs. Concomitantly, we demonstrated that EFs stimulation induced NF- κ B nuclear translocation (Western blot) and DNA binding on IL-1 β promoter region (EMSA and ChIP techniques) whereas inhibition of NF- κ B with the specific chemical inhibitor SN-50 or by over-expression of I κ B, the endogenous inhibitor of NF- κ B pathway, totally abolished EFs-mediated IL-1 β mRNA over-expression. These results demonstrate that EFs induce NF- κ B activation, leading to IL-1 β up-regulation in invasive melanoma cells.

Introduction

Accumulating evidence suggests an association of chronic inflammation and tumour progression (Karin, 2005). Inflammatory mediators such as cytokines influence the ability of tumour cells to grow and metastasize in its microenvironment by modulating the expression of other cytokines/growth factors. Melanoma cells behaviour is particularly sensitive to inflammatory mediators because these tumour cells express and respond to a wide array of soluble factors (Lazar-Molnar *et al*, 2000). Among the numerous pro-inflammatory factors, interleukin-1 β (IL-1 β) is particularly implicated in melanoma progression. Most melanoma cells spontaneously produce this pleiotropic cytokine that has been shown to exacerbate invasiveness, adhesion, angiogenesis and metastases spreading in many experimental and *in vivo* models of melanomas (Dinarello, 1996). For instances, IL-1 β promotes metastases by activating cell adhesion on endothelial cells (Vidal-Vanaclocha *et al*, 1996; Yano *et al*, 2003), and modulates expression and activity of matrix metalloproteinases (MMPs) in stromal and tumour cells contributing to matrix degradation (Xie *et al*, 2003; Xie *et al*, 2004). It has been shown that IL-1 β induces its own expression through a positive autoregulatory loop implicating the recruitment of nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway (Hiscott *et al*, 1993). External stimuli also come from the tumour microenvironment. Some macromolecules from extracellular matrix (ECM) such as fibronectin, type I collagen, fibrin and laminin have been shown to induce IL-1 β gene transcription through mitogen-activated protein Kinases (MAPK) dependent mechanisms (Roman *et al*, 1999).

Molecules from ECM constitute a physical barrier that melanoma cells have to pass through by directional proteolysis processes (Hornebeck *et al*, 2002). ECM remodelling implicates many enzymes of which MMPs correlate to an invasive phenotype of melanoma *in vitro*, particularly MMP-2 expression is associated with architectural disorders and melanoma progression (Hofmann *et al*, 2005). In a previous study, we showed that invasive melanomas were accompanied with intense fragmentation of elastic fibres at their invasive fronts and that elastin fragments (EFs) upregulated melanoma cells invasiveness through MMP-2 activation

(Ntayi *et al*, 2004). EFs are considered as functional matrikines since they induce biological activities on numerous cell types through their cell surface receptor (Duca *et al*, 2004). The elastin complex receptor is composed of three sub-units of which the elastin binding protein, also named S-Gal (for spliced form of β -galactosidase), is a 59~67-kDa protein (Blood *et al*, 1988; Hinek, 1996; Yamamoto *et al*, 2002). S-Gal binds with high affinity the sequence VGVAPG that is repeated several times in human elastin. This receptor also possesses galactolectin properties, having the ability to fix β -galactosugars such as galactose or lactose resulting in S-Gal shedding from the cell surface; thus, preventing elastin binding (Hinek *et al*, 1988). The extracellular regulated kinase (Erk) $\frac{1}{2}$ MAP kinase pathway has been reported to be involved in EFs-induced proliferation of human arterial smooth muscle cells (Mochizuki *et al*, 2002) as well as in up-regulation of MMP-1 which also depends on the recruitment of the transcription factor activator protein-1 (AP-1) in human skin fibroblasts (Duca *et al*, 2002). In a recent study, we reported that EFs activate the Erk $\frac{1}{2}$ / AP-1 pathway in human blood lymphocytes, and we demonstrated that EFs induce T helper type-1 (Th-1) polarization of T-cells (Debret *et al*, 2005).

In this study, we examined EFs induced-signalling pathways in melanoma cells and demonstrated that following S-Gal occupancy, EFs induced NF- κ B DNA-binding and activation leading to IL-1 β up-regulation.

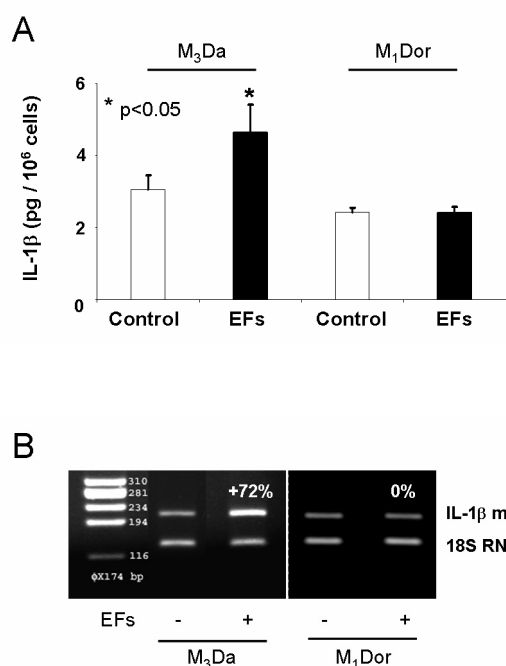


Figure 1
Influence of EFs on *in vitro* production and expression of IL-1 β . (A) The production of IL-1 β in melanoma cells cultured in serum-free medium with or without EFs (50 μ g/ml) was determined by ELISA. (B) IL-1 β mRNA expression was assessed by semi-quantitative PCR on cDNA obtained after reverse transcription of total RNAs from melanoma cells treated or not for 4 hours with EFs. ELISA data are mean $\pm$ SEM; *p<0.05.

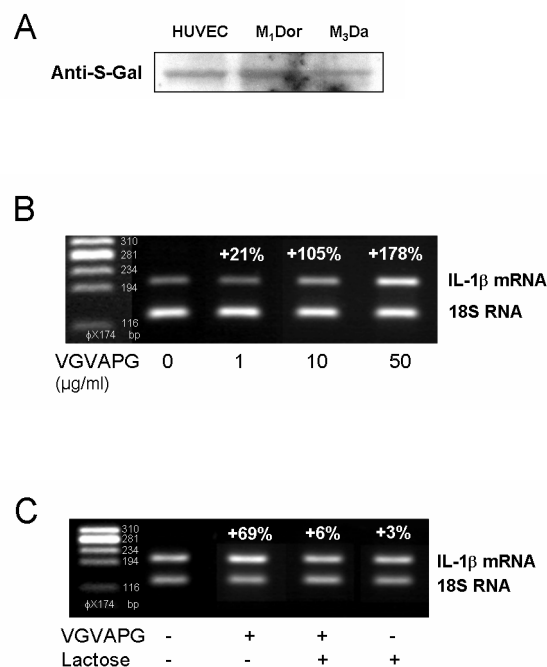


Figure 2
Positive regulation of IL-1b expression by EFs requires S-Gal binding. (A) Presence of S-Gal protein at the bosom of melanoma cells was assessed by western blot. HUVEC endothelial cells were used as positive control. (B) M3Da cells were stimulated with increasing doses of VGAPG for 4 hours before analysis of the IL-1 β mRNA expression by semi-quantitative RT-PCR. (C) The role of S-Gal in over-expression of IL-1 β mRNA in response to EFs was studied by preincubating M3Da cells for 1 hour with lactose (10 mM) prior stimulations with VGAPG (50 μ g/ml); total RNAs were then analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

Results

EFs increase IL-1 β production in invasive melanoma cells through its receptor (S-Gal).

Two melanoma cell lines, M₁Dor and M₃Da, presenting a low and a high tumorigenic pattern respectively, were assessed for their ability to express the cytokine IL-1 β . Basal and EFs-activated IL-1 β protein productions were investigated by ELISA. Both cell lines expressed basal level of IL-1 β protein (Fig1A). In invasive M₃Da melanoma cells, EFs treatment enhanced basal IL-1 β protein level by 52%, whereas M₁Dor cells did not respond to these peptides (Fig 1A). ELISA results were confirmed by Fluorescence-Activated Cell-Sorting (FACS) analyses (data not shown). In the two cell lines, RT-PCR analyses showed that IL-1 β mRNA level correlated with protein productions in basal and EFs-activated conditions (Fig 1B).

Presence of the elastin receptor (S-Gal) in both cell lines was demonstrated by western blot analyses using an antibody raised against the specific amino acid sequence differencing S-Gal, described as the sub-unit surface receptor, from β -Gal (Fig 2A). Endothelial cells (HUVEC) membrane extracts were used as positive control (Robinet *et al*, 2005). Implication of a receptor dependent transduction signal upon EFs stimulation was then addressed with the VGVAPG peptide, which is the minimal and specific elastin sequence binding on S-Gal. Figure 2B shows that treatment of M₃Da cells with VGVAPG reproduced EFs effects on IL-1 β mRNA in a dose dependent manner. In these conditions of stimulation, specificity of response was controlled using lactose, a galactosugar that binds and inhibits the S-Gal sub-unit. Cells pretreatment with lactose during 1 hour totally abolished the VGVAPG-enhanced IL-1 β mRNA expression in M₃Da cells, whereas treatment with lactose alone had no effect on the cytokine expression (Fig 2C).

Activation of MAP Kinases by EFs is not responsible of IL-1 β up-regulation.

In order to elucidate the mechanisms involved in EFs-induced IL-1 β over-expression in M₃Da cells, we analysed the activation of the MAP Kinase pathways which are known to be

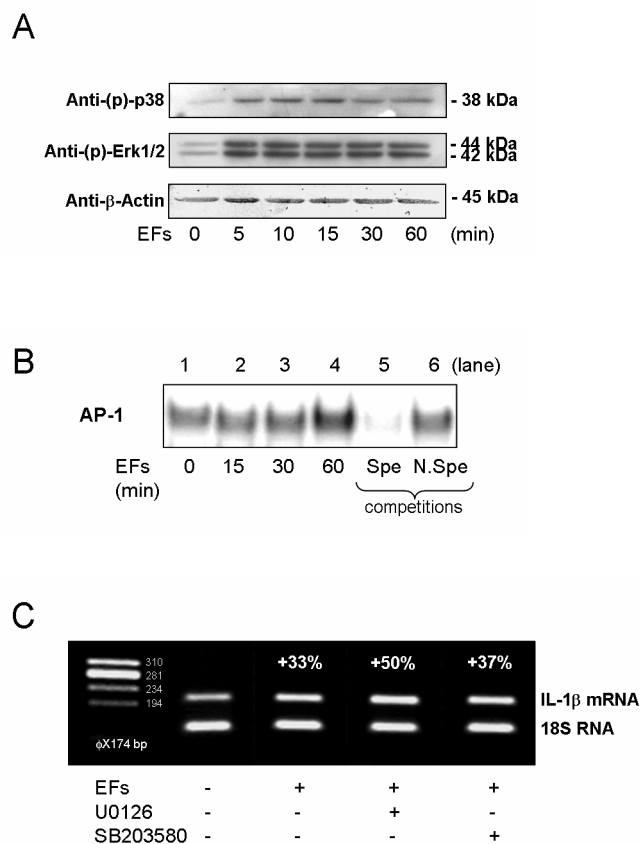


Figure 3
Regulation of MAP Kinase pathways and AP-1 DNA-binding by EFs and their consequences on IL-1 β mRNA expression in melanoma cells. (A) Cell lysates from melanoma cells treated by EFs for different durations were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, and activation of Erk1/2 and p38 were determined by western blot. (B) AP-1 DNA-binding activity from nuclear protein extracts of EFs-stimulated melanoma cells was assessed by EMSA. Specificity of DNA-binding was assessed by competitions using specific (lane 5) and non-specific (lane 6) unlabelled probes. (C) The role of MAP-Kinases recruitment by EFs in IL-1 β mRNA over-expression mechanism was studied by preincubating M3Da cells for 1 hour with U0126 (10 μ M) or SB203580 (5 μ M) prior 4 hours stimulations with EFs; total RNAs were then analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

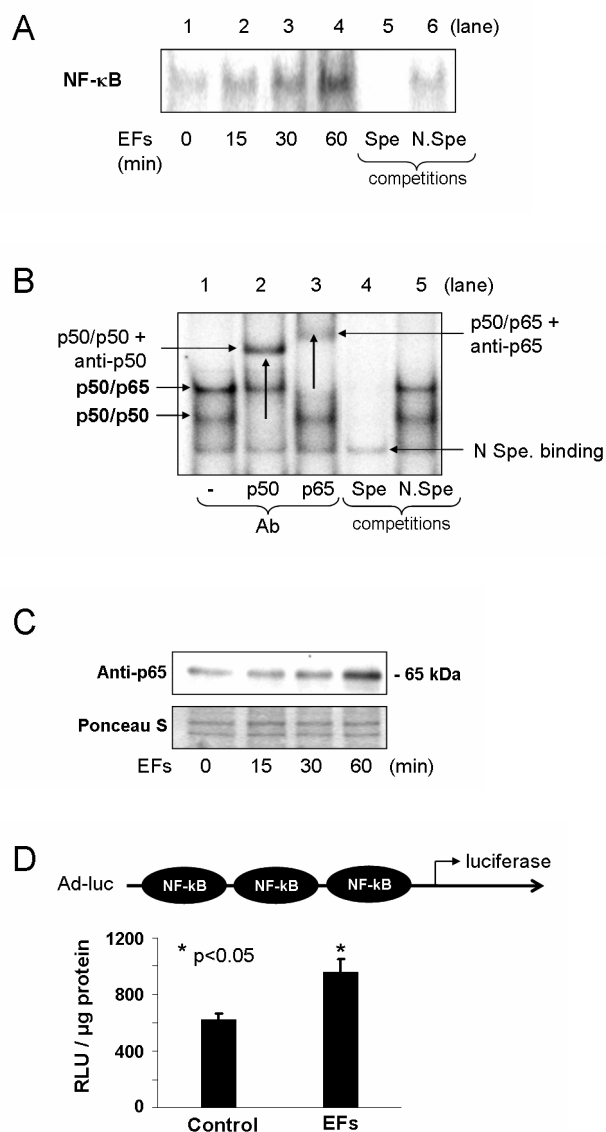


Figure 4
Activation of NF- κ B pathway by EFs in M3Da cells. (A) NF- κ B DNA-binding activity from nuclear protein extracts of EFs-stimulated melanoma cells was assessed by EMSA. Specificity of DNA-binding was assessed by competitions using specific (lane 5) and non-specific (lane 6) unlabelled probes. (B) Identification of NF- κ B complex present in the nucleus of M3Da cells was studied by super-shift assays where nuclear proteins were incubated or not with antibodies specific for p50 or p65 NF- κ B sub-units. (C) Nuclear protein extracts from M3Da cells stimulated by EFs for different durations were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis under reducing conditions, and presence of p65 was determined by western blot. (D) M3Da cells were infected by Ad-luc (100 PFU/cell) prior stimulations with EFs overnight; relative luciferase activity was measured with luminometer in presence of appropriate substrate. Data are mean $\pm$ SEM; *p<0.05.

recruited by matrix compounds for IL-1 β gene regulation. Investigation of MAP Kinases by western blot revealed that both Erk 1/2 and p38 Kinases were rapidly activated (within 5 minutes) in M₃Da cells under EFs treatments (Fig 3A). In line with these results, we examined the DNA-binding ability of the transcription factor AP-1 by gel shift assays since this promoter activator is dependent of MAP Kinases activation. Specificity of DNA-binding was addressed by gel shift competition using 50-fold excess of specific and non-specific unlabelled probes (lanes 5 and 6 respectively). This analysis shows that AP-1 DNA-binding was increased after a 1 hour stimulation period with EFs in M₃Da cells (Fig 3B).

The Erk1/2 and p38 transduction pathways was then assessed for their implication in the IL-1 β increased expression upon EFs stimulation. Inhibition of the Erk 1/2 and p38 pathways was performed by cell pre-incubation with the specific pharmacological inhibitors U0126 and SB203580 respectively for 1 hour prior to EFs stimulation. Figure 3C shows that both inhibitors failed to inhibit EFs effects on IL-1 β mRNA expression compared to control.

Effects of EFs on NF- κ B activation in melanoma cells.

Since both Erk 1/2 and p38 MAP Kinases pathways were not involved in EFs-increased IL-1 β expression, we investigated NF- κ B activation, which is another important signalling pathway involved in IL-1 β regulation. NF- κ B pathway activation was first investigated by Gel shift assays, performed with a consensus probe for NF- κ B DNA-binding (Fig 4A). Kinetics analysis revealed a time dependent increase of the active heterodimer p50/p65 DNA-binding in M₃Da cells in response to EFs stimulation. Specificity of DNA-binding was addressed by gel shift competition using 50-fold excess of specific and non-specific unlabelled probes (lanes 5 and 6 respectively). In order to confirm the nature of the NF- κ B complexes, we used antibodies for the p50 and p65 NF- κ B subunits in supershift assays (Fig 4B). We demonstrated that NF- κ B DNA-binding was related to both complexes p50/p50 and p50/p65 since both antibodies supershifted the NF- κ B bands (black arrows in lanes 2 and 3). To confirm this NF- κ B activation upon EFs stimulation, we next analysed the influence of EFs on

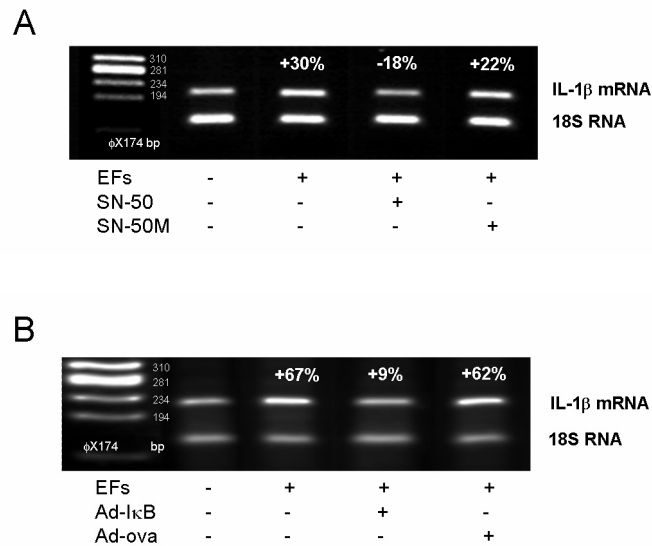


Figure 5

Influence of NF- κ B recruitment by EFs on IL-1 β mRNA expression. (A) M3Da cells were preincubated with cell-permeable peptides SN-50 (50 μ M) and SN-50M (50 μ M) for 1 hour prior 4 hours stimulations with EFs; total RNAs were then analyzed by semi-quantitative RT-PCR. (B) M3Da cells were infected with Ad-I κ B (100 PFU/cell) or Ad-ova (100 PFU/cell) prior 4 hours stimulations by EFs; total RNAs were then analyzed by semi-quantitative RT-PCR.

p65 (NF- κ B subunit) accumulation in the nucleus compartment of M₃Da cells. Western blot analyses showed an increase of the p65 entity under stimulated conditions (Fig 4C). To assess whether the induction of NF- κ B by EFs was efficient to induce gene expression, we infected M₃Da cells with an adenovirus (Ad-luc) containing the gene coding for luciferase under control of a chimerical promoter constituted of three NF- κ B sites in tandem repeats. The tandem repeats structure permits to raise the sensitivity of the detection and the luciferase gene construct is currently used as a reporter gene. Increase of luciferase activity in cells treated with EFs versus untreated cells (54%) demonstrated the biological activity of the NF- κ B DNA-binding complexes (Fig 4D).

NF- κ B Activation is implicated in IL-1 β up-regulation by EFs in M₃Da melanoma cells.

We next sought a relationship between EFs-induced NF- κ B and the effect of these peptides on IL-1 β upregulation. To that purpose, we first used a specific inhibitor (SN-50) of the translocation of the NF- κ B p50 subunit to the nucleus. Consequently to NF- κ B inhibition, EFs were unable to increase IL-1 β mRNA expression whereas the use of an inactive SN-50 mutant (SN-50M) did not affect EFs-increased IL-1 β mRNA (Fig 5A). To further demonstrate the implication of NF- κ B pathway in IL-1 β expression, cells were infected with an adenovirus over-expressing I κ B α (Ad-I κ B), a physiological NF- κ B inhibitor. The lack of EFs effects on IL-1 β mRNA expression in these conditions of inhibition compared to an adenovirus expressing a non-relevant protein (Ad-ova) used as a control, confirmed the relationship between NF- κ B activation and IL-1 β expression upon EFs stimulation in M₃Da cells (Fig 5B).

NF- κ B DNA-binding is increased during IL-1 β promoter activation by EFs.

To analyse a direct involvement of NF- κ B in IL-1 β expression at the genomic level, chromatin immuno-precipitation (ChIP) assay was performed in presence or absence of EFs. To that matter, we analyzed the occupancy of the NF- κ B response elements present in the distal

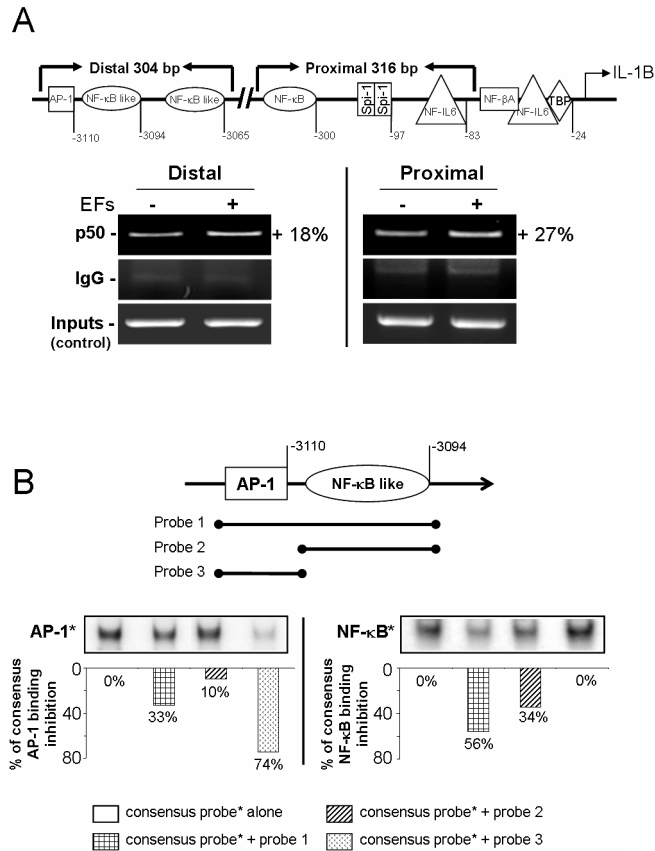


Figure 6

EFs-enhanced binding of NF- κ B on the promoter of IL-1 β gene. (A) M3Da cells were stimulated with EFs for 2 hours prior chromatin extraction. Chromatin was then fragmented and immunoprecipitated or not (as control) with an anti-p50 antibody; precipitated chromatin was then analyzed by PCR. (B) Competition assays were performed between radio-labelled consensus sequences and specific unmarked probes for IL-1 β gene enhancer element. Oligonucleotides were incubated in presence of nuclear proteins from M3Da cells. Graphs express the ability for each probe to inhibit the protein binding on the consensus site (in percentage of inhibition).

and the proximal part of the IL-1 β promoter. Chromatin was immuno-precipitated with an antibody raised against the NF- κ B p50 subunit, and the distal and proximal domain of the IL-1 β promoter containing the NF- κ B sites were examined by RT-PCR. This experiment showed that EFs increased the NF- κ B p50 subunit DNA-binding to the proximal (-300) and the distal (-3094) elements of the IL-1 β promoter after a 2 hours incubation period whereas immuno-precipitation using a non specific IgG as a control resulted in faint bands in treated and untreated cells (Fig 6A).

Since both NF- κ B and AP-1 were induced and translocated to the nucleus upon EFs stimulation, and the two binding sequences are placed side by side in the IL-1 β distal promoter; we therefore examined the ability for these two factors to bind concomitantly to their own DNA sequence by gel shift assay. To that purpose, we carried out competition assays between radio-labelled DNA consensus sequences for AP-1 and NF- κ B, and specific unlabelled DNA probes encompassing the AP-1, NF- κ B or both sites that mimic the upstream enhancer element of IL-1 β promoter (Goto *et al*, 1999) (Fig 6B). The two graphics express the percentage of the consensus DNA-binding inhibition induced by each specific unlabelled probe. Competition experiments using the AP-1 consensus probe revealed that the AP-1 sequence (probe 3) corresponding to the IL-1 β promoter strongly reduced AP-1 DNA-binding to the consensus probe. However, if the NF- κ B sequence (probe 2) had hardly any effect on its own, it decreased the inhibitory effect of the AP-1 sequence when present on the same probe (probe 1). By contrast, analysis of competition experiments with the NF- κ B consensus probe revealed not only that the AP-1 sequence corresponding to the IL-1 β promoter had no effect by itself but strongly increased the DNA-binding activity on the NF- κ B site, observed by an increased inhibitory effect, when co-localised on the same probe (probe 3).

Discussion

It is now well established that ECM participates to the stroma/tumour interactions and there is increasing evidence that fragments issued from ECM degradation modulate expression of soluble factors and proteases in neoplastic and stromal cells (Maquart *et al*, 2005). Using cryosections of primary melanomas we have previously shown that elastic fibres are strongly degraded at the invasive front of aggressive tumours in which the expression of S-Gal was prominent (Ntayi *et al*, 2004). In the present study, we show for the first time that EFs increase the expression of IL-1 β cytokine in high invasive melanoma cells through the S-Gal receptor. This overexpression of IL-1 β upon EFs stimulation was not observed in low invasive cells, although the S-Gal receptor was present at the membrane surface. These differential effects of EFs on IL-1 β expression suggest a non-functionability of the elastin receptor in the low invasive cell line. This is in keeping with our previous results showing that EFs increased MMP-2 expression and invasive properties only in the high invasive melanoma cells (Ntayi *et al*, 2004).

Based on our previous work with EFs in human skin fibroblasts (Duca *et al*, 2002), and others in arterial smooth muscle cells (Mochizuki *et al*, 2002), we hypothesized that induction of IL-1 β gene expression by this matrikine was dependent on the Erk 1/2 MAP Kinase pathway activation. Experiments on transduction pathways cascades revealed for the first time that EFs activated not only the MAPK / Erk 1/2 pathways but also activated the MAPK / p38 pathway in invasive melanoma cells. However, used of specific pharmacological inhibitors U0126 and SB203580 (inhibiting MEK-1 and p38 signalling pathways respectively), clearly indicated that these cascades were not implicated in IL-1 β regulation by EFs. Accordingly, it has been shown that the extra-matrical molecule laminin, which share the same receptor as elastin at the cell membrane (Mecham *et al*, 1989) induces IL-1 β gene expression by another signalling cascade than the MAPK pathway. Moreover, Roman and collaborators demonstrated that induction of the IL-1 β gene by

several ECM molecules implied the transcription factor AP-1 (Roman *et al*, 1999). We also found that activation of the transcription factor AP-1 was associated with the activation of the MAP Kinases signalling cascades upon EFs stimulation in melanoma cells. In line with this result, this transcription factor has also been involved in the MMP-1 upregulation following EFs fibroblast stimulation. However, like for the MAPK pathway, AP-1 DNA-binding analysis showed that this transcription factor was not involved in IL-1 β promoter upregulation (see below). These discrepancies may be due to the fact that Roman and collaborators considered the entire ECM molecules that bind specific integrin receptors, whereas in our model system, EFs engaged the elastin receptor (S-Gal) and therefore different signalling cascades. In this setting, EFs have been implicated in several biological effects, which varied with the cell type studied; therefore it is not surprising that these peptides activate several transduction pathways. Then, although activation of the MAPK / AP-1 pathway is of particular importance in cell proliferation and protease release, activation of this cascade appears insufficient to explain all EFs-induced biological activities related to cancer progression observed in numerous cell types.

To our knowledge, up to now AP-1 was the only transcription factor related to EFs stimulations. Here, we provide evidence that NF- κ B pathway is also activated upon EFs stimulation, confirming the fact that several transduction cascades are activated by EFs treatment. Despite the fact that IL-1 β gene expression implies the complex interaction of several transcription factors such as AP-1, cAMP response element binding protein (CREB) and NF- κ B (Dinarello, 1996), our study shows that NF- κ B-DNA binding is responsible for the IL-1 β promoter activation after EFs stimulation. This was demonstrated at several levels: i) translocation of the NF- κ B p50/p65 heterodimer in cells nucleus, ii) total inhibition of the EFs-increased IL-1 β gene transcription by specific NF- κ B inhibitors such as the cell-permeable peptide SN-50, or by infecting melanoma cells with an adenovirus over-expressing I κ B, iii) increased NF- κ B DNA-binding at the IL-1 β promoter level by chromatin immuno-precipitation.

Table 1 Comparative NF-κB DNA binding motifs (Kunsch *et al*, 1992)

	NF-κB DNA binding sequence	p50/p65 binding
IL-1β	AGTGACTCAAGAGCTGAATAATTCCCCAAA	
	GTGACTCGCGGGGAATTCCGGCGAAGC	++++
	GTGACTGATTGGGGGATTCCCGAAGC	++++
	GCTTCGGGGATTCCCTAGGCTGTCAC	+/-
	GCTTCGACAAAGGGGATTCCCCGTCAC	++

This latter demonstration was consistent with the ability of the p50/p65 complex to regulate the IL-1 β promoter activity in the proximal region (Hiscott *et al*, 1993) as well as in the distal part of the promoter containing the enhancer element (Goto *et al*, 1999). Since both AP-1 and NF- κ B nuclear binding sites are present in the IL-1 β promoter, and that both transcription factors were activated following EFs treatment, it was interesting to provide information on the mechanisms driving the IL-1 β expression. Competition assays showed that despite the fact that both AP-1 and NF- κ B transcription factors were activated, the distal sequence of the IL-1 β enhancer element, containing AP-1 and “NF- κ B like” binding sites in tandem, binds preferentially NF- κ B in invasive melanoma (M₃Da) cells. An explanation of the predominant NF- κ B DNA-binding over AP-1 can be drawn out of the structure analysis of the distal enhancer whose sequence revealed that i) the NF- κ B sequence (-3104 $\rightarrow$ AATAATTCC) is related to a RelA binding site as compared to already defined sequence in several cytokine (Lai *et al*, 1995), ii) the AP-1 sequence flanking the 5' extremity of the NF- κ B sequence of the IL-1 β distal enhancer favours the NF- κ B DNA binding as it has already been shown in a comparative study on a selection of κ B/Rel DNA-binding motifs (Kunsch *et al*, 1992) (table 1).

It has been shown in previous studies that IL-1 β could be an important inducer of NF- κ B during inflammation and tumorigenesis (Shattuck *et al*, 1994; Wood and Richmond, 1995) and that deregulation of NF- κ B were associated with the constitutive expression of many chemokines responsible of melanoma progression (Dhawan and Richmond, 2002). We provide here evidences that EFs recruit NF- κ B pathway and participate to IL-1 β up-regulation in highly invasive melanoma cells. The role of the pro-inflammatory IL-1 β in tumour progression is somewhat paradoxal. It has been shown that IL-1 β promotes tumour growth (Voronov *et al*, 2003). Taking together with the fact that MMP-2-dependent matrix degradation favours tumour invasiveness (Schonbeck *et al*, 1998), it is tempting to hypothesize that EFs production which will induce overexpression of IL-1 β and MMP-2

(Ntayi *et al*, 2004) could participate to melanoma progression. By contrast, other studies showed that IL-1 β activates antitumoral mechanisms through cytolytic activities of immune cells (Bjorkdahl *et al*, 2000) and induces IL-2 and IFN- γ , two NF- κ B dependent Th-1 cytokines involved in tumor growth inhibition (Gansbacher *et al*, 1990a; Gansbacher *et al*, 1990b; Lai *et al*, 1995). Interestingly, in a recent study we demonstrated that EFs induce Th-1 lymphocyte polarization (Debret *et al*, 2005). Therefore and oppositely to the previous hypothesis, it emerges from these considerations that EFs production will reduce melanoma progression either directly via Th-1 lymphocyte orientation or indirectly through IL-1 β overexpression. These two hypothesis are not incompatible and could intervene in different stages of melanoma progression according to the presence or not of infiltrated inflammatory cells in melanoma microenvironment, concomitantly with elastin peptides and IL-1 β .

In conclusion, we showed in this study the key role of EFs in NF- κ B-dependent cytokine gene expression involved in melanoma regulation.

Materials and Methods

Cell cultures Melanoma cell lines (M₁Dor and M₃Da) were established from metastases of two patients with malignant melanoma and have been previously characterized. These cells were chosen in keeping with their different ability to grow in nude mice after subcutaneous grafting. The percentage of tumour taken in nude mice was 100% for M₃Da and 26% for M₁Dor (Berthier-Vergnes *et al*, 1985). The two tumour cell lines were grown as monolayer cultures in McCoy's 5A medium supplemented with 10% of heat-inactivated foetal bovine serum (Gibco, Cergy-Ponthoise, France) in a humidified 95% air, 5% CO₂ atmosphere at 37°C. A total of 20,000 cells per cm² were initially seeded in plastic plates and grown until 80% confluence. Cells were then washed twice with McCoy's 5A medium alone and serum-starved for 16h prior treatments with κ -elastin as EFs (Menasche *et al*, 1981) or VGVAPG (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) at indicated times. All inhibitors, U0126 10 mM (Promega, Lyon, France), SB203580 5 mM, LY294002 25 mM, lactose 10 mM (Sigma) were pre-incubated for 1 hour. NF- κ B inhibitors SN-50 and SN-50M were purchased from Calbiochem (VWR, Fontenais sous Bois, France) and used at a concentration of 50 μ g/ml as described by Lin *et al* (1995) (Lin *et al*, 1995). HUVEC cells used as control in S-Gal detection experiment were a kind gift of Dr A. Robinet from the pharmacology department, Reims, France.

Reagents TRI Reagent was purchased from Euromedex (Molheim, France). Taq DNA pol I, dNTPs, MgCl₂ 50 mM, Taq buffer 10x, primers specific for IL-1 β and 18S cDNAs, primers specific for IL-1 β gene promoter used for EMSA competitions and primers specific for IL-1 β gene promoter used for ChIP PCR analyses were all provided by Invitrogen (Cergy-Ponthoise, France). Anti-ERK 1/2, anti-Thr-202/Tyr-204-phosphorylated ERK 1/2, anti-Thr-180/Tyr-182-phosphorylated p38 MAPK, anti-p65 were obtained from Cell Signaling (Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). HRP-Anti-rabbit IgG secondary antibody and [γ -³²P]ATP were from Amersham (Orsay, France), The NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3')

and AP-1 (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') consensus oligonucleotides were obtained from Promega (Lyon, France). Anti-p50 and anti-p65 used in supershift assays and ChIP assays were purchased from Santa Cruz (tébubio, Le Perray en Yvelines, France). Anti-S-Gal was provided by Neosystem (Strasbourg, France). Other products used in these experiments were all obtained from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), except when indicated.

Anti-S-Gal preparation The sequence VVGSPSAQDEASPL from alternatively spliced form of human β -galactosidase (Privitera *et al*, 1998) was injected intraperitoneally to rabbits. Antibodies were purified from antisera on a sepharose-activated affinity column (Amersham) coupled with the peptide. Specific antibodies were eluted with MgCl_2 3 M. Antibodies were then dialyzed overnight with phosphate-buffer-saline (PBS) (Gibco). This antibody recognizes human, sheep, and bovine S-Gal.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) After 6 hours incubation in presence or not of EFs, concentrations of immunoreactive IL-1 β in the cytoplasmic compartment of both cell lines were measured using an ELISA according to instructions provided by the manufacturer (R&D Systems, Lille, France). The lower limit of ELISA sensitivity for IL-1 β was 0.3 pg per well. According to the manufacturer, there is no significant cross-reactivity or interference with other known cytokines in this assay. Levels of IL-1 β were normalized for 10^6 cells.

RNA isolation and mRNA expression analysis Total RNA was extracted using TRI Reagent. First-strand cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using a Reverse Transcription Kit (Euromedex) in 20 μl of reaction mixture, according to the manufacturer's instructions. The synthesized first-strand cDNA (1 μl) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in a final volume of 25 μl containing 10 mM Tris-HCl, 2.5 MgCl_2 , 5% DMSO, 400 μM dNTP, 10 pmol of each primer and 1 U of Taq DNA pol I. The sequences of the

primers for IL-1 β and 18S RNA used were (sense) 5'-TAC GAA TCT CCG ACC ACC ACT ACA G-3', (antisense) 5'-GTA CAG GTG CAT CGT GCA CAT AAG C-3', and (sense) 5'-GCG AAT TCC TGC CAG TAG CAT ATG CTT G-3', (antisense) 5'-GGA AGC TTA GAG GAG CGA GCG ACC AAA GG-3', respectively. PCR amplifications of cDNA were performed under the following conditions: 32 and 21 cycles for IL-1 β and 18S RNA respectively, 1 min at 95°C, 1 min at 65 °C, 30 sec at 72°C. Before the first cycle, a denaturation step for 5 min at 95°C was included, and after the last cycle the extension was prolonged for 10 min at 72°C.

Western blot analysis Melanoma cell stimulation was stopped with ice-cold PBS containing 50 μ M of Na₃VO₄. Cells were washed twice with the same buffer and scrapped in lysis buffer [PBS pH 7.4, 0.5% Triton X-100, 80 mM β -glycerophosphate, 50 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 1 mM Na₃VO₄ and protease inhibitors cocktail], except for nuclear p65 blot (see below for nuclear extraction in EMSA methods). Cancer cells were then sonicated. The homogenates were centrifuged 10 min (10,000 x g), S-Gal present in the insoluble fraction was resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. Protein concentration of the soluble fraction was measured with BC assay protein quantitation kit (Interchim, Montluçon, France). Equal amounts of protein were separated by 10% SDS-polyacrylamide gels and transferred on to nitrocellulose membranes. Even transfer was verified by Ponceau staining. Membranes were blocked for 45 min at room temperature with buffer containing 5% non-fatty milk in Tween-Tris-buffer-saline (TBST) [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Tween 20]. The blots were incubated overnight with antibodies raised against ERK 1/2, Thr-202/Tyr-204-phosphorylated ERK 1/2, Thr-180/Tyr-182-phosphorylated p38 MAPK, p65 or S-Gal (10 μ g/ml). After washing the blots with TBST, they were incubated with peroxidase-conjugated anti-(rabbit IgG) for 1 h 30 and then washed again with TBST. Detection was performed using ECL+ (Amersham, Orsay, France).

EMSAs (Electrophoretic mobility shift assays) Nuclear extracts were prepared from melanoma cells as already described (Rahman *et al*, 1999). Briefly, cells were scraped and lysed in 400 µl of buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.4 mM PMSF, 0.2 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, and 1 µg/ml leupeptin), to which was added 25 µl of buffer B (10% Nonidet P-40), and the nuclei were collected by centrifugation (10,000 x g for 2 min). Nuclei were resuspended in 50 µl of buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 10% glycerol, 0.2 mM NaF, and 0.2 mM Na₃VO₄) and agitated for 20 min at 4°C, followed by centrifugation (10,000 x g for 5 min). Nuclear proteins (4 µg) were incubated with 5 x binding buffer (50 mM Tris-HCl, 0.5 M KCl, 5 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, 40% glycerol) and [γ -³²P]ATP-labeled probes and were electrophoresed on a 6% nondenaturing polyacrylamide gel. DNA binding on NF-κB and AP-1 consensus oligonucleotides was assessed by autoradiography. Sequences of probes for competition assays were purchased from Invitrogen and have been synthesized as follows. Probe 1 (5'-AGTGACTCAAGAGCTGAATAATTCCCCAAA-3'), Probe 2 (5'-GAGCTGAATAATTCCCCAAA-3'). Probe 3 (5'-GGCTTTAGTGACTCAAGAGCTG-3').

Adenovirus (Ad) constructs

Ad-IκB: Construction of the vector expressing a mutant form of IκB-α protein (in which serines 32 and 36 are replaced by alanine residues (therefore preventing inducible IκB-α phosphorylation) has been described before (Jobin *et al*, 1997; Henriksen *et al*, 2004).

The Ad-ovalbumin was a kind gift of Pr Z. Xing, Centre for Gene Therapeutics, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada.

The Ad-NF-κB-luciferase construct was obtained from the Gene Transfer Vector Core, University of Iowa, USA.

All Ad constructs were titered conventionally (Graham and Prevec, 1991) and were used on confluent M₃Da cells at a multiplicity of infection (moi) of 100. Ad vectors were pre-incubated for 15 min at room temperature for 15 min in McCoy's 5A medium alone and further incubated for two hours. Cells were then extensively washed before replenishment with cell's normal growth medium.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) analysis M₃Da cells plated in 75 cm² flasks were fixed with 1% formaldehyde, neutralized with glycine for 5 min to a final concentration of 125 mM, rinsed twice with TBS (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.1) and then scraped and syringed with TBS containing 0.5% SDS. The cell pellet is resuspended in the same buffer completed with 2% Triton X-100. The cell pellet was sonicated to yield DNA fragments of ~400 bp in average, immunoprecipitated with 1 µg of antibodies : anti-NF-κB-p50 and rabbit anti-IgG antibody as negative control, or no antibody as positive control (inputs), this last tube being conserved at 4°C until DNA isolation step. For the 3 other tubes, after overnight incubation at 4°C with continuous mixing, aggregates were removed by centrifugation and protein-A beads were added to supernatant. After 2h at 4°C, immune complexes were collected by centrifugation at 4°C and washed three times with wash buffer containing 150mM NaCl, 20mM Tris (pH 8.1), 5mM EDTA (pH 8), 6% sucrose, 0.2% NaN₃, 1% Triton X-100, 0.2% SDS, and twice with solution containing 1mM EDTA, 50mM Hepes [pH 7.5], 500mM NaCl, 1% triton X-100, 0.2% NaN₃, 0.1% deoxycholic acid, and twice with LiCl detergent solution (10mM Tris [pH 8], 1mM EDTA (pH 8), 250mM LiCl, 0.2% NaN₃, 0.5% NP-40, 0.5% deoxycholic acid, and finally in TE. All washes were 5min at 4°C with mixing. To eluate immune complexes from beads, an incubation for 30min at 65°C in reversal buffer (1%SDS, 100mM NaHCO₃) was done. Eluate was then incubated overnight at 65°C in the same buffer to reverse cross-links. DNA was extracted with phenol-chloroform and precipitated with ethanol using glycogen as a carrier. The purified DNA isolated by immunoprecipitation was analysed by PCR using (sense) 5'-GGT AGA GAC CCA CAC CCT

CA-3', (antisense) 5'-CAT GGA AGG GCA AGG AGT AG-3' primers for the proximal IL-1 β gene promoter; and (sense) 5'-GCG AAG CCC ATG ATT AGA CA-3', (antisense) 5'-GAT CCC CAA TGA GCA GAA AA-3' primers for the distal IL-1 β gene promoter.

Statistical Analysis Experiments were performed at least twice in triplicate. Data are reported as mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using Student's *t* test. *p* values of <0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments

This study was supported by La ligue Nationale Contre le Cancer de la Marne and l'Association pour la Recherche en Dermatologie.

References

- Berthier-Vergnes O, Portoukalian J, Dore JF (1985). Expression of cell surface glycoproteins in human melanoma cell lines with different tumorigenic properties. *Int J Cancer* **36**:461-466.
- Bjorkdahl O, Dohlsten M, Sjogren HO (2000). Vaccination with B16 melanoma cells expressing a secreted form of interleukin-1beta induces tumor growth inhibition and an enhanced immunity against the wild-type B16 tumor. *Cancer Gene Ther* **7**:1365-1374.
- Blood CH, Sasse J, Brodt P, Zetter BR (1988). Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol* **107**:1987-1993.
- Debret R, Antonicelli F, Theill A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, *et al* (2005). Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:1353-1358.
- Dhawan P, Richmond A (2002). Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol* **72**:9-18.
- Dinarelli CA (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**:2095-2147.
- Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebeck W, Haye B (2002). The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett* **524**:193-198.
- Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, Debelle L (2004). Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:235-244.
- Gansbacher B, Bannerji R, Daniels B, Zier K, Cronin K, Gilboa E (1990a). Retroviral vector-mediated gamma-interferon gene transfer into tumor cells generates potent and long lasting antitumor immunity. *Cancer Res* **50**:7820-7825.

-
- Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E (1990b). Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* **172**:1217-1224.
- Goto M, Katayama KI, Shirakawa F, Tanaka I (1999). Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine* **11**:16-28.
- Graham F, Prevec L (1991) Manipulation of adenovirus vectors. *In: Methods in Molecular Biology* (Murray E eds) Humana Press:Clifton, NJ, USA, 109-128.
- Henriksen PA, Hitt M, Xing Z, Wang J, Haslett C, Riemersma RA, *et al* (2004). Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli. *J Immunol* **172**:4535-4544.
- Hinek A (1996). Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. *Biol Chem* **377**:471-480.
- Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP, Barondes SH (1988). The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science* **239**:1539-1541.
- Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, *et al* (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* **13**:6231-6240.
- Hofmann UB, Houben R, Bocker EB, Becker JC (2005). Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* **87**:307-314.
- Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, Bellon G (2002). Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* **12**:231-241.
- Jobin C, Haskill S, Mayer L, Panja A, Sartor RB (1997). Evidence for altered regulation of I kappa B alpha degradation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* **158**:226-234.
- Karin M (2005). Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nat Med* **11**:20-21.

-
- Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA (1992). Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**:4412-4421.
- Lai JH, Horvath G, Subleski J, Bruder J, Ghosh P, Tan TH (1995). RelA is a potent transcriptional activator of the CD28 response element within the interleukin 2 promoter. *Mol Cell Biol* **15**:4260-4271.
- Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A (2000). Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**:547-554.
- Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* **270**:14255-14258.
- Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC (2005). Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* **87**:353-360.
- Mecham RP, Hinek A, Griffin GL, Senior RM, Liotta LA (1989). The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. *J Biol Chem* **264**:16652-16657.
- Menasche M, Jacob MP, Godeau G, Robert AM, Robert L (1981). Pharmacological studies on elastin peptides (kappa-elastin). Blood clearance, percutaneous penetration and tissue distribution. *Pathol Biol (Paris)* **29**:548-554.
- Mochizuki S, Brassart B, Hinek A (2002). Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**:44854-44863.
- Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, *et al* (2004). Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* **122**:256-265.

-
- Privitera S, Prody CA, Callahan JW, Hinek A (1998). The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem* **273**:6319-6326.
- Rahman I, Antonicelli F, MacNee W (1999). Molecular mechanism of the regulation of glutathione synthesis by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in human alveolar epithelial cells. *J Biol Chem* **274**:5088-5096.
- Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, Huet E, Vincent L, Lorimier S, *et al* (2005). Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci* **118**:343-356.
- Roman J, Ritzenthaler JD, Perez RL, Roser SL (1999). Differential modes of regulation of interleukin-1beta expression by extracellular matrices. *Immunology* **98**:228-237.
- Schonbeck U, Mach F, Libby P (1998). Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* **161**:3340-3346.
- Shattuck RL, Wood LD, Jaffe GJ, Richmond A (1994). MGSA/GRO transcription is differentially regulated in normal retinal pigment epithelial and melanoma cells. *Mol Cell Biol* **14**:791-802.
- Vidal-Vanaclocha F, Alvarez A, Asumendi A, Urcelay B, Tonino P, Dinarello CA (1996). Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro. *J Natl Cancer Inst* **88**:198-205.
- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, *et al* (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2645-2650.
- Wood LD, Richmond A (1995). Constitutive and cytokine-induced expression of the melanoma growth stimulatory activity/GRO alpha gene requires both NF-kappa B and novel constitutive factors. *J Biol Chem* **270**:30619-30626.

- Xie Z, Singh M, Singh K (2004). Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem* **279**:39513-39519.
- Xie Z, Singh M, Siwik DA, Joyner WL, Singh K (2003). Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *J Biol Chem* **278**:48546-48552.
- Yamamoto M, Akazawa K, Aoyagi M, Yamamoto N, Yamamoto K (2002). Changes in elastin-binding protein in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri. *Cell Biol Int* **26**:441-449.
- Yano S, Nokihara H, Yamamoto A, Goto H, Ogawa H, Kanematsu T, *et al* (2003). Multifunctional interleukin-1beta promotes metastasis of human lung cancer cells in SCID mice via enhanced expression of adhesion-, invasion- and angiogenesis-related molecules. *Cancer Sci* **94**:244-252.

En conclusion, nous avons montré que les PDE :

- ☞ Activent des cascades signalétiques autres que la voie classique de signalisation Erk 1/2. Il s'agit des voies MAPK p38 et NF-κB.
- ☞ Augmentent la synthèse d'IL-1β dans des cellules de mélanome fortement invasives par la mise en jeu de la voie NF-κB.

L'intérêt de nos résultats montrant une augmentation de l'expression de l'IL-1β par les PDE repose sur i) le caractère pro-inflammatoire de l'IL-1β défini par sa capacité à activer les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB ainsi que la voie MAPK p38, trois éléments également impliqués dans les processus d'invasion tumorale (angiogenèse, développement des métastases), ii) la capacité de cette cytokine à influencer le comportement des cellules inflammatoires et immunitaires telles que les lymphocytes en participant à leur recrutement et leur activation, soit directement par chimiotactisme via son récepteur membranaire, soit indirectement en induisant la libération de chimiokines (IL-8, TNFα) impliquées dans l'amplification des mécanismes inflammatoires [Kupper, 1990] [Debenedictis et coll., 2001].

2^{ème} partie : Effets des peptides d'élastine sur la polarisation Th1 des lymphocytes T

Dans le cadre d'une relation inflammation/cancer, de nombreuses cellules T migrent depuis le réseau lymphatique ou le sang périphérique pour atteindre la tumeur de mélanome. Certains lymphocytes sont retrouvés au sein même de la tumeur (lymphocytes infiltrants) mais semblent dépourvus d'activité cytolytique et ne participent donc pas à la réponse anti-tumorale [Ladanyi et coll., 2004]. D'autres lymphocytes, se situant en périphérie de la tumeur, parviennent à lutter contre la progression tumorale jusqu'à une certaine évolution de la tumeur qui échappe alors au contrôle des cellules de défense, notamment en masquant ou changeant ses antigènes de surface [Ladanyi et coll., 2004] [Anichini et coll., 2004]. Nous avons montré dans un travail précédent que des cellules de mélanome, des lymphocytes T et des PDE étaient co-localisés au niveau de l'espace péri-tumoral [Ntayi et coll., 2004]. Après avoir étudié les effets des PDE sur les cellules de mélanome, nous nous sommes logiquement intéressés aux effets de ces peptides sur l'activité des lymphocytes péri-tumoraux.

Les lymphocytes résidant en périphérie de la tumeur sont difficiles à isoler. Cependant, des études réalisées dans le cadre de pathologies inflammatoires (emphysème, anévrisme aortique abdominal (AAA), ...) ont démontré que de grandes quantités de PDE étaient libérées au site d'inflammation et dans le sang périphérique. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'étude *in vitro* à partir de lymphocytes circulant permettait de rendre compte des mécanismes d'interaction PDE/lymphocytes infiltrants.

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes intéressés au rôle des PDE sur la différenciation Th1 ou Th2 des lymphocytes T humains. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication : dans *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, sous l'intitulé : « Elastin-Derived Peptides Induce a T-Helper Type 1 Polarization of Human Blood Lymphocytes » (2005) Debret R, Antonicelli F, Theill A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M and Le Naour R. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* ; 7:1353-8.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- 1/** L'interaction des PDE avec leur récepteur spécifique (S-gal), présent à la surface des lymphocytes humains du sang périphérique, induit une augmentation de la production d'IFN γ (Th1) et une diminution des cytokines IL-5 et IL-10 (Th2).
- 2/** L'activation des lymphocytes T par un agent mitogène (PHA) augmente d'une part le niveau d'expression du récepteur à l'élastine (S-gal) à la surface des cellules, et d'autre part le niveau de production d'IFN γ et d'IL-2 (Th1), d'IL-5 et d'IL-10 (Th2).
- 3/** Les PDE induisent une augmentation de la production d'IFN γ et d'IL-2 et une diminution de la synthèse d'IL-5 et d'IL-10 induits par la PHA.
- 4/** Les PDE augmentent la synthèse des cytokines IFN γ et IL-2 et répriment la synthèse des cytokines IL-5 et IL-10 quelque soit l'orientation préalable des lymphocytes T vers la voie Th1 (par l'IL-12) ou Th2 (par l'IL-4).
- 5/** L'interaction des PDE avec leur récepteur conduit à l'activation de la voie MAPK Erk 1/2 et du facteur de transcription AP-1 dans les lymphocytes T.
- 6/** La stimulation des lymphocytes T par les PDE induit une augmentation de la sécrétion de proMMP-9, que les cellules soient dans un état basal, activé (PHA) ou pré-orienté Th1 ou Th2.

Elastin-Derived Peptides Induce a T-Helper Type 1 Polarization of Human Blood Lymphocytes

Romain Debret, Frank Antonicelli, Aurore Theill, William Hornebeck, Philippe Bernard, Moncef Guenounou, Richard Le Naour

Objective—Increased level of elastin-derived peptides (EDPs) is observed in the serum of patients with manifestations of arterial diseases. We here investigated whether EDPs might exert, at systemic level, a regulatory role for the T-helper type 1 (Th-1)/Th-2 cellular immune response by human peripheral blood lymphocytes (PBLs) expressing the spliced-galactosidase (S-gal)–elastin receptor.

Methods and Results—Using flow cytometry and Western blot analysis, we demonstrated that EDPs led to an activation of the S-gal-elastin receptor associated with cytokine production on PBLs and CD4⁺ T cell subpopulations. The constitutive expression of the S-gal–elastin receptor at the surface of human PBLs was upregulated at the mRNA (RT-PCR) and protein (ELISA) levels on cell activation. In nonactivated and phytohemagglutinin-activated conditions, expressions of the predominant Th-2 cytokine interleukin-5 (IL-5) and IL-10 were reduced, whereas those of the major Th-1 cytokines interferon- γ and IL-2 were enhanced by EDPs. Furthermore, we evidenced that EDPs could not only potentiate the IL-12–induced Th-1 profile but also could reverse the Th-2 (over Th-1) profile induced by IL-4. Finally, Th-1 cytokine upregulation was associated to an increased activator protein-1 DNA binding and enhanced pro–matrix metalloproteinase-9 secretion.

Conclusions—This study highlights the importance of EDPs as stimuli for Th-1 differentiation, whether T cells are in an inactivated state or already orientated toward a Th-1 (IL-12) or Th-2 (IL-4) response. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1353-1358.)

Key Words: elastin peptides ■ T lymphocytes ■ cytokines ■ Th-1/Th-2 ■ MMP-9 ■ AP-1

Elastic fibers provide elasticity to tissues such as lung, skin, and large blood vessels.^{1–3} Elastin represents the main amorphous component of those fibers that proteolysis is catalyzed by proteases as serine elastases⁴ and matrix metalloproteinases (MMPs) such as MMP-2, MMP-9, MMP-7, and MMP-12.^{5–7} Excessive expression of those elastolytic MMPs is hallmark of atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm (AAA).^{8–14} However, the physiopathological relevance of these elastase-increased expression is not clear. Indeed, intense elastic fiber fragmentation and increased level of circulating elastin-derived peptides (EDPs) has been consistently observed mainly in AAA.^{15–17}

EDPs display a large panel of biological effects largely mediated through their interactions with a receptor complex including a 67-kDa elastin-binding protein (EBP)^{18,19} identified as an enzymatically inactive spliced variant of human β -galactosidase.^{20,21} EDPs exhibit chemotactic activity for monocytes, fibroblasts, and tumor cells,^{22–24} regulate cell proliferation in normal and pathological conditions,²⁵ and provide control of vascular tone.²⁶ Elastin peptides have also been shown to induce elastase production by human phyto-

hemagglutinin (PHA)-activated T lymphocytes²⁷ and to promote cell death of human activated T cells expressing the elastin receptor.²⁸

As documented, in human atherosclerotic diseases, T lymphocytes are orientated toward T-helper type 1 (Th-1) cells, which produce interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), IL-12, IL-15, and IL-18 cytokines.^{29,30} On the contrary, in AAA, Th-2 immune responses predominate locally, although a systemic increase of IFN- γ , the major cytokine associated with Th-1 phenotype, has been reported.³¹ Indeed, Th-2 cytokines such as IL-4, IL-5, and IL-10 are highly expressed in AAA,³⁰ and recently, Th-2–predominant immune response in human AAA development was confirmed through the induction by Th-2–inflammatory environment of aneurysms in a murine model of aortic allograft.³² We thus investigated the influence of EDPs in T-helper orientation and evidenced that interaction of EDPs with the 67-kDa spliced-galactosidase (S-gal)–elastin receptor expressed on human peripheral blood lymphocytes (PBLs) induced a functional differentiation or shift toward Th-1 phenotype, which was accompanied by an increased pro–MMP-9.

Original received September 20, 2004; final version accepted April 7, 2005.

From the Laboratoire d'Immunologie Virologie et Bactériologie (R.D., A.T., M.G., R.L.N.), and Laboratoire de Biochimie (R.D., F.A., W.H., P.B.), Reims, France.

Correspondence to Richard Le Naour, PhD, Laboratoire d'Immunologie, Virologie et Bactériologie, IPCM, EA 3796, IFR53, UFR de Pharmacie, 1 rue du Maréchal Juin, 51096 Reims Cedex, France. E-mail richard.lenaour@univ-reims.fr

© 2005 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. is available at <http://www.atvbaha.org>

DOI: 10.1161/01.ATV.0000168412.50855.9f

Methods

Human PBLs Isolation and Culture

Human PBLs were obtained by countercurrent centrifugal elutriation, followed by density-gradient centrifugation from heparinized venous blood of healthy donors. Isolated PBLs (10^6 cells/mL) were cultured in a serum-starved RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine (300 μ g/mL), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (50 μ g/mL; Invitrogen), and treated or not with 10 μ g/mL soluble elastin peptides obtained as described previously.³³ Four hours after incubation at 37°C in 5% CO₂, cells were collected for intracellular cytokine staining. To detect intracytoplasmic cytokines, the secretion inhibitor Brefeldin A (10 μ g/mL; Sigma) was added to the culture medium. In some experiments, PBLs were activated with 10 μ g/mL PHA (Sigma) at the time of EBP treatment and then incubated for 24 hours. Cell viability was $\approx$ 90% when cell culture supernatants were collected and cells lysed for cytokine analysis. Pretreatment of PBLs with 10 mmol/L lactose (3 hours) or 10 μ g/mL anti-EBP antibody (1 hour) was used to define the specificity of EBP effects.

Western Blot Analysis

Protein extracts from human PBLs were resolved by electrophoresis as described previously.³⁴ Blots were developed with either a purified rabbit antibody raised against a 14-aa sequence specific of the S-gal (Neosystem) or an anti-phospho-Erk1/2 (Cell Signaling) or a total anti-Erk1/2 (R & D Systems). After incubation with anti-rabbit horseradish peroxidase-labeled IgG (Cell Signaling), immune complexes were detected with the enhanced luminescence system according to manufacturer instructions (Perkin-Elmer).

Flow Cytometry Analysis of EBP and Intracellular Cytokine Staining

All labeled antibodies were purchased from BD Pharmingen. 10^6 nonpermeabilized PBLs were incubated with anti-CD3 alone or associated with anti-CD4 or anti-EBP for 30 minutes at 4°C in the dark. In some experiments, after centrifugation (500g for 5 minutes), cell pellets were treated for cytokine staining as described previously.³⁵ A 3-color flow cytometric analysis was performed with a fluorescence-activated cell sorter (FACS; Calibur Instrument; BD Biosciences). Human CD4⁺ T lymphocytes from healthy donors were initially gated on the PBL population based on forward and side light-scattering properties, and thereafter on the presence of the surface markers CD3 and CD4. Analysis was performed on a logarithmic scale using CellQuest software (BD Biosciences).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from human PBLs with Trizol reagent (Invitrogen). Precipitated RNA was reverse-transcribed with oligo-dT as the first-strand cDNA primer and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase superscript (Life Technologies). After reverse transcription, the cDNA product was amplified by PCR as described previously.³⁶ RT-PCR was performed with specific primers for IFN- γ , IL-2, 18S RNA, and β -galactosidase (Invitrogen). The ethidium bromide-stained cDNA bands were analyzed from 1.5% agarose gels under UV light (Gel Doc 2000; Bio-Rad).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Quantification of cytokine protein levels was performed using commercially available high-sensitivity ELISA kit according to manufacturer instructions (R & D Systems).

Electrophoretic Mobility Assay

EMSA was performed to appreciate DNA binding using an activator protein-1 (AP-1) consensus sequence (Promega).³⁷

Gelatin Zymography

Samples were run in nonreducing Laemmli buffer and separated through a 10% SDS-PAGE containing 1 mg/mL gelatin as substrate.

MMP gelatinolytic activities were evidenced as white zones of lysis as described previously.³⁸

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using either Student's *t* test or Wilcoxon test as appropriate. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

EDPs Influence Cytokines Production by Human T Cells

We first investigated whether human PBLs isolated by countercurrent centrifugal elutriation from healthy donors were able to express the S-gal-elastin receptor. Western blot analysis of proteins extracted from human PBLs using antibody directed against a specific sequence of S-gal protein corresponding to the 67-kDa EBP (ie, S-gal) subunit of the elastin receptor revealed the constitutive presence of this S-gal-elastin receptor in human PBLs. Antibody specificity was performed with a protein extract from fibroblastic cells, which was analyzed simultaneously to

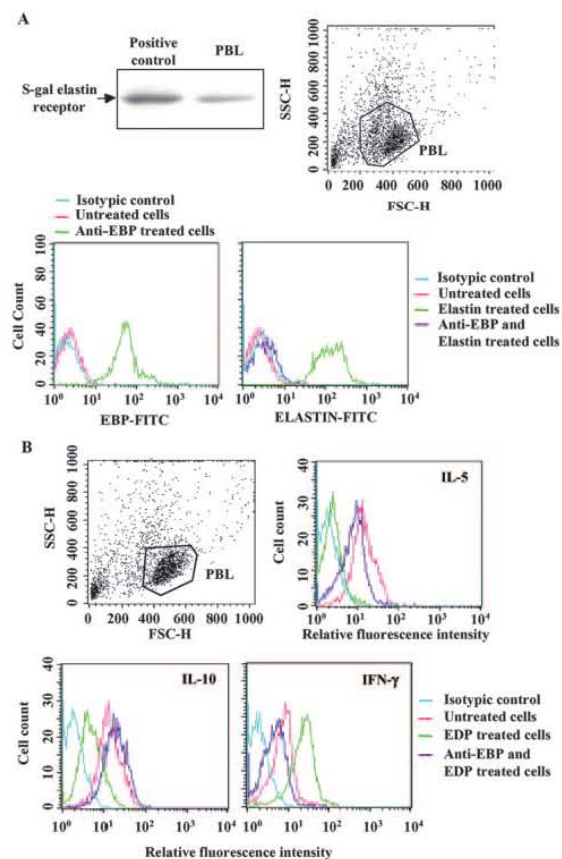


Figure 1. Cytokine regulation during interaction of elastin peptides with PBLs expressing elastin receptor. **A**, Western blot and flow cytometry analysis of constitutive expression of S-gal-elastin receptor on human PBLs. **B**, Intracellular expression of cytokine by elastin peptide-treated PBLs in the presence or absence of anti-EBP antibodies. All data are representative of 3 independent experiments. FITC indicates fluorescein isothiocyanate; SSC-H, side scatter; FSC-H, forward scatter.

PBL proteins (Figure 1A). Presence of this receptor at the cell surface was confirmed by flow cytometry analysis on nonpermeabilized cells directly with an anti-EBP antibody and indirectly by competition between fluorescein isothiocyanate-labeled elastin and anti-EBP antibody (Figure 1A).

To analyze the EDP/S-gal interaction-mediated influence on immunomodulatory properties of human T cells, intracellular Th-1 (IFN- γ) and Th-2 (IL-5 and IL-10) cytokine expression was determined by flow cytometry analysis before and after EDP treatment. Untreated PBL cells expressed detectable basal levels of IL-5, IL-10, and IFN- γ (Figure 1B, red curves). On stimulation with EDPs at a concentration of 10 μ g/mL, a concentration corresponding to an average level of elastin peptides in circulating blood,³⁹ and that did not alter cell viability as investigated by the trypan blue exclusion method (data not shown) and as described by others,²⁸ IL-5 and IL-10 levels were reduced, whereas IFN- γ production was enhanced (Figure 1B, green curves versus red curves). In setting with our former results (Figure 1A), modulation of cytokine expression on EDP stimulation was abolished with an anti-S-gal pretreatment (Figure 1B, purple curves). To define whether the effects observed on PBLs treated with EDPs on Th-1/Th-2 cytokine production was correlated to an orientation toward a Th-1/Th-2 immune response within PBL population, the same experiments were conducted on a CD3⁺CD4⁺ gated population (Figure 1, available online at <http://atvb.ahajournals.org>). On EDP stimulation, IL-5, IL-10, and IFN- γ levels (Figure 1A, green curves versus red curves) were affected similarly to the PBL population (Figure 1B). Statistical analysis of cytokine production expressed as a mean intensity of fluorescence shows that EDP stimulation led to a significant decrease of Th-2 cytokine (IL-5 and IL-10) secretion, whereas Th-1 cytokine (IFN- γ) was enhanced (Figure 1B).

Specificity of ligand-receptor interaction was further demonstrated on CD4⁺ T cells using a pretreatment with 10 mmol/L lactose, known to induce the shedding of S-gal from the cell surface, before elastin peptide activation.⁴⁰ Treatment with lactose alone did not affect cytokine production (data not shown). However, lactose pretreatment abolished the down and upregulatory effects of EDPs on the expression of IL-5, IL-10, and IFN- γ , respectively (Figure 1B).

EDPs Favor a Th-1 Profile in Human Lymphocytes

To provide further evidence that EDPs may act as critical mediators to promote or maximize a Th-1 cytokine profile, we used the mitogenic compound PHA (10 μ g/mL) for PBL activation, which was characterized by: (1) the presence of the CD69 glycoprotein, an activation inducer molecule that is highly expressed on the surface of T lymphocytes 24 hours after PHA stimulation⁴¹ (data not shown); and (2) by IL-2 production, a Th-1 cytokine produced early during PBL activation. To avoid cell death or apoptosis after EDP treatment of PHA-activated PBLs, as described by Peterszegi et al²⁸ using high doses (up to 5 mg/mL), or long-period treatment (72 hours) with EDPs, cells were treated for only 24 hours in presence of 10 μ g/mL EDPs.

We first studied the consequences of PHA treatment of human PBLs on the expression level of the S-gal-elastin receptor. As seen in Figure 2A, protein blots probed with specific S-gal protein antibody showed a significant increase of the S-gal-elastin receptor

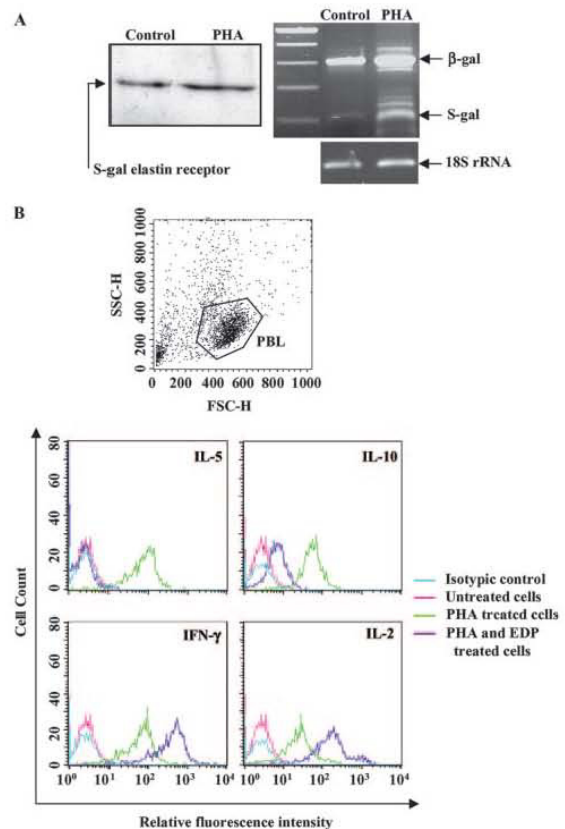


Figure 2. Regulation of intracellular cytokine expression by elastin peptides in PHA-activated PBLs. A, Expression of S-gal-elastin receptor (Western blot, left) and S-gal mRNA (RT-PCR, right) in PHA-activated PBLs. All results are representative of 3 independent experiments. B, Intracellular cytokine expression in PHA-activated PBLs treated or not with elastin peptides. All results are representative of 3 independent experiments.

in PHA-activated PBLs compared with untreated cells. RT-PCR experiments confirmed the increased S-gal mRNA expression in PHA-activated human PBLs (Figure 2A). Increased elastin receptor expression on activated lymphocytes was associated to an enhanced IFN- γ and IL-2 expression on EDP stimulation observed at the protein and mRNA levels (Figures 2B and 3). On the contrary, EDPs antagonized the PHA effect on IL-5 and IL-10 expressions (Figure 2B).

Similarly, as found using nonactivated lymphocytes, EDP effects were receptor-dependent in PHA-activated lymphocytes. Exposure of cells to 10 mmol/L lactose totally abolished the effect of elastin peptides on IFN- γ and IL-2 expression at the mRNA and protein levels (Figure 3). Therefore, these results demonstrate that the interaction of elastin peptides with S-gal is critically involved in the upregulation of Th-1 cytokine such as IL-2 and IFN- γ in nonactivated and activated human PBLs.

To further evidence that EDPs maximize or promote Th-1 over Th-2 cytokine profile, we used preorientated lymphocytes with IL-12 (Th-1 orientation) or IL-4 (Th-2 orientation) cytokine, as shown in Figures II and III (available online at <http://atvb.ahajournals.org>). Indeed, Th-1 T-lymphocyte sub-

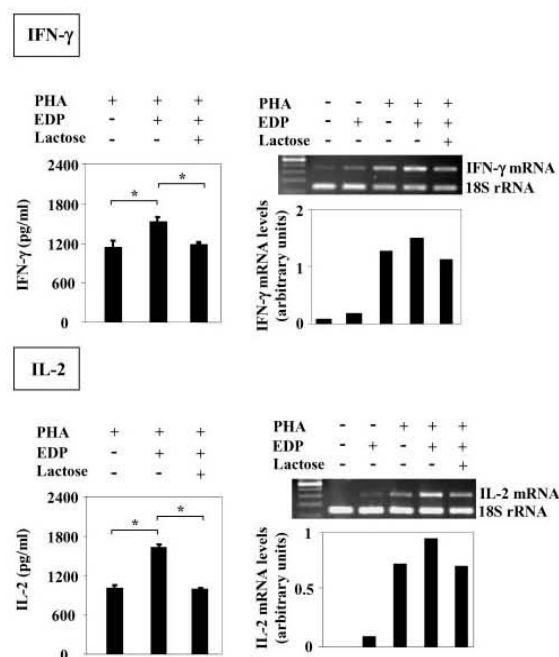


Figure 3. Upregulation of IFN- γ and IL-2 by elastin peptides in PHA-activated PBLs. Top, Representative (of 3 independent experiments) IFN- γ mRNA expression (RT-PCR) and IFN- γ secretion (ELISA) in PHA-activated PBLs treated or not with elastin peptides or lactose. Bottom, Representative (of 3 independent experiments) IL-2 mRNA expression (RT-PCR) and IL-2 secretion in PHA-activated PBLs treated or not with elastin peptides or lactose. ELISA data are mean $\pm$ SEM; * $P < 0.05$.

population characterized by IL-5 and IL-10 low profiles and IL-2 and IFN- γ high profiles was reinforced by EDP cotreatment (Figure II, purple curves versus green curves), whereas a shift toward Th-1 T lymphocytes was demonstrated by a reduction of IL-5 and IL-10 production, which paralleled and increased IL-2 and IFN- γ production in Th-2-preorientated T lymphocytes cotreated with EDPs (Figure III, purple curves versus green curves).

EDPs Increase Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2, AP-1, and MMP-9 Activities

Interaction of EDPs with their receptor was further analyzed by activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway (Figure 4A). Concomitantly, we demonstrated that downstream to the ERK pathway activation, stimulation by EDPs also led to a dose-dependent enhancement of the AP-1 DNA binding (Figure 4B), which is thought to play a major role in coordinating transcription of the IFN- γ gene and was demonstrated to be required for optimal IL-2 gene transcription.⁴² Interestingly, a single AP-1 element, which binds members of the AP-1 transcription factor family, is found in the promoter region of each inducible MMP gene. Because MMP-2 and MMP-9 are 2 of the most abundant elastolytic proteases secreted at the site of arterial tissue damage, we decided to investigate the role of EDPs in the regulation of MMP-2 (pro-MMP-2) and MMP-9 (pro-MMP-9) expression. Figure 4C shows that the gelatinolytic

activity of the latent pro-MMP-9 is constitutively expressed in nonactivated PBLs and increased 24 hours after incubation of cells with 10 μ g/mL elastin peptides. In contrast, pro-MMP-2 gelatinolytic activity remained undetectable under whatever activation conditions used (Figure 4C). Pro-MMP-9 activity was also increased in response to 10 μ g/mL PHA activation as compared with nonactivated cells. In such conditions, elastin peptides still enhanced pro-MMP-9 secretion (Figure 4C). A similar effect of EDPs on pro-MMP-9 secretion was also observed in orientated Th-1 (IL-12) or Th-2 (IL-4) lymphocytes (Figure 4C).

Discussion

We initially hypothesized that the elevated level of EDPs in the serum of patients with manifestations of arterial diseases might contribute to a T-helper phenotype polarization of human PBLs. In this setting, we found that EDPs led to activation of the S-gal-elastin receptor associated with cytokine production on PBLs and CD4⁺ T cell subpopulations. The constitutive expression of the S-gal-elastin receptor at the surface of human PBLs was upregulated at the mRNA and protein levels on cell activation. Previous studies described the presence of the S-gal-elastin receptor on isolated T lymphocytes from human tonsils or atherosclerotic plaques.^{43,44,27} However, to our knowledge, the presence of S-gal-elastin receptor at the surface of nonactivated and activated human PBLs (circulating lymphocytes) had not been convincingly established.

Suppression of the regulatory effects of EDPs on cytokine expression in the presence of lactose or anti-S-gal antibody demonstrated the critical role of the interaction between EDPs and S-gal in functional differentiation or shift of the systemic T-cell response toward Th-1 phenotype. On stimulation with EDPs, the levels of the predominant Th-2 cytokines IL-5 and IL-10 were reduced, whereas the major Th-1 cytokines IFN- γ and IL-2 were enhanced in nonactivated or PHA-activated T cells. Th-1 phenotype polarization of PBLs was also demonstrated using either insoluble fibrous elastin or the specific peptide sequence Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, several-fold repeated in human tropoelastin (data not shown). Overall, our data add further insight into the well-documented biological effects of elastin peptides, as members of matrikines family, demonstrating their involvement in cytokine regulation. More generally, it is now emerging that matrix components might regulate T-cell response, as demonstrated with osteopontin, an early matricellular protein of type-1 cell-mediated immunity.⁴⁵ In addition, we found that the ability of EDPs to direct the T-lymphocyte population toward a Th-1 profile was still effective when T cells were IL-12 Th-1 preorientated. The physiopathological relevance of EDP-mediated Th-1 orientation of the T-cell response could be illustrated during atherosclerosis, in which a Th-1 immune response predominates, although elastolysis was not as prominent as in aneurysms.⁴⁶ Strikingly, EDPs were also shown to reverse the Th-2 (over Th-1) profile induced by IL-4. Recently, Schönbeck et al and Shimizu et al demonstrated that the dichotomy between IFN- γ - or IL-4-dominated cytokine environments plays a crucial part in AAA formations.^{30,32} Importantly, any change toward a Th-2 microenvironment might influence arterial lesions toward aneurysm development. To that

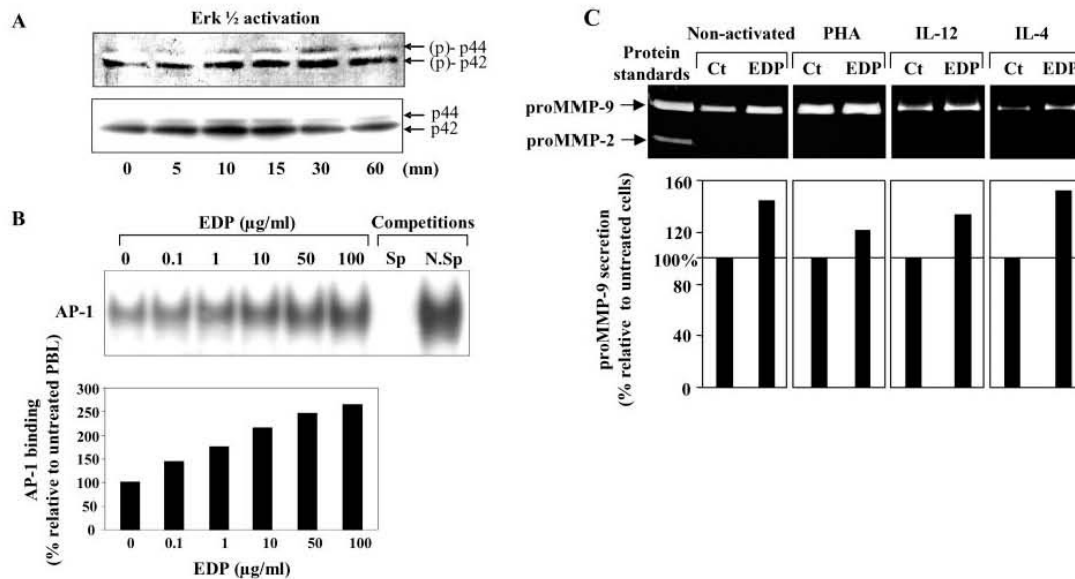


Figure 4. Regulation of Erk1/2 pathway, AP-1 DNA binding, and pro-MMP-9 secretion by elastin peptides in PBLs. **A**, Increase of Erk1/2 activation in nonactivated PBLs treated with elastin peptides. **B**, Increase of AP-1 binding in nonactivated PBLs treated with elastin peptides. **C**, Upregulation of pro-MMP-9 by elastin peptides (vs control [Ct]) in PBLs activated or not with PHA, IL-12, or IL-4. Pro-MMP-9 and pro-MMP-2 gelatinolytic activities were evidenced as white zones. All results are representative of 3 independent experiments.

respect, our findings would suggest that somewhat paradoxically, EDPs could act as protective agents.

Nevertheless, one might also consider that EDPs markedly increased levels of pro-MMP-9 after S-gal activation. Indeed, S-gal occupancy by EDPs led to ERK1/2 and AP-1 DNA-binding activation, key actors in coordinating MMPs⁴⁷ and IFN- γ or IL-2 transcription.⁴² Consequently, that might contribute to positive feedback mechanism through exacerbation of MMP-9 production because IFN- γ and IL-2 were reported to stimulate the release of MMP-9 by various cell types.^{48–50} Thus, considering that: (1) MMP-9, as a zymogen form, could hydrolyze macromolecular substrates such as type IV collagen;⁵¹ and (2) MMP-9 displays a wide specificity, an upregulation of active MMP-9 production by EDP-activated PBLs would in turn promote destabilization and complication of atherosclerotic plaques or facilitate aortic aneurysm development as described previously.^{8,48,52}

These observations highlight a dual potential contribution of EDP-activated lymphocytes in the development of AAA and atherosclerosis and provide convincing evidence that physiopathological evolution of these 2 arterial pathologies might depend on the delicate balance between cytokines and MMPs produced by EDP-activated lymphocytes. Probably, initiation of an early inflammatory response within the damaged aortic wall orientates the proper biological effects of elastin peptides. It needs to be considered that insoluble elastin is a very long-lived protein (half life $\approx$ 70 years), and its degradation (EDP production) probably constitutes a strong signal to modulate the inflammatory response by either preventing aneurysmal development by reversing Th-2 profile or amplifying the Th-1 profile associated to atherosclerosis. To that respect, EDP production will display either beneficial or detrimental effects. Also, EDPs, either directly or indirectly (through IFN- γ or IL-2), were shown

here to enhance MMP-9 expression by lymphocyte. Excessive MMP production has been observed in AAA and atherosclerosis, suggesting that upregulation of MMP-9 expression mediated by EDPs, when present at site of injury, would be detrimental to aneurysmal and atherosclerosis progression. Besides, because MMP-9 was described to display potent elastolytic activity,⁵ an amplification mechanism might be locally generated. As a whole, our data further illustrate the critical importance of elastolysis in the progression of arterial diseases.

Acknowledgments

This work was supported by funds provided from Ligue de la Marne (France) and the Region Champagne Ardenne (France). The authors thank Dr P. Nguyen and the Etablissement de Transfusion Sanguine Nord-Est (France) for providing the PBL samples.

References

1. Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem*. 1998;258:1–18.
2. Debelle L, Alix AJ. The structures of elastins and their function. *Biochimie*. 1999;81:981–994.
3. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:261–272.
4. Samouillan V, Lamure A, Maurel E, Lacabanne C, Homebeck W. Alterations in the chain dynamics of insoluble elastin upon proteolysis by serine elastases. *Biopolymers*. 2001;58:175–185.
5. Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem*. 1991;266:7870–7875.
6. Woessner JF Jr. Matrilysin. *Methods Enzymol*. 1995;248:485–495.
7. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 1993;268:23824–23829.
8. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;6:2493–2503.

9. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999;14:1788-1794.
10. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1145-1151.
11. McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Pearce WH. In situ localization and quantification of seventy-two-kilodalton type IV collagenase in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *J Vasc Surg*. 1995;22:295-305.
12. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms: an elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm infiltrating macrophages. *J Clin Invest*. 1995;96:318-326.
13. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation*. 2001;104:304-309.
14. Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, Michel JB. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am J Pathol*. 2002;161:1701-1710.
15. Lindholt JS, Heikendorff L, Henneberg EW, Fasting H. Serum-elastin-peptides as a predictor of expansion of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997;14:12-16.
16. Lindholt JS, Ashton HA, Heikendorff L, Scott RA. Serum elastin peptides in the preoperative evaluation of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001;22:546-550.
17. Wilson KA, Lindholt JS, Hoskins PR, Heikendorff L, Vammen S, Bradbury AW. The relationship between abdominal aortic aneurysm distensibility and serum markers of elastin and collagen metabolism. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001;21:175-178.
18. Hinek A. Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-laminin binding protein. *Cell Adhes Commun*. 1994;2:185-193.
19. Hinek A. Biological roles of the nonintegrin elastin/laminin receptor. *Biol Chem*. 1996;377:471-480.
20. Hinek A, Rabinovitch M, Keeley F, Okamura-Oho Y, Callahan J. The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J Clin Invest*. 1993;91:1198-1205.
21. Privitera S, Prody CA, Callahan JW, Hinek A. The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem*. 1998;273:6319-6326.
22. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, Urry DW. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol*. 1984;99:870-874.
23. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin-derived peptides. *J Clin Invest*. 1982;70:614-618.
24. Blood CH, Sasse J, Brodt P, Zetter BR. Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol*. 1988;105:1987-1993.
25. Ghuyssen-Itard AF, Robert L, Jacob MP. Effect of elastin peptides on cell proliferation. *C R Acad Sci Ser III*. 1992;315:473-478.
26. Faury G, Ristori MT, Verdetti J, Jacob MP, Robert L. Effect of elastin peptides on vascular tone. *J Vasc Res*. 1995;32:112-119.
27. Peterszegi G, Texier S, Robert L. Human helper and memory lymphocytes exhibit an inducible elastin-laminin receptor. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;114:218-223.
28. Peterszegi G, Texier S, Robert L. Cell death by overload of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:166-172.
29. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999;145:33-43.
30. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. Th2 predominant immune response prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol*. 2002;161:499-506.
31. Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjala H, Airaksinen J, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2843-2847.
32. Shimizu K, Schichiri M, Libby P, Lee RT, Mitchell RN. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN- γ signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest*. 2004;114:300-308.
33. Jacob MP, Hornebeck W. Isolation and characterization of insoluble and kappa-elastin: frontiers. *Matrix Biol*. 1985;10:92-129.
34. Debret R, El Btaoui H, Duca L, Rahman I, Radke S, Haye B, Sallénave JM, Antonicelli F. Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. *FEBS Lett*. 2003;546:195-202.
35. Hubeau C, Le Naour R, Abély M, Hinnrasky J, Guenounou M, Gaillard D, Puchelle E. Dysregulation of IL-2 and IL-8 production in circulating T lymphocytes from young CF patients. *Clin Exp Immunol*. 2004;135:528-534.
36. Esnault S, Benbernou N, Lavay F, Shin HC, Potron G, Guenounou M. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL 2 and interferon gamma (IFN gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clin Exp Immunol* 1996;103:111-118.
37. Antonicelli F, Brown D, Parmentier M, Drost EM, Hirani N, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. Regulation of LPS-mediated inflammation in vivo and in vitro by the thiol antioxidant Nacetylcysteine. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286:1319-1327.
38. Ntayi C, Labrousse A-L, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W, Bernard P. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol*. 2004;122:256-265.
39. Bizbiz L, Alperovitch A, Robert L. Aging of the vascular wall: serum concentration of elastin peptides and elastase inhibitors in relation to cardiovascular risk factors. The EVA study. *Atherosclerosis*. 1997;131:73-78.
40. Mecham RP, Whitehouse L, Hay M, Hinek A, Sheetz MP. Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. *J Cell Biol*. 1991;113:187-194.
41. Stentz FB, Kitabchi AE. De novo emergence of growth factor receptors in activated human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Metabolism*. 2004;53:117-122.
42. Schafer PH, Gandhi AK, Loveland MA, Chen RS, Man H, Schnetkamp PPM, Wolbrink G, Govinda S, Corral LG, Payvandi F, Muller GW, Stirling DI. Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305:1222-1232.
43. Peterszegi G, Robert AM, Robert L. Presence of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes. *C R Acad Sci Ser III*. 1996;319:799-803.
44. Peterszegi G, Mandet C, Texier S, Robert L, Bruneval P. Lymphocytes in human atherosclerotic plaque exhibit the elastin-laminin receptor: potential role in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1997;135:103-107.
45. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawadeh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*. 2000;287:860-864.
46. Robert L, Hornebeck W. Role of elastin and elastases in atherogenesis. In: Hauss WLH, Wissler RW, Bauch HJ, eds. *Modern Aspects of the Pathogenesis of Atherosclerosis*. 1989;82:133-139. Westdeutscher Verlag, Münster.
47. Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebeck W, Haye B. The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI³K-dependent signaling. *FEBS Lett*. 2002;524:193-198.
48. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol*. 1995;154:4379-4389.
49. Xiong W, Zhao Y, Prall A, Greiner TC, Baxter BT. Key roles of CD4⁺ T cells and IFN-gamma in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *J Immunol*. 2004;172:2607-2612.
50. Wang Z, Zheng T, Zhu Z, Homer RJ, Riese RJ, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA. Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med*. 2000;192:1587-1600.
51. Bannikov GA, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL, Goldberg GI. Substrates binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem*. 2002;18:16022-16027.
52. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapiro SD, Senior RM, Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2000;105:1641-1649.

Figure I

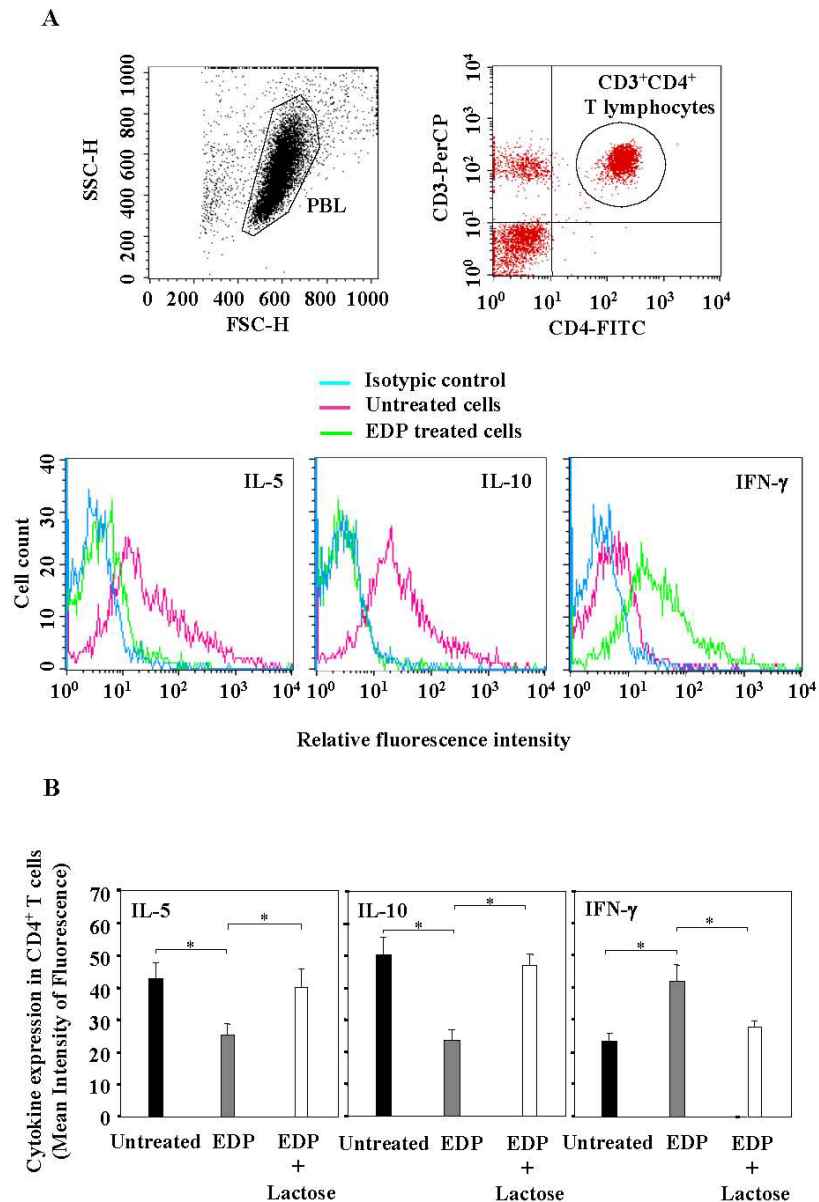


Figure I. Contribution of elastin receptor on cytokine synthesis by elastin peptides-treated CD4⁺ T cells. A, Consecutive steps for acquisition of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes from PBL and intracellular expression of cytokine by elastin peptides-treated CD4⁺ T cells. Data are representative of three independent experiments. B, Consequences of pre-incubation of PBL with lactose on regulatory effects of elastin peptides on the intracellular cytokine expression by CD4⁺ T cells. Data are mean intensity of fluorescence $\pm$ SEM; * $p < 0.05$.

Figure II

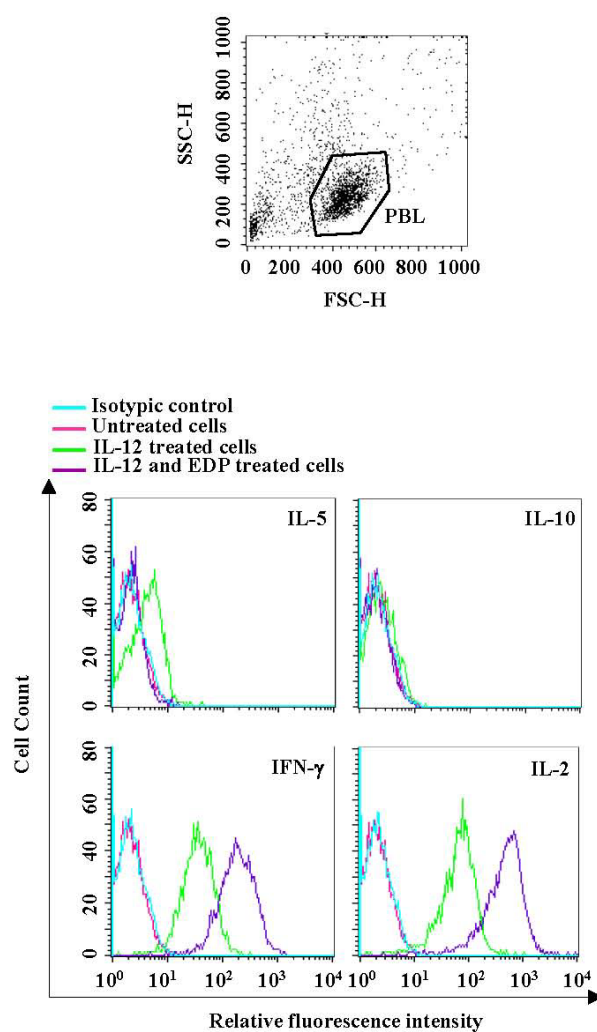


Figure II. Regulation of intracellular cytokine expression in IL-12-activated PBL treated or not with elastin peptides. All results are representative of three independent experiments.

Figure III

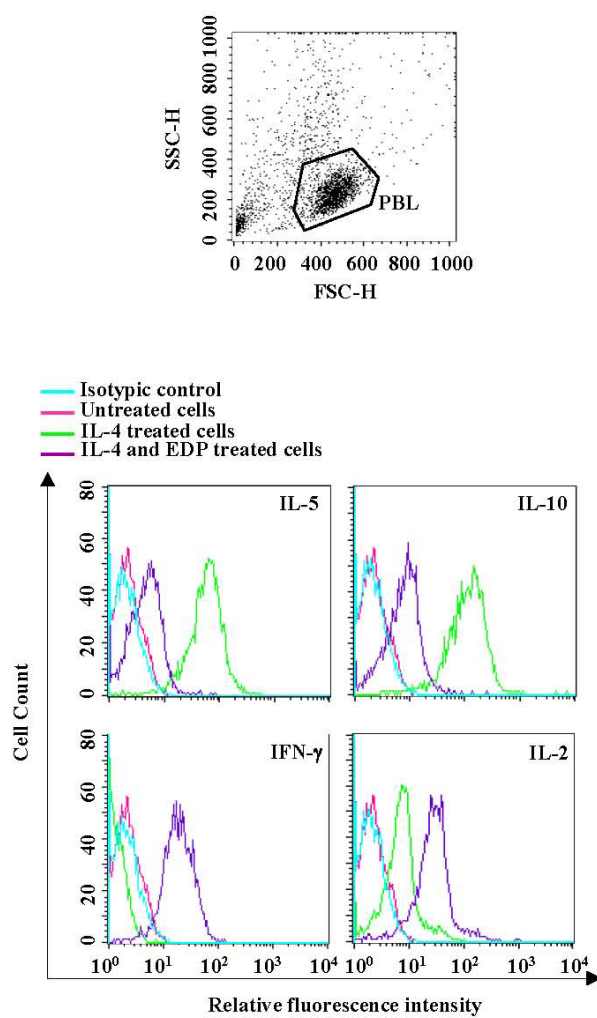


Figure III. Regulation of intracellular cytokine expression in IL-4-activated PBL treated or not with elastin peptides. All results are representative of three independent experiments.

En conclusion, les PDE différencient ou réorientent les lymphocytes T en faveur d'un profil de sécrétion cytokinique Th1 via le récepteur membranaire de l'élastine. Dans le contexte athéromateux, l'entretien de la composante inflammatoire est dû aux lymphocytes présentant un profil de sécrétion Th1. D'après nos résultats, en polarisant les lymphocytes vers la voie Th1, les PDE contribueraient donc au développement de cette pathologie. En revanche, l'AAA est associé à un profil Th2 et la réorientation vers un profil Th1 des lymphocytes T par les PDE tendrait à limiter l'évolution de cette pathologie. Toutefois, la libération de grandes quantités de protéases comme la MMP-9 amplifieraient ou entretiendraient localement ces désordres inflammatoires.

Sur la base de ces résultats, la différenciation des lymphocytes T périphériques vers un profil Th1 en présence de PDE doit être prise en compte dans la relation inflammation/cancer reliant les lymphocytes au mélanome, et sera abordée lors de la discussion générale.

3^{ème} partie : Résultats complémentaires

Cette troisième partie présente quelques résultats préliminaires ayant pour but d'ouvrir les perspectives de ce travail. Toutefois, il convient de préciser que ces expériences doivent être reproduites pour garantir l'exactitude des mécanismes mis en jeu. Néanmoins, la tendance de ces résultats suscite quelques questions que nous développerons au cours de la discussion générale.

A. Influence d'une co-stimulation des cellules M₃Da par l'IL-1 β et les PDE sur l'expression de GRO α et de l'IL-8 : Implication de la voie NF- κ B

Nous avons vu précédemment qu'en présence des PDE, les cellules de mélanome sécrètent des quantités plus importantes d'IL-1 β . Il est démontré que l'IL-1 β est un puissant inducteur de la production par les cellules de mélanome de composés tels que l'IL-8 et GRO α [Shattuck et coll., 1994] [Singh et Varney, 1998]. Ces deux chimiokines sont considérées comme de véritables facteurs de croissance des mélanomes et leurs productions sont corrélées avec la croissance tumorale [Rodeck et Herlyn, 1991] [Mattei et coll., 1994] [Singh et coll., 1994].

Nous nous sommes intéressés aux effets de l'interaction des PDE et de l'IL-1 β sur le comportement des cellules de mélanome.

A.1. Analyses des expressions de l'IL-8 et de GRO α

Après une mise au repos pendant 16 h dans du milieu McCoy 5A en absence de SVF, les cellules M₃Da ont été stimulées pendant 4 h en présence d'IL-1 β recombinante humaine à différentes concentrations (1 et 10 ng/ml) et/ou de PDE (κ -élastine 50 μ g/ml). Après cette période d'incubation, les ARN sont extraits et l'expression des gènes codant pour GRO α et l'IL-8 est analysée par RT-PCR (Figure 1).

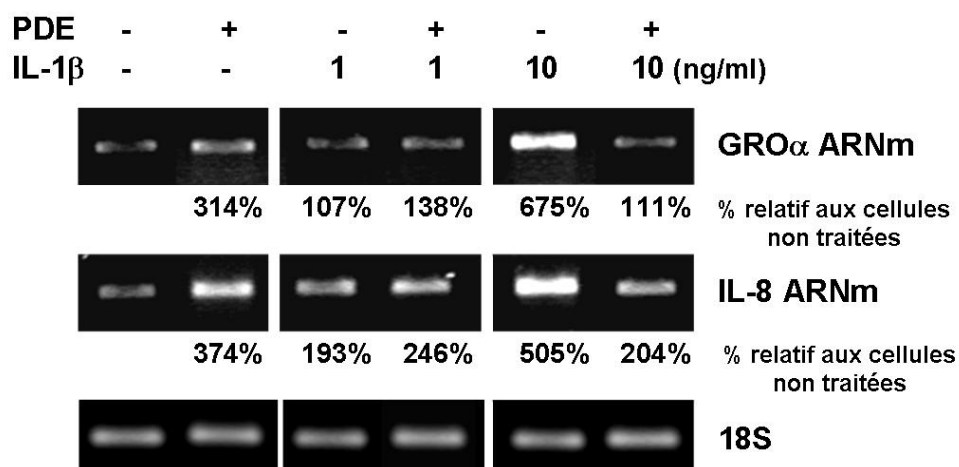


Figure 1 : Analyse par RT-PCR du niveau d'expression des chimiokines IL-8 et GRO α après activation des cellules M₃Da par l'IL-1 β et/ou les PDE. Après la mise au repos, les cellules ($5 \cdot 10^5$) sont stimulées ou non par l'IL-1 β (1 et 10 ng/ml) et/ou les PDE (50 μ g/ml). Après 4 h d'incubation, les ARN sont extraits et les gènes de l'IL-8 et de GRO α sont analysés par RT-PCR. L'ARNr 18S est utilisé comme témoin du rendement d'extraction des ARN.

En accord avec les données de la littérature, l'IL-1 β (10 ng/ml) induit une augmentation de l'expression des transcrits correspondant aux gènes de GRO α et de l'IL-8. Nous observons que les PDE induisent également une augmentation des taux de ces deux transcrits dans les cellules M₃Da. Cependant, nous n'observons pas d'effet cumulatif de ces deux agonistes ni pour la régulation de GRO α ni pour celle de l'IL-8. Au contraire, dans cette expérience nous observons que plus la concentration en IL-1 β augmente moins les PDE ont d'effet sur l'expression des deux chimiokines. En effet, pour de fortes concentrations d'IL-1 β , les taux d'expression de GRO α et de l'IL-8 sont inférieurs à ceux observés pour chacun des agonistes utilisés seuls.

A.2. Analyse de la voie NF- κ B

L'IL-8 et GRO α sont deux chimiokines dont la régulation dépend principalement de la voie NF- κ B. Etant donné que les PDE et l'IL-1 β stimulent cette voie de signalisation, nous avons analysé la capacité du facteur de transcription NF- κ B à lier l'ADN dans les noyaux des cellules M₃Da stimulées dans les conditions où

l'effet des agonistes sur l'expression de GRO α et de l'IL-8 est maximal (IL-1 β : 10 ng/ml ; PDE : 50 μ g/ml). Après 4 h d'incubation, les protéines nucléaires sont extraites et le niveau de fixation de NF- κ B à une sonde consensus d'ADN est analysé par EMSA (Figure 2).

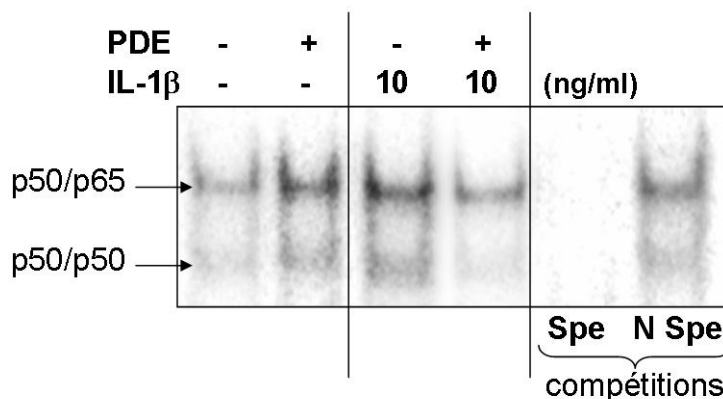


Figure 2 : Analyse par EMSA du niveau d'activation du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules M₃Da stimulées par l'IL-1 β et les PDE. Expérience de retard sur gel utilisant une sonde radiomarquée possédant la séquence 5'-GGGGACTTTCCC-3' correspondant à un site consensus de fixation du complexe NF- κ B. Les tests de compétitions sont effectués en présence d'un excès (100 fois) de sonde NF- κ B non marquée (Spe) ou de sonde radiomarquée AP-1 (N Spe). Après la mise au repos, les cellules (2.10^6) sont stimulées ou non par l'IL-1 β (10 ng/ml) et/ou les PDE (50 μ g/ml).

Nous observons que l'IL-1 β comme les PDE augmentent la capacité de fixation des complexes NF- κ B (p50/p50 et p50/p65) à l'ADN dans les cellules M₃Da. Cependant, la stimulation simultanée par les deux agonistes se traduit par un niveau d'activation du facteur de transcription inférieur à celui obtenu avec chaque stimulus utilisé séparément montrant une inhibition mutuelle lorsque ces deux activateurs sont présents simultanément dans l'environnement des cellules de mélanome. Les résultats des profils de fixation de NF- κ B sont en accord avec l'observation faite précédemment au niveau de l'expression des chimiokines.

B. Influence de l'activation des lymphocytes T par les PDE sur le comportement des cellules de mélanome

Nous avons montré précédemment que les PDE induisent une augmentation de la synthèse d'IL-1 β dans les cellules de mélanome. Cependant, dans les conditions physiopathologiques, les quantités d'IL-1 β présentes au sein de la tumeur de mélanome proviennent d'une part des cellules de mélanome elles-mêmes, et d'autre part des cellules stromales dont les lymphocytes péri-tumoraux. En continuité des travaux réalisés dans la deuxième partie des résultats, nous avons donc recherché si les PDE pouvaient également modifier l'expression de l'IL-1 β dans les lymphocytes humains. Comme précédemment, nous avons utilisé des lymphocytes circulants pour essayer d'appréhender l'action que pourraient avoir les PDE sur les lymphocytes infiltrants.

B.1. Niveau d'expression de l'IL-1 β dans des lymphocytes T humains activés par les PDE

Les lymphocytes humains, obtenus à partir du sang périphérique de donneurs sains ont été mis au repos pendant 16 h, puis stimulés ou non par la PHA (10 μ g/ml) et/ou les PDE (κ -élastine 10 μ g/ml). Après 4 h d'incubation, les ARN sont extraits et le niveau d'expression du transcrit codant pour l'IL-1 β est analysé par RT-PCR (Figure 3).

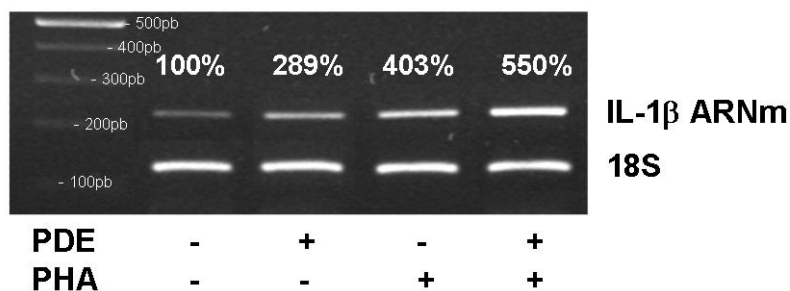


Figure 3 : Analyse par RT-PCR du niveau d'expression de l'IL-1 β dans des lymphocytes humains activés par la PHA et/ou les PDE. Après la mise au repos, les cellules (10^6) sont stimulées par la PHA (10 μ g/ml) et/ou des PDE (10 μ g/ml). Après 4 h d'incubation, les ARN sont extraits et le gène codant pour l'IL-1 β est analysé par RT-PCR. L'ARNr 18S est utilisé comme témoin du rendement d'extraction des ARN.

Nous observons que les PDE et la PHA augmentent le niveau d'expression du gène codant pour l'IL-1 β dans les lymphocytes du sang périphérique de donneurs sains. L'utilisation conjointe des deux agonistes a pour conséquence une augmentation du niveau d'expression de l'IL-1 β supérieure à celle observée lors de l'utilisation des deux agonistes pris séparément.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux conséquences de l'interaction PDE/lymphocytes sur le comportement des cellules de mélanome. Le niveau d'expression de l'IL-8 ayant été corrélé avec le niveau de croissance du mélanome, nous avons analysé le niveau d'expression de cette chimiokine dans des cellules de mélanome mises au contact de milieux conditionnés de lymphocytes activés ou non par les PDE.

B.2. Effets des milieux conditionnés de lymphocytes sur l'expression de l'IL-8 dans les cellules M₃Da

Des lymphocytes humains mis au repos pendant 16 h ont été stimulés par la PHA (10 μ g/ml) et/ou les PDE (κ -élastine 10 μ g/ml). Après 24 h d'incubation, les milieux conditionnés des lymphocytes ont été prélevés et dilués au 1/10^{ème} dans du milieu McCoy 5A. Ensuite, des cellules de mélanome (M₃Da) ont été incubées pendant 4 h en présence des différents milieux conditionnés des lymphocytes dilués.

Après cette période d'incubation, les ARN sont extraits et l'expression du gène codant pour l'IL-8 dans les M₃Da est analysée par RT-PCR (Figure 4).

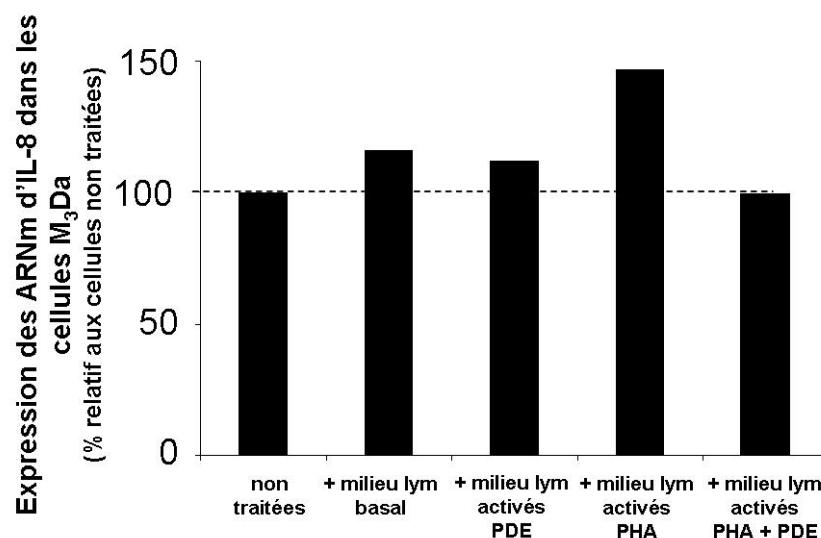


Figure 4 : Analyse par RT-PCR du niveau d'expression de l'IL-8 dans les cellules M₃Da mises en présence des milieux conditionnés de lymphocytes (lym). Les cellules M₃Da (5.10^5) reposées sont stimulées pendant 4 h en présence de milieux conditionnés de lymphocytes dilués au $1/10^{\text{ème}}$ dans du milieu McCoy 5A. Les valeurs sont normalisées par rapport à l'expression de l'ARNr 18S et exprimées en % par rapport à l'expression de l'IL-8 dans des cellules M₃Da incubées avec du milieu McCoy seul.

Les milieux de sécrétion provenant de lymphocytes à l'état basal ou stimulés par les PDE induisent une faible augmentation du niveau d'expression de l'IL-8 dans les cellules M₃Da. Cette augmentation est majorée lorsque les lymphocytes sont stimulés par la PHA, et inhibée lorsque les lymphocytes sont co-stimulés par la PHA et les PDE.

C. Conclusions sur les résultats complémentaires

De l'ensemble des résultats présentés dans cette troisième partie, il apparaît que les PDE se comportent de deux façons vis-à-vis des cellules de mélanome selon que ces matrikines sont utilisées directement, ou simultanément soit avec de l'IL-1 β recombinante, soit des milieux conditionnés de lymphocytes humains.

Lorsqu'ils sont utilisés seuls sur les cellules de mélanome, les PDE sont capables d'augmenter les niveaux d'expressions de l'IL-8 et de GRO α . Cependant, ces effets sont inhibés par une co-incubation avec de l'IL-1 β . Le mécanisme d'inhibition reste à définir et plusieurs hypothèses peuvent être retenues :

- ☞ Une interaction directe entre les PDE et l'IL-1 β dans l'espace extracellulaire pourrait avoir lieu. L'association des deux agonistes résultant en une incapacité pour chacun d'eux à se lier à son récepteur spécifique.
- ☞ Une interaction entre le récepteur spécifique des PDE et celui de l'IL-1 β peut également être supposée. Cette hypothèse fut déjà émise par Hinek suite à des travaux portant sur la stimulation de cellules musculaires lisses par ces deux mêmes agonistes [Hinek et coll., 1996].
- ☞ Les deux agonistes induisant des voies de signalisation similaires, il est donc concevable qu'une compétition ait lieu au niveau de l'activation des voies de transduction en aval des récepteurs spécifiques des PDE et de l'IL-1 β .

Parallèlement, nous montrons que les PDE augmentent le niveau d'expression de l'IL-1 β par les lymphocytes activés ou non par la PHA. Toutefois, si les PDE augmentent le niveau d'expression de l'IL-1 β , ils diminuent l'effet des ajouts des milieux conditionnés par la PHA sur la production d'IL-8 par les cellules de mélanome. Comme nous l'avons supposé précédemment, cette diminution pourrait s'expliquer par une interaction entre les PDE et l'IL-1 β produite. Ceci pourra être confirmé par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la production d'IL-1 β .

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'implication de fragments matriciels issus de la dégradation de l'élastine dans l'interaction inflammation/cancer. L'invasion tumorale au cours du mélanome implique une dégradation accrue de la matrice extracellulaire, surtout médiée par les sérines protéases et les métalloprotéases (MMPs). Dans un travail précédent, nous avons montré l'importance d'un environnement tridimensionnel (3D) de collagène I et des peptides d'élastine dans l'activation de la MMP-2, facilitant l'invasivité des cellules de mélanome *in vitro*. Nous avons également observé *in situ* une colocalisation de la MMP-2, la MT1-MMP, la dégradation des fibres élastiques et la présence d'un infiltrat lymphocytaire au front de migration de la tumeur sur des coupes histologiques de mélanome. Le mélanome est une tumeur très immunogène interagissant étroitement avec différents types de cellules inflammatoires et immunitaires notamment par l'intermédiaire de nombreux facteurs solubles tels que l'IL-1 β , l'IL-8, GRO α , l'IL-2, l'IFN γ , ... Notre étude a porté sur l'effet des PDE sur cette production de médiateurs solubles impliqués dans la relation mélanome/inflammation.

1. Activité biologique des PDE sur une lignée de mélanome

Nous avons montré dans ce travail que les PDE, matrikines présentes dans l'environnement du mélanome, augmentent la production d'IL-1 β dans une lignée de mélanome invasive (M₃Da) alors qu'aucun effet n'a été mis en évidence en utilisant une lignée non invasive (M₁Dor). Cette augmentation de la production d'IL-1 β , mise en évidence par dosage ELISA sur un homogénat cellulaire, a été confirmée d'une part par analyse en cytométrie en flux, et d'autre part par analyse des mécanismes intracellulaires reliant l'activation du récepteur des PDE à la transcription du gène codant pour l'IL-1 β . Toutefois, il est important de noter que nous n'avons pas mis en évidence cette cytokine dans le milieu conditionné des cellules bien que les PDE stimulent la voie de signalisation MAPK p38 nécessaire à la traduction des ARNm codant pour l'IL-1 β [Lee, 1994]. Nous n'excluons cependant pas que cette cytokine soit sécrétée dans notre système expérimental. Roman et collaborateurs (1999) se sont intéressés à la production d'IL-1 β induite par des molécules de la MEC telles que la laminine, la fibronectine, le collagène de type I et la fibrine. En accord avec notre étude, les auteurs n'ont détecté qu'une faible quantité d'IL-1 β sécrétée sous

forme activée en présence des différents agonistes, bien que l'activation du promoteur soit importante. Il est alors probable que l'IL-1 β soit au moins en partie sécrétée dans notre système mais que sa concentration soit en dessous du seuil de sensibilité de la technique ELISA. Pour autant, il est démontré que l'IL-1 β est actif à de très faibles concentrations [Dinarello, 1996]. Une conséquence directe serait qu'une partie de ce qui est sécrété dans l'espace péricellulaire soit captée par les récepteurs à la surface membranaire des cellules de mélanome [Krasagakis et coll., 1993], réduisant d'autant plus les concentrations dans les milieux conditionnés jusqu'à devenir indétectables en ELISA. En outre, il a été démontré que l'IL-1 β peut en partie être sécrétée sous la forme de proIL-1 β [Beuscher et coll., 1990]. Roman et collaborateurs (1999) expliquent d'ailleurs que les faibles concentrations en IL-1 β détectées dans les milieux conditionnés de leur système peut être en partie dû à la technique ELISA qui ne distingue généralement que la forme activée. Toutefois, la forme latente de la protéine peut être clivée (activée) dans l'espace extracellulaire. A partir du même modèle cellulaire, nous avons rapporté dans un travail précédent que les PDE induisent une augmentation de la sécrétion de proMMP-2 ainsi que son activation uniquement en culture tridimensionnelle [Ntayi et coll., 2004]. Cette protéinase est capable de cliver la proIL-1 β en sa forme mature [Schonbeck et coll., 1998]. Dans un système tridimensionnel, il est donc concevable que l'augmentation simultanée des productions de proIL-1 β et de MMP-2 par les PDE, aboutisse à la formation d'IL-1 β biologiquement actif dans l'espace péricellulaire des cellules de mélanome. Quelque soit le mécanisme impliqué, l'importance d'une telle activation à proximité de la cellule est liée à la propriété de stimulation autocrine/paracrine de l'IL-1 β qui a pour effet immédiat d'entretenir sa propre synthèse [Dinarello, 1996]. Cette boucle d'autostimulation dans les cellules cancéreuses a récemment été impliquée dans les processus de chimiorésistance des cellules de carcinome pancréatique [Arlt et Schafer, 2002].

En accord avec le paragraphe précédent, nous avons observé un niveau élevé d'expression du transcrit de l'IL-1 β après 24 heures de stimulation par les PDE dans notre modèle (non montré). Toutefois, d'autres données préliminaires nous ont permis de montrer que la stimulation simultanée des cellules de mélanome par l'IL-1 β et les PDE résulte en une inhibition mutuelle des effets de ces agonistes. Une

conséquence de cette inhibition serait que l'IL-1 β libérée suite à la stimulation par les PDE devrait participer à l'arrêt du signal.

Plusieurs hypothèses peuvent rendre compte de ces observations :

☞ 1^{ère} hypothèse : Existence d'une interaction directe entre les PDE et l'IL-1 β .

1^{er} cas : Cette interaction peut être liée aux concentrations respectives de PDE et d'IL-1 β dans le milieu. Nous avons montré une inhibition mutuelle de l'IL-1 β et des PDE sur la production d'IL-8 et GRO α dans les cellules de mélanome. Ces inhibitions étaient doses dépendantes : plus la concentration en IL-1 β était importante et plus l'effet inhibiteur était conséquent. Or, dans le paragraphe précédent nous avons précisé que la concentration en IL-1 β sécrétée restait faible, même après un traitement par les PDE. En conséquence, dans notre système de culture, l'effet inhibiteur lié à l'interaction moléculaire ne serait donc que peu important et permettrait un effet prolongé par l'un ou l'autre de ces agonistes sur l'expression de l'IL-1 β . En effet, la surexpression observée à 24 heures pourrait alors provenir de deux processus non exhaustifs : i) La concentration en PDE dans le milieu conditionné étant nettement supérieure à celle de l'IL-1 β sécrétée, les PDE restant libres pourraient continuer leur effet sur la régulation de l'IL-1 β via leur récepteur membranaire ; ii) si l'affinité de l'IL-1 β pour son récepteur spécifique, bien que faible [Dinarelli, 1996], est supérieure à celle de l'IL-1 β pour les PDE, alors l'IL-1 β sécrétée pourrait agir par un mécanisme autocrine/paracrine pour induire sa propre synthèse comme Hiscott et collaborateurs l'ont déjà décrit [Hiscott et coll., 1993].

2^{ème} cas : Sécrétion d'un (de) facteur(s) stimulant(s) par les cellules de mélanome. Il est également possible que la surexpression prolongée de l'IL-1 β soit due à la sécrétion d'un facteur stimulant « relais ». Nous avons montré dans la troisième partie des résultats que la stimulation des cellules de mélanome par les PDE entraînait une augmentation de l'expression des ARNm de l'IL-8 et dans une moindre mesure ceux de GRO α . Or, il a été montré par Singh et Varney que l'IL-8 est un activateur autocrine/paracrine des cellules de mélanome [Singh et Varney, 2000]. L'effet prolongé des PDE pourrait donc être lié à la formation d'agonistes « relais », tel que l'IL-8, pour lesquels aucune interaction n'a encore été démontrée avec les PDE. Ainsi, les

agonistes « relais » pourraient prolonger l'effet initié par les PDE sur la régulation positive de l'IL-1 β indépendamment de l'inhibition mutuelle des PDE et de l'IL-1 β observée.

☞ 2^{ème} hypothèse : Mécanismes d'interaction via les récepteurs spécifiques des PDE et de l'IL-1 β .

Il a été proposé par Hinek et collaborateurs que le récepteur des PDE (S-gal) pouvait gêner l'appariement de la molécule d'IL-1 β sur son récepteur spécifique (IL-1RI) et donc la réponse cellulaire associée [Hinek et coll., 1996]. Dans le cas où l'inhibition mutuelle des PDE et de l'IL-1 β ne serait pas extracellulaire mais prendrait place au niveau des connectiques signalétiques intracellulaires, le deuxième cas de la première hypothèse reste concevable dans la mesure où la molécule « relais » activerait des voies de transduction différentes de celles activées par les PDE ou l'IL-1 β . En effet, il a été montré que différentes voies de signalisation telles que AMPc et MAPK p38... stimulent la synthèse de l'IL-1 β [Vannier et Dinarello, 1993].

2. Régulation du gène de l'IL-1 β par les PDE

Malgré les nombreux effets liés à l'action des PDE dans différents types cellulaires, seule l'activation des voies MAPK Erk 1/2 et AMPc avaient été décrites à ce jour. Nous avons montré dans ce travail que les PDE peuvent également activer les voies MAPK p38 et NF- κ B. Dans notre système cellulaire, cette dernière est responsable de l'augmentation du niveau de transcription de l'IL-1 β . Toutefois, les autres voies de signalisation activées par les PDE pourraient agir à d'autres étapes impliquées dans la régulation de la production de l'IL-1 β .

En effet, l'ARNm de l'IL-1 β , comme celui de nombreuses cytokines/chimiokines (GRO α , IL-8, TNF α ,...), est rapidement dégradé dans le cytoplasme en raison de séquences 3' riches en AU, or, dans notre système, les PDE augmentent l'activité de la voie p38 et il a été montré que l'activation de la cascade MKK6/p38/MK2 augmente la demi-vie des ARNm [Winzen et coll., 1999]. Très récemment nous avons effectué des manipulations complémentaires (non

montrées) pour observer la demi-vie de l'ARNm de l'IL-1 β en présence d'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription. Nous avons pu observer une rapide diminution (2 h) de la quantité d'ARNm codant pour l'IL-1 β dans le cytoplasme des cellules M₃Da en absence de tout stimulus. Cette diminution n'a pas été observée lorsque ces cellules ont été pré-activées par les PDE. Ces observations tendent à démontrer que parallèlement à une augmentation de la transcription, les PDE induisent une stabilisation de la demi-vie des ARNm de l'IL-1 β indispensable au mécanisme de traduction. Ce résultat conforte les hypothèses émises précédemment selon lesquelles les PDE seraient capables d'activer la production d'IL-1 β de façon prolongée et d'induire sa sécrétion.

L'implication de différentes voies de signalisation dans l'expression d'un gène n'est cependant pas simple. L'activation des voies de signalisation MAPK Erk 1/2 et p38 conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1. Or, nous avons montré que le facteur AP-1 entre en compétition avec le facteur NF- κ B au niveau de l'élément *enhancer* positionné dans la partie distale du promoteur de l'IL-1 β . De plus, les mécanismes de régulation de l'expression de l'IL-1 β peuvent également faire intervenir d'autres facteurs de transcription comme le facteur CREB; facteur décrit comme un élément de régulation négative du promoteur du gène de l'IL-1 β dans la lignée monocyttaire U937 activée par le fibrinogène (ou fibrine) [Perez et coll., 1999]. Notre groupe a montré dans un travail précédent sur les fibroblastes humains qu'en plus de la voie Erk 1/2, les PDE activaient aussi la voie AMPc. En outre, non seulement ces deux voies interagissent pour transduire le signal provenant des PDE [Duca et coll., 2002], mais en plus elles ciblent toutes deux le facteur de transcription CREB [Deak et coll., 1998]. L'activation d'un tel facteur répresseur est tout à fait possible dans notre système puisque nous avons observé que l'inhibition de la voie Erk 1/2 augmente le niveau d'expression de l'ARNm de l'IL-1 β . Le mécanisme impliqué pourrait alors être le suivant : les facteurs de transcription CREB et AP-1 peuvent former des dimères hétérologues, ce qui a pour conséquence de réduire leur affinité vis-à-vis des éléments *cis* AP-1, laissant la place libre pour le facteur de transcription NF- κ B au niveau de l'*enhancer* du promoteur du gène codant pour l'IL-1 β (schéma 30).

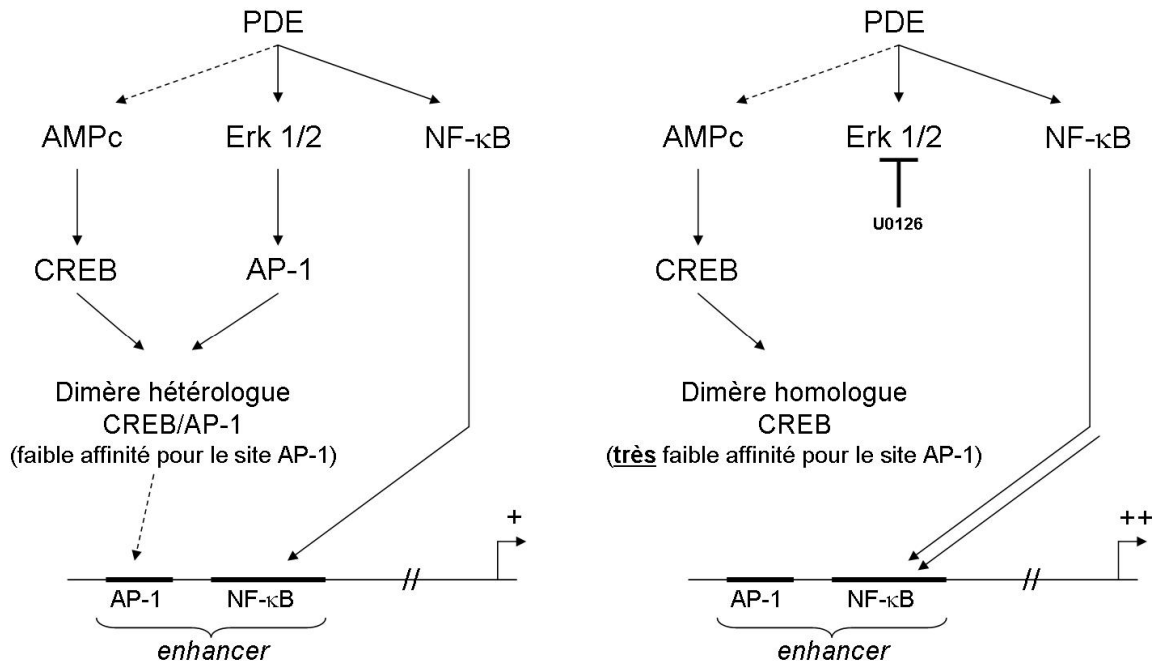


Schéma 30 : Hypothèse de régulation croisée des facteurs de transcription dans les cellules de mélanome par les PDE

La stimulation du récepteur S-gal par les PDE conduit à l'expression de l'IL-1 β par un mécanisme NF- κ B dépendant. Ce résultat est en accord avec les travaux de Roman et collaborateurs qui ont montré que l'activation des cellules monocytaires U937 par la laminine, qui possède le même récepteur que les peptides d'élastine, stimule également l'expression de l'IL-1 β de façon NF- κ B dépendante [Roman et coll., 1999]. Le fait que les PDE activent la voie NF- κ B dans les cellules de mélanome est un élément important. En effet, il est considéré que NF- κ B joue un rôle privilégié dans l'acquisition du caractère agressif du mélanome. NF- κ B est même présenté aujourd'hui comme une cible pharmacologique potentielle pour les traitements de cette tumeur [Amiri et Richmond, 2005]. En conséquence, les PDE, comme les autres agonistes activant la voie NF- κ B, peuvent donc être considérés comme des facteurs aggravant des processus cancéreux en facilitant la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui jouent le rôle de véritables facteurs de croissances (IL-1 β , IL-8 et GRO α dans le cas du mélanome).

L'activation du facteur de transcription AP-1 suite à l'interaction des PDE avec leur récepteur S-gal est aussi un mécanisme important, d'une part il module les effets du facteur de transcription NF- κ B et d'autre part il participe à la régulation de la

plupart des gènes codant pour les MMPs, protéinases impliquées dans les mécanismes d'invasion du mélanome [Hofmann et coll., 2005].

Le choix des voies de signalisation activées consécutivement à la stimulation d'un récepteur joue donc un rôle important par les interactions croisées de ces voies sur la stimulation des facteurs de transcription et donc sur l'expression des gènes cibles. Sachant que les PDE activent plusieurs voies de signalisation, il paraît donc très important de déterminer l'ensemble de ces gènes cibles dont l'expression est modifiée suite à l'activation du récepteur S-gal. En effet, ce sont en fait les effets combinés de différentes molécules pouvant avoir soit des effets synergiques, soit des effets anti-coopératifs, qu'il faudrait considérer pour réellement comprendre les mécanismes relatifs aux différentes étapes du développement tumoral. Dans ce travail, nous avons montré des interactions entre les PDE et l'IL-1 β et suggéré l'implication de molécules « relais ». Dans cet optique et dans le but de compléter l'étude de ces interactions, il est indispensable, en plus des molécules exprimées par les cellules de mélanome, d'intégrer celles provenant des cellules environnant la tumeur (fibroblastes, cellules inflammatoires et cellules de l'immunité).

3. Influence des PDE sur la différenciation de cellules T : Application au mélanome

3.1. PDE et autres composants matriciels dans la polarisation des lymphocytes T

Nous avons montré au cours de notre travail de thèse que les PDE sont capables de polariser les lymphocytes T vers un profil de type Th1. C'est-à-dire un profil de sécrétion favorisant la synthèse d'IL-2 et d'IFN γ au détriment de cytokines telles que l'IL-5 ou l'IL-10. Lors de leur maturation et de leur différenciation dans le thymus et au cours de leur circulation à travers les tissus périphériques, les cellules T traversent l'architecture tridimensionnelle de la MEC. Ce parcours implique que les cellules T interagissent avec différents constituants de la MEC. L'interaction des cellules T avec les macromolécules matricielles permet leur migration à travers le réseau matriciel. Par ailleurs, les signaux émis lors de l'interaction de certains

composés de la MEC avec la surface membranaire des cellules T permet de moduler les fonctions de ces cellules [Kuznetsova et Roberts, 2004].

Plusieurs exemples de la régulation des fonctions lymphocytaires T par des protéines matricielles ont été décrits dans la littérature. Ainsi, il a été démontré que la fixation de la thrombospondine-1 (TSP-1) matricielle sur son récepteur CD47 exprimé à la surface des cellules T naïves inhibe la différenciation de ces cellules vers un profil de type Th1 [Avice et coll., 2000]. Par cet effet la TSP-1 s'opposerait aux effets induits par les PDE. L'intégrine $\alpha 4\beta 1$, autre récepteur de la TSP-1 à la surface des lymphocytes T, est quant à elle impliquée dans l'effet chimiotactique de la TSP-1 vis-à-vis du lymphocyte et dans l'expression de MMPs par la cellule T [Li et coll., 2002]. La TSP-1 se lie à ses différents récepteurs par des séquences distinctes. Lorsque cette macromolécule est dégradée en fragments plus petits, la résultante des effets observés sur l'activation ou l'inhibition des fonctions lymphocytaires peut être totalement différente par rapport aux effets de la molécule entière [Ticchioni et coll., 2001] [Avice et coll., 2001]. À l'opposé, l'activation des lymphocytes T par l'ostéopontine stimule la prolifération lymphocytaire et la production de cytokines de type Th1 ($\text{IFN}\gamma$, IL-12) via sa liaison à l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. De même, l'ostéopontine interagissant avec la molécule CD44 à la surface du lymphocyte diminue le niveau d'expression de l'IL-10 (cytokine Th2) [O'Regan et coll., 2000]. Ainsi et contrairement à la TSP-1, l'ostéopontine est un activateur matriciel ayant des effets comparables à ceux des PDE sur les lymphocytes T. Il est important de noter qu'en comparaison de la TSP-1 et de l'ostéopontine, les PDE n'exercent leurs effets que sous la forme de peptides (matrikines) issus de la dégradation de l'élastine matricielle et que cet effet est médié par un récepteur spécifique de ces peptides.

En résumé, il apparaît que différentes macromolécules et/ou peptides matriciels peuvent influencer la différenciation, l'activation et la polarisation des lymphocytes T. Dans un contexte pathologique où coexiste une forte composante inflammatoire, ce qui est le cas du mélanome, la polarisation des lymphocytes T vers un profil cytokinique donné va dépendre d'une part du rapport quantitatif des macromolécules constituant localement la MEC, et, d'autre part, de l'état de dégradation de cette matrice.

3.2. Rôle potentiel des PDE dans la réponse immunitaire dirigée contre le mélanome

3.2.1. La médiation cellulaire T anti-mélanome

Le mélanome est une tumeur extrêmement immunogène servant de modèle dans la plupart des études sur l'immunité anti-cancéreuse. L'antigène tumoral le plus étudié est l'antigène de différenciation du mélanome melanA/MART-1 vis-à-vis duquel une réponse cellulaire T spécifique a été décrite [Nagorsen et coll., 2003]. L'immunité anti-tumorale est liée à la progression du mélanome. Ainsi, la fréquence des cellules T du sang périphérique dirigées contre les antigènes tumoraux est significativement augmentée chez des patients en stade III et IV (AJCC) comparativement à des patients en stade I et II [Mortarini et coll., 2003]. Différentes données de la littérature montrent l'existence naturelle de cellules T circulantes capables de surveiller l'apparition de cellules tumorales et de limiter très précocement leur développement [Pittet et coll., 1999] [Dutoit et coll., 2002] [Mortarini et coll., 2003]. Cependant les cellules T dirigées contre les antigènes tumoraux n'acquièrent leur efficacité optimale qu'après un développement suffisant de la tumeur [Dutoit et coll., 2002]. Dans le contexte du mélanome, la présentation des antigènes tumoraux se fait majoritairement dans une restriction CMH de classe I, ce qui explique la prédominance d'une immunité anti-tumorale véhiculée par les lymphocytes T CD8⁺. Toutefois, l'inefficacité de cette immunité peut être expliquée par le fait que les cellules CD8⁺ présentes au site tumoral peuvent présenter des défauts de maturation ne leur permettant pas une action cytolytique optimale contre les cellules tumorales [Mortarini et coll., 2003]. Une explication plausible à ce défaut de maturation serait l'absence de clones CD4⁺ *auxiliaires* en quantité suffisante dans l'environnement de la tumeur. En effet, les lymphocytes CD4⁺ Th1 sont impliqués dans la phase de développement et de maturation des effecteurs cytotoxiques [Komenaka et coll., 2004]. Par ailleurs, dans le cas d'une polarisation Th2 des cellules CD4⁺, la fonction *auxiliaire* se traduit par le recrutement des lymphocytes B et la libération d'anticorps se fixant sur un antigène présent à la surface de la cellule tumorale ce qui conduit à la mise en place d'une activité cytotoxique dépendante des anticorps [Komenaka et coll., 2004]. Cependant, la fonction *auxiliaire* n'est pas déficiente chez tous les patients. Ainsi, dans le cas de l'antigène NY-ESO-1 (présent dans 1/3 des tumeurs de mélanome), la réponse immunitaire peut être humorale

(Th2) ou cellulaire (Th1) [Zarour et coll., 2002]. Dans le cas particulier de la polarisation Th1, les cellules $CD4^+$ vont activer les clones $CD8^+$ présents au site tumoral pour qu'ils exercent leurs effets cytotoxiques par la libération de granzymes et perforines après reconnaissance de l'antigène à la surface de la cellule tumorale. Mais, les cellules $CD4^+$ Th1 peuvent également exercer, dans certaines conditions, un effet cytotoxique direct contre les cellules de mélanome [Komenaka et coll., 2004].

En résumé, les cellules de mélanome expriment des antigènes très immunogènes reconnus principalement par des cellules T $CD8^+$. En présence de clones $CD4^+$, plusieurs stratégies de défenses immunitaires peuvent être mises en place selon le profil Th1 ou Th2 de ces cellules.

3.2.2. Implication des PDE dans la défense anti-tumorale appliquée au mélanome

Nous avons démontré que les PDE induisent une polarisation Th1 des cellules T, et nous avons vérifié que cette polarisation est effective dans la sous-population $CD3^+CD4^+$. Ces résultats montrent qu'une forte dégradation de la MEC pourrait au travers de la synthèse de grandes quantités de peptides d'élastine, favoriser la présence dans l'environnement proche de la tumeur de lymphocytes T $CD4^+$ Th1. L'effet bénéfique de cette population cellulaire sur la progression tumorale peut prendre deux aspects. Premièrement, l'augmentation d'une population T $CD4^+$ Th1 à proximité de la tumeur permettrait de majorer les signaux impliqués dans la différenciation des lymphocytes T $CD8^+$ en effecteurs cytotoxiques efficaces contre la tumeur. Deuxièmement, la production d' $IFN\gamma$ par les lymphocytes T $CD4^+$ Th1 pourrait augmenter le niveau d'expression des molécules de classe II à la surface des cellules de mélanome, comme cela a été décrit dans la littérature [Garbe et Krasagakis, 1993], et ainsi améliorer l'effet cytotoxique direct des lymphocytes T $CD4^+$ vis-à-vis des cellules tumorales.

Par ailleurs, l'effet des PDE sur l'orientation d'un profil cytokinique de type 1 pourrait se retrouver avec les lymphocytes T $CD8^+$ en favorisant une polarisation de type *T-cytotoxic* (Tc)-1 ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$) de ces lymphocytes. Cette sous-population $CD8^+$ Tc1 a été décrite dans l'environnement du mélanome et semble capable de suppléer à un défaut de cytokines Th1 synthétisées par les lymphocytes T $CD4^+$ *auxiliaires* [Chakraborty et Mukherji, 1998]. Dans un tel contexte, les PDE

participeraient à une majoration de l'activité cytotoxique anti-tumorale en régulant la polarisation des cellules T CD8⁺. Cette hypothèse reste à confirmer.

CONCLUSIONS, PERSPECTIVES

Dans le but d'étudier l'influence de la dégradation des fibres élastiques sur la composante inflammatoire du mélanome, nous avons tout d'abord analysé la synthèse d'un facteur soluble pro-inflammatoire, l'IL-1 β . Nous avons montré que les PDE, en se liant à leur récepteur (S-gal) à la surface des cellules de mélanome, sont capables d'induire la synthèse d'IL-1 β . Cet effet est médié par l'activation du facteur de transcription NF- κ B p50/p65. Le rôle de NF- κ B en tant que promoteur de tumeur est clairement établi. Il a été démontré que l'inhibition de IKK β dans des cellules myéloïdes d'un modèle murin cancéreux résulte en une diminution importante de la taille de la tumeur simplement parce que les cellules myéloïdes ne peuvent plus sécréter de facteurs pro-inflammatoires [Greten et coll., 2004]. Cependant, bloquer l'activation de NF- κ B peut s'avérer dangereux et doit se faire de manière sélective ; si ce facteur favorise la prolifération des cellules cancéreuses et inhibe leur apoptose, NF- κ B est aussi largement impliqué dans d'autres activités cellulaires fondamentales comme la réponse immune hôte qui permet la surveillance des cellules cancéreuses [Greten et Karin, 2004]. En conséquence, une meilleure connaissance des mécanismes de régulation de la voie NF- κ B et des gènes cibles de ce facteur de transcription en fonction des différents stades de progression du mélanome pourrait permettre d'améliorer le diagnostic et le choix de la thérapie.

Les PDE interfèrent également dans la relation cancer/inflammation en induisant directement, via leur récepteur membranaire, la différenciation des cellules T vers un profil de sécrétion Th1 (IL-2, IFN γ) quelque soit l'état d'activation ou de polarisation préalable de ces cellules. L'immunité anti-cancéreuse dans le cadre du mélanome est généralement médiée par des clones CD8 $^{+}$ en raison de la présentation des antigènes tumoraux de mélanome qui se fait préférentiellement par le CMH de classe I. Il est avéré que ces réponses naturelles sont peu efficaces en raison du manque de cellules T CD4 $^{+}$ *auxiliaires* au site tumoral, ces cellules assurant l'induction de la cytotoxicité des cellules CD8 $^{+}$. Des stratégies thérapeutiques cherchent à ré-induire un profil de sécrétion Th1 au sein du pool lymphocytaire de l'hôte [Kalinski et coll., 2005]. Dans cette optique, les PDE pourraient être de bons candidats à l'induction de polarisation Th1 des lymphocytes *in vitro* aidant ainsi les défenses de l'hôte à limiter plus efficacement la prolifération des cellules tumorales après réinjection des lymphocytes polarisés vers la voie Th1.

Toutefois, de nombreux tests et examens sont encore nécessaires avant une éventuelle application.

Finalement nous avons montré que les effets des PDE et de l'IL-1 β s'inhibent. Le mécanisme impliqué dans cette inhibition reste toujours à déterminer. Cet effet inhibiteur a aussi été observé de façon indirecte en mesurant la capacité des milieux conditionnés de lymphocytes traités par les PDE à induire l'expression de l'IL-8 dans les cellules de mélanome. Ceci suggère de nouveau un rôle important de ces peptides dans la relation cancer/inflammation. Toutefois, dans nos expériences, nous avons extrapolé nos résultats obtenus sur les lymphocytes issus de donneurs sains à celui des lymphocytes infiltrants, il conviendrait d'étudier et de caractériser les profils sécrétoires de lymphocytes obtenus chez des patients atteints de mélanomes à divers stades et d'observer si les PDE sont également capables d'une part de polariser ces cellules vers un profil Th1, et, d'autre part, d'interférer avec les facteurs solubles sécrétés par les lymphocytes. Une étude comparative des profils de sécrétion des cytokines/chimiokines provenant de lymphocytes circulants et infiltrants isolés chez des patients sera prochainement développée dans notre laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

Publications dans des revues internationales

- 2005** Debret R, Le Naour R, Sallenave LM, Hornebeck W, Guenounou M, Bernard P, and Antonicelli F. Elastin Fragments Induce IL-1 β up-regulation via NF- κ B Pathway in Melanoma Cells. Soumis à *J Invest Dermatol*.
- Duca L, Lambert E, Debret R, Rothhut B, Blanchevove C, Delacoux F, Hornebeck W, Martiny L, and Debelle L (2005) Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. *Mol Pharmacol* **67**:1315-24.
- Debret R, Antonicelli F, Theill A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, and Le Naour R (2005) Elastin-derived peptides induce a T-helper type 1 polarization of human blood lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:1353-8.
- 2004** Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W, and Bernard P (2004) Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* **122**:256-65.
- 2003** Debret R, El Btaouri H, Duca L, Rahman I, Radke S, Haye B, Sallenave JM, and Antonicelli F (2003) Annexin A1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in BZR cells. *FEBS Lett* **546**:195-202.
- 2002** Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebeck W, and Haye B (2002) The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett* **524**:193-8.

Communications

Par voie d'affichage

- 2005** 30th FEBS congress, Budapest
 "S-gal-Elastin receptor triggering by matrix-derived-peptides induces a potential up-regulation loop through IL-1 β expression and NF- κ B activation in melanoma cells"
- XIVème réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif, Cologne
 "Elastin-derived peptides induce a potential up-regulation loop through IL-1 β expression and NF- κ B activation in melanoma cells"
- 2004** European Society for Dermatological Research meeting, Vienne
 "Elastin-derived peptides up-regulate IL-1 β expression in melanoma cells"

3rd European Elastin Symposium, Manchester

"Elastin-derived peptides up-regulate IL-1 β expression in melanoma cells"

Congrès Annuel pour la Recherche en Dermatologie, Nice

"Elastin-derived peptides induce differential regulation of IL-1 β and GRO α in melanoma cells"

2002 Collagen and skin: from basic research to clinic, Reims

"Specifically modulation of IL-2 and IFN γ expression by elastin peptides in normal T lymphocytes and Jurkat cells"

Communications orales

2005 Journées Dermatologiques de Paris, Paris

"Les peptides d'élastine stimulent la synthèse d'IL-1 β via NF- κ B dans les cellules de mélanome : une nouvelle voie favorisant l'invasion tumorale"

2002 European Study Group for Cell Proliferation, Reims

"Annexin A1, a potential candidate for Ceramides-induced apoptosis mediation"

RÉFÉRENCES

1. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, and Tschopp J (2004) NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**:319-25.
2. Akashi K, Reya T, Dalma-Weiszhausz D, and Weissman IL (2000) Lymphoid precursors. *Curr Opin Immunol* **12**:144-50.
3. Amiri KI and Richmond A (2005) Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**:301-13.
4. Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, and Rubartelli A (2004) Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 β secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9745-50.
5. Anichini A, Vegetti C, and Mortarini R (2004) The paradox of T-cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **53**:855-64.
6. Archilla-Marcos M and Robert L (1993) Control of the biosynthesis and excretion of the elastase-type protease of human skin fibroblasts by the elastin receptor. *Clin Physiol Biochem* **10**:86-91.
7. Arlt A and Schafer H (2002) NF κ B-dependent chemoresistance in solid tumors. *Int J Clin Pharmacol Ther* **40**:336-47.
8. Avice MN, Rubio M, Sergerie M, Delespesse G, and Sarfati M (2000) CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol* **165**:4624-31.
9. Avice MN, Rubio M, Sergerie M, Delespesse G, and Sarfati M (2001) Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *J Immunol* **167**:2459-68.
10. Bakiri L, Matsuo K, Wisniewska M, Wagner EF, and Yaniv M (2002) Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol* **22**:4952-64.
11. Bakouche O, Brown DC, and Lachman LB (1987) Liposomes expressing IL 1 biological activity. *J Immunol* **138**:4256-62.
12. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, and Thompson JF (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **19**:3635-48.
13. Baldwin AS, Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**:649-83.

14. Barone LM, Faris B, Chipman SD, Toselli P, Oakes BW, and Franzblau C (1985) Alteration of the extracellular matrix of smooth muscle cells by ascorbate treatment. *Biochim Biophys Acta* **840**:245-54.
15. Bashir MM, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Rosenbloom JC, Abrams W, Fazio M, Uitto J, and Rosenbloom J (1989) Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. *J Biol Chem* **264**:8887-91.
16. Beuscher HU, Gunther C, and Rollinghoff M (1990) IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor. *J Immunol* **144**:2179-83.
17. Bisaccia F, Castiglione-Morelli MA, Spisani S, Ostuni A, Serafini-Fracassini A, Bavoso A, and Tamburro AM (1998) The amino acid sequence coded by the rarely expressed exon 26A of human elastin contains a stable beta-turn with chemotactic activity for monocytes. *Biochemistry* **37**:11128-35.
18. Bisaccia F, Morelli MA, De Biasi M, Traniello S, Spisani S, and Tamburro AM (1994) Migration of monocytes in the presence of elastolytic fragments of elastin and in synthetic derivatives. Structure-activity relationships. *Int J Pept Protein Res* **44**:332-41.
19. Bjorkdahl O, Dohlsten M, and Sjogren HO (2000) Vaccination with B16 melanoma cells expressing a secreted form of interleukin-1beta induces tumor growth inhibition and an enhanced immunity against the wild-type B16 tumor. *Cancer Gene Ther* **7**:1365-74.
20. Black RA, Kronheim SR, Cantrell M, Deeley MC, March CJ, Prickett KS, Wignall J, Conlon PJ, Cosman D, Hopp TP, and et al. (1988) Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *J Biol Chem* **263**:9437-42.
21. Blood CH, Sasse J, Brodt P, and Zetter BR (1988) Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol* **107**:1987-93.
22. Blood CH and Zetter BR (1989) Membrane-bound protein kinase C modulates receptor affinity and chemotactic responsiveness of Lewis lung carcinoma sublines to an elastin-derived peptide. *J Biol Chem* **264**:10614-20.
23. Borel A, Eichenberger D, Farjanel J, Kessler E, Gleyzal C, Hulmes DJ, Sommer P, and Font B (2001) Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem* **276**:48944-9.
24. Brassart B, Fuchs P, Huet E, Alix AJ, Wallach J, Tamburro AM, Delacoux F, Hays B, Emonard H, Hornebeck W, and Debelle L (2001) Conformational

-
- dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* **276**:5222-7.
25. Brassart B, Randoux A, Hornebeck W, and Emonard H (1998) Regulation of matrix metalloproteinase-2 (gelatinase-A, MMP-2), membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression by elastin-derived peptides in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Clin Exp Metastasis* **16**:489-500.
 26. Bressan GM, Argos P, and Stanley KK (1987) Repeating structure of chick tropoelastin revealed by complementary DNA cloning. *Biochemistry* **26**:1497-503.
 27. Bressan GM and Prockop DJ (1977) Is newly-secreted elastin cleaved to a smaller molecule before being incorporated into crosslinked elastin fibers? *Adv Exp Med Biol* **79**:443-51.
 28. Brettell LM and McGowan SE (1994) Basic fibroblast growth factor decreases elastin production by neonatal rat lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**:306-15.
 29. Brown PL, Mecham L, Tisdale C, and Mecham RP (1992) The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that stabilizes a loop structure and positively charged pocket. *Biochem Biophys Res Commun* **186**:549-55.
 30. Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**:1-27.
 31. Burns K, Martinon F, and Tschopp J (2003) New insights into the mechanism of IL-1 β maturation. *Curr Opin Immunol* **15**:26-30.
 32. Busslinger M, Nutt SL, and Rolink AG (2000) Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol* **12**:151-8.
 33. Callahan JW (1999) Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure-function studies of lysosomal beta-galactosidase and the non-lysosomal beta-galactosidase-like protein. *Biochim Biophys Acta* **1455**:85-103.
 34. Castelli C, Sensi M, Lupetti R, Mortarini R, Panceri P, Anichini A, and Parmiani G (1994) Expression of interleukin 1 alpha, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha genes in human melanoma clones is associated with that of mutated N-RAS oncogene. *Cancer Res* **54**:4785-90.
 35. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, and et al. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**:97-100.

36. Chakraborty NG and Mukherji B (1998) Human melanoma-specific, noncytolytic CD8+ T cells that can synthesize type I cytokine. *Cancer Res* **58**:1363-6.
37. Chen XP, Enioutina EY, and Daynes RA (1997) The control of IL-4 gene expression in activated murine T lymphocytes: a novel role for neu-1 sialidase. *J Immunol* **158**:3070-80.
38. Chinenov Y and Kerppola TK (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* **20**:2438-52.
39. Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, and Mantovani A (1993) Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* **261**:472-5.
40. Dandie GW, Clydesdale GJ, Radcliff FJ, and Muller HK (2001) Migration of Langerhans cells and gammadelta dendritic cells from UV-B-irradiated sheep skin. *Immunol Cell Biol* **79**:41-8.
41. Darnell JE, Jr., Kerr IM, and Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**:1415-21.
42. Davidson JM, LuValle PA, Zoia O, Quagliano D, Jr., and Giro M (1997) Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms. *J Biol Chem* **272**:345-52.
43. de Sousa M (1971) Kinetics of the distribution of thymus and marrow cells in the peripheral lymphoid organs of the mouse: ecotaxis. *Clin Exp Immunol* **9**:371-80.
44. Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, and Alessi DR (1998) Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* **17**:4426-41.
45. Debelle L, Alix AJ, Jacob MP, Huvenne JP, Berjot M, Sombret B, and Legrand P (1995) Bovine elastin and kappa-elastin secondary structure determination by optical spectroscopies. *J Biol Chem* **270**:26099-103.
46. Debenedictis C, Joubert S, Zhang G, Barria M, and Ghohestani RF (2001) Immune functions of the skin. *Clin Dermatol* **19**:573-85.
47. Deftos ML and Bevan MJ (2000) Notch signaling in T cell development. *Curr Opin Immunol* **12**:166-72.
48. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M, and Davis RJ (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**:1025-37.

49. Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, and Davis RJ (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**:682-5.
50. Devesa SS, Blot WJ, Stone BJ, Miller BA, Tarone RE, and Fraumeni JF, Jr. (1995) Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst* **87**:175-82.
51. Di Santo JP, Radtke F, and Rodewald HR (2000) To be or not to be a pro-T? *Curr Opin Immunol* **12**:159-65.
52. Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**:2095-147.
53. Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**:503-8.
54. Dinarello CA (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* **20**:S1-13.
55. Dinarello CA (2005) Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* **201**:1355-9.
56. Duca L (2004) Etude des voies de signalisation induites par les peptides d'élastine dans les fibroblastes dermiques humains. Application à la régulation de la production de la pro-MMP-1 dans le cadre de la réaction stromale. *Thèse d'Université nouveau régime, Université de Reims Champagne-Ardenne*.
57. Duca L, Debelle L, Debret R, Antonicelli F, Hornebeck W, and Haye B (2002) The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling. *FEBS Lett* **524**:193-8.
58. Duca L, Floquet N, Alix AJ, Haye B, and Debelle L (2004) Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:235-44.
59. Duca L, Lambert E, Debret R, Rothhut B, Blanchevaye C, Delacoux F, Hornebeck W, Martiny L, and Debelle L (2005) Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. *Mol Pharmacol* **67**:1315-24.
60. Dutoit V, Rubio-Godoy V, Pittet MJ, Zippelius A, Dietrich PY, Legal FA, Guillaume P, Romero P, Cerottini JC, Houghten RA, Pinilla C, and Valmori D (2002) Degeneracy of antigen recognition as the molecular basis for the high frequency of naive A2/Melan-a peptide multimer(+) CD8(+) T cells in humans. *J Exp Med* **196**:207-16.

61. Faris B, Ferrera R, Toselli P, Nambu J, Gonnerman WA, and Franzblau C (1984) Effect of varying amounts of ascorbate on collagen, elastin and lysyl oxidase synthesis in aortic smooth muscle cell cultures. *Biochim Biophys Acta* **797**:71-5.
62. Faury G, Garnier S, Weiss AS, Wallach J, Fulop T, Jr., Jacob MP, Mecham RP, Robert L, and Verdetti J (1998) Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ Res* **82**:328-36.
63. Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, and Verdetti J (1998) Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:2967-72.
64. Fazio MJ, Mattei MG, Passage E, Chu ML, Black D, Solomon E, Davidson JM, and Uitto J (1991) Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet* **48**:696-703.
65. Fenton MJ, Vermeulen MW, Clark BD, Webb AC, and Auron PE (1988) Human pro-IL-1 beta gene expression in monocytic cells is regulated by two distinct pathways. *J Immunol* **140**:2267-73.
66. Flesch IE, Hess JH, Huang S, Aguet M, Rothe J, Bluethmann H, and Kaufmann SH (1995) Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **181**:1615-21.
67. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, and Saklatvala J (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* **78**:1039-49.
68. Fulop T, Jr., Jacob MP, Varga Z, Foris G, Leovey A, and Robert L (1986) Effect of elastin peptides on human monocytes: Ca²⁺ mobilization, stimulation of respiratory burst and enzyme secretion. *Biochem Biophys Res Commun* **141**:92-8.
69. Fulop T and Larbi A (2002) Putative role of 67 kDa elastin-laminin receptor in tumor invasion. *Semin Cancer Biol* **12**:219-29.
70. Galjart NJ, Morreau H, Willemsen R, Gillemans N, Bonten EJ, and d'Azzo A (1991) Human lysosomal protective protein has cathepsin A-like activity distinct from its protective function. *J Biol Chem* **266**:14754-62.
71. Gallis B, Prickett KS, Jackson J, Slack J, Schooley K, Sims JE, and Dower SK (1989) IL-1 induces rapid phosphorylation of the IL-1 receptor. *J Immunol* **143**:3235-40.
72. Garbe C and Krasagakis K (1993) Effects of interferons and cytokines on melanoma cells. *J Invest Dermatol* **100**:239S-244S.

73. Gay NJ and Keith FJ (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**:355-6.
74. Ghuysen-Itard AF, Robert L, and Jacob MP (1992) [Effect of elastin peptides on cell proliferation]. *C R Acad Sci III* **315**:473-8.
75. Gimond C and Aumailley M (1992) Cellular interactions with the extracellular matrix are coupled to diverse transmembrane signaling pathways. *Exp Cell Res* **203**:365-73.
76. Glimcher LH and Murphy KM (2000) Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* **14**:1693-711.
77. Godfrey DI and Zlotnik A (1993) Control points in early T-cell development. *Immunol Today* **14**:547-53.
78. Goto M, Katayama KI, Shirakawa F, and Tanaka I (1999) Involvement of NF-kappaB p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1beta gene at two subregions of the upstream enhancer element. *Cytokine* **11**:16-28.
79. Graves KL and Roman J (1996) Fibronectin modulates expression of interleukin-1 beta and its receptor antagonist in human mononuclear cells. *Am J Physiol* **271**:L61-9.
80. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, and Ju G (1995) Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* **270**:13757-65.
81. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, and Karin M (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* **118**:285-96.
82. Greten FR and Karin M (2004) The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* **206**:193-9.
83. Gronich J, Konieczkowski M, Gelb MH, Nemenoff RA, and Sedor JR (1994) Interleukin 1 alpha causes rapid activation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation in rat mesangial cells. *J Clin Invest* **93**:1224-33.
84. Grosso LE and Scott M (1993) PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine and human tropoelastin, is chemotactic for neutrophils and Lewis lung carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys* **305**:401-4.
85. Grosso LE and Scott M (1993) PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine tropoelastin, is a ligand for the 67-kDa bovine elastin receptor. *Matrix* **13**:157-64.
86. Haass NK, Smalley KS, Li L, and Herlyn M (2005) Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* **18**:150-9.

87. Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, and Thompson RW (2002) Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg* **35**:254-61.
88. Hauck M, Seres I, Kiss I, Saulnier J, Mohacsi A, Wallach J, and Fulop T, Jr. (1995) Effects of synthesized elastin peptides on human leukocytes. *Biochem Mol Biol Int* **37**:45-55.
89. Hawkins PN, Lachmann HJ, Aganna E, and McDermott MF (2004) Spectrum of clinical features in Muckle-Wells syndrome and response to anakinra. *Arthritis Rheum* **50**:607-12.
90. Healy JI and Goodnow CC (1998) Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* **16**:645-70.
91. Heby O, Marton LJ, Wilson CB, and Martinez HM (1975) Polyamines: a high correlation with cell replication. *FEBS Lett* **50**:1-4.
92. Heguy A, Baldari CT, Macchia G, Telford JL, and Melli M (1992) Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and the Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J Biol Chem* **267**:2605-9.
93. Hew Y, Grzelczak Z, Lau C, and Keeley FW (1999) Identification of a large region of secondary structure in the 3'-untranslated region of chicken elastin mRNA with implications for the regulation of mRNA stability. *J Biol Chem* **274**:14415-21.
94. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, and Karin M (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* **7**:2135-48.
95. Hinek A (1996) Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor. *Biol Chem* **377**:471-80.
96. Hinek A, Jung S, and Rutka JT (1999) Cell surface aggregation of elastin receptor molecules caused by suramin amplified signals leading to proliferation of human glioma cells. *Acta Neuropathol (Berl)* **97**:399-407.
97. Hinek A, Molossi S, and Rabinovitch M (1996) Functional interplay between interleukin-1 receptor and elastin binding protein regulates fibronectin production in coronary artery smooth muscle cells. *Exp Cell Res* **225**:122-31.
98. Hinek A, Rabinovitch M, Keeley F, Okamura-Oho Y, and Callahan J (1993) The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J Clin Invest* **91**:1198-205.

99. Hinek A, Wrenn DS, Mecham RP, and Barondes SH (1988) The elastin receptor: a galactoside-binding protein. *Science* **239**:1539-41.
100. Hiscott J, Marois J, Garoufalidis J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, Pepin N, Lacoste J, Nguyen H, Bensi G, and et al. (1993) Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* **13**:6231-40.
101. Hodgson SV and Maher ER (1997) A practical guide to human cancer genetics, 2nd ed. Cambridge University Press: Cambridge.
102. Hoffman HM, Rosengren S, Boyle DL, Cho JY, Nayar J, Mueller JL, Anderson JP, Wanderer AA, and Firestein GS (2004) Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet* **364**:1779-85.
103. Hofmann UB, Houben R, Brocker EB, and Becker JC (2005) Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* **87**:307-14.
104. Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, and Chaplin DD (1991) Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:8485-9.
105. Hornebeck W, Emonard H, Monboisse JC, and Bellon G (2002) Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. *Semin Cancer Biol* **12**:231-41.
106. Hornebeck W, Tixier JM, and Robert L (1986) Inducible adhesion of mesenchymal cells to elastic fibers: elastonection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:5517-20.
107. Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA, and et al. (1991) IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol* **147**:2964-9.
108. Hsu-Wong S, Katchman SD, Ledo I, Wu M, Khillan J, Bashir MM, Rosenbloom J, and Uitto J (1994) Tissue-specific and developmentally regulated expression of human elastin promoter activity in transgenic mice. *J Biol Chem* **269**:18072-5.
109. Hunninghake GW, Monks BG, Geist LJ, Monick MM, Monroy MA, Stinski MF, Webb AC, Dayer JM, Auron PE, and Fenton MJ (1992) The functional importance of a cap site-proximal region of the human prointerleukin 1 beta gene is defined by viral protein trans-activation. *Mol Cell Biol* **12**:3439-48.
110. Huwiler A and Pfeilschifter J (1994) Interleukin-1 stimulates de novo synthesis of mitogen-activated protein kinase in glomerular mesangial cells. *FEBS Lett* **350**:135-8.

111. Indik Z, Yoon K, Morrow SD, Cicila G, Rosenbloom J, Rosenbloom J, and Ornstein-Goldstein N (1987) Structure of the 3' region of the human elastin gene: great abundance of Alu repetitive sequences and few coding sequences. *Connect Tissue Res* **16**:197-211.
112. Itoh S, Hattori T, Hayashi H, Mizutani Y, Todo M, Takii T, Yang D, Lee JC, Matsufuji S, Murakami Y, Chiba T, and Onozaki K (1999) Antiproliferative effect of IL-1 is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase in human melanoma cell A375. *J Immunol* **162**:7434-40.
113. Jacob MP, Fulop T, Jr., Foris G, and Robert L (1987) Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:995-9.
114. Jacob MP, Hornebeck W, Lafuma C, Bernaudin JF, Robert L, and Godeau G (1984) Ultrastructural and biochemical modifications of rabbit arteries induced by immunization with soluble elastin peptides. *Exp Mol Pathol* **41**:171-90.
115. Janeway CA, Jr. (1999) T-cell development: a role for self-peptides in positive selection. *Curr Biol* **9**:R342-5.
116. Jarrous N and Kaempfer R (1994) Induction of human interleukin-1 gene expression by retinoic acid and its regulation at processing of precursor transcripts. *J Biol Chem* **269**:23141-9.
117. Jung S, Rutka JT, and Hinek A (1998) Tropoelastin and elastin degradation products promote proliferation of human astrocytoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**:439-48.
118. Kahari VM, Chen YQ, Bashir MM, Rosenbloom J, and Uitto J (1992) Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity. *J Biol Chem* **267**:26134-41.
119. Kahari VM, Olsen DR, Rhudy RW, Carrillo P, Chen YQ, and Uitto J (1992) Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation. *Lab Invest* **66**:580-8.
120. Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, Zeh HJ, Basse P, Bartlett DL, Kirkwood JM, Lotze MT, and Herberman RB (2005) Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* **5**:1303-15.
121. Kamisato S, Uemura Y, Takami N, and Okamoto K (1997) Involvement of intracellular cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in alpha-elastin-induced macrophage chemotaxis. *J Biochem (Tokyo)* **121**:862-7.

122. Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B, and Hornebeck W (1995) Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun* **3**:273-81.
123. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, and Grusby MJ (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* **382**:174-7.
124. Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**:16483-6.
125. Karin M and Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**:621-63.
126. Karin M, Liu Z, and Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**:240-6.
127. Kato T, Jr., Delhase M, Hoffmann A, and Karin M (2003) CK2 Is a C-Terminal IkkappaB Kinase Responsible for NF-kappaB Activation during the UV Response. *Mol Cell* **12**:829-39.
128. Kielty CM, Sherratt MJ, and Shuttleworth CA (2002) Elastic fibres. *J Cell Sci* **115**:2817-28.
129. Komenaka I, Hoerig H, and Kaufman HL (2004) Immunotherapy for melanoma. *Clin Dermatol* **22**:251-65.
130. Kominato Y, Galson D, Waterman WR, Webb AC, and Auron PE (1995) Monocyte expression of the human prointerleukin 1 beta gene (IL1B) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol Cell Biol* **15**:58-68.
131. Kracht M, Truong O, Totty NF, Shiroo M, and Saklatvala J (1994) Interleukin 1 alpha activates two forms of p54 alpha mitogen-activated protein kinase in rabbit liver. *J Exp Med* **180**:2017-25.
132. Krasagakis K, Garbe C, and Orfanos CE (1993) Cytokines in human melanoma cells: synthesis, autocrine stimulation and regulatory functions--an overview. *Melanoma Res* **3**:425-33.
133. Kucich U, Rosenbloom JC, Abrams WR, and Rosenbloom J (2002) Transforming growth factor-beta stabilizes elastin mRNA by a pathway requiring active Smads, protein kinase C-delta, and p38. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**:183-8.
134. Kuno K and Matsushima K (1994) The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol* **56**:542-7.

135. Kuo CT and Leiden JM (1999) Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol* **17**:149-87.
136. Kuznetsova SA and Roberts DD (2004) Functional regulation of T lymphocytes by modulatory extracellular matrix proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1126-34.
137. Kyriakis JM and Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**:807-69.
138. Labrousse AL, Ntayi C, Hornebeck W, and Bernard P (2004) Stromal reaction in cutaneous melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:269-75.
139. Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, and Timar J (2004) T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* **10**:521-30.
140. Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, and Falus A (2000) Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**:547-54.
141. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, and et al. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**:739-46.
142. Li G, Kalabis J, Xu X, Meier F, Oka M, Bogenrieder T, and Herlyn M (2003) Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma. *Oncogene* **22**:6891-9.
143. Li X, Commane M, Jiang Z, and Stark GR (2001) IL-1-induced NFkappa B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4461-5.
144. Li Z, Calzada MJ, Sipes JM, Cashel JA, Krutzsch HC, Annis DS, Mosher DF, and Roberts DD (2002) Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol* **157**:509-19.
145. Lin A and Karin M (2003) NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* **13**:107-14.
146. Loffek S, Zigrino P, Angel P, Anwald B, Krieg T, and Mauch C (2005) High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol* **124**:638-43.
147. Long MM, King VJ, Prasad KU, Freeman BA, and Urry DW (1989) Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* **140**:512-8.

148. Long MM, King VJ, Prasad KU, and Urry DW (1988) Chemotaxis of fibroblasts toward nonapeptide of elastin. *Biochim Biophys Acta* **968**:300-11.
149. Lovell DJ, Bowyer SL, and Solinger AM (2005) Interleukin-1 blockade by anakinra improves clinical symptoms in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease. *Arthritis Rheum* **52**:1283-6.
150. Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RS, and Halliday GM (1997) T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol* **108**:914-9.
151. Lukong KE, Landry K, Elsliger MA, Chang Y, Lefrancois S, Morales CR, and Pshezhetsky AV (2001) Mutations in sialidosis impair sialidase binding to the lysosomal multienzyme complex. *J Biol Chem* **276**:17286-90.
152. Lukong KE, Seyrantepe V, Landry K, Trudel S, Ahmad A, Gahl WA, Lefrancois S, Morales CR, and Pshezhetsky AV (2001) Intracellular distribution of lysosomal sialidase is controlled by the internalization signal in its cytoplasmic tail. *J Biol Chem* **276**:46172-81.
153. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, and Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity* **15**:825-35.
154. Mancilla J, Ikejima T, and Dinarello CA (1992) Glycosylation of the interleukin-1 receptor type I is required for optimal binding of interleukin-1. *Lymphokine Cytokine Res* **11**:197-205.
155. Manohar A and Anwar RA (1994) Evidence for a cell-specific negative regulatory element in the first intron of the gene for bovine elastin. *Biochem J* **300 (Pt 1)**:147-52.
156. Maquart FX, Bellon G, Pasco S, and Monboisse JC (2005) Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* **87**:353-60.
157. Marshall V (1974) Premalignant and malignant skin tumours in immunosuppressed patients. *Transplantation* **17**:272-5.
158. Martinon F, Burns K, and Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Mol Cell* **10**:417-26.
159. Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlow I, Joseph C, and Kolesnick RN (1993) Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 β . *Science* **259**:519-22.
160. Matsushima K, Taguchi M, Kovacs EJ, Young HA, and Oppenheim JJ (1986) Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL 1)

-
- activity and release of biologically active IL 1 from monocytes by trypsin and plasmin. *J Immunol* **136**:2883-91.
161. Mattei S, Colombo MP, Melani C, Silvani A, Parmiani G, and Herlyn M (1994) Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* **56**:853-7.
 162. Mauviel A, Chen YQ, Kahari VM, Ledo I, Wu M, Rudnicka L, and Uitto J (1993) Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **268**:6520-4.
 163. McDonnell PC, DiLella AG, Lee JC, and Young PR (1995) Localization of the human stress responsive MAP kinase-like CSAIDs binding protein (CSBP) gene to chromosome 6q21.3/21.2. *Genomics* **29**:301-2.
 164. Mecham RP (1991) Elastin synthesis and fiber assembly. *Ann N Y Acad Sci* **624**:137-46.
 165. Mecham RP, Hinek A, Entwistle R, Wrenn DS, Griffin GL, and Senior RM (1989) Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry* **28**:3716-22.
 166. Mecham RP, Hinek A, Griffin GL, Senior RM, and Liotta LA (1989) The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor. *J Biol Chem* **264**:16652-7.
 167. Medzhitov R and Janeway CA, Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**:4-9.
 168. Mehta VB, Hart J, and Wewers MD (2001) ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* **276**:3820-6.
 169. Menashi S, Hornebeck W, Robert L, and Legrand Y (1989) Elastase-like activity in cultured aortic endothelial cells. *Thromb Res* **53**:11-8.
 170. Mochizuki S, Brassart B, and Hinek A (2002) Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* **277**:44854-63.
 171. Monsurro V, Wang E, Panelli MC, Nagorsen D, Jin P, Katia Z, Smith K, Ngalame Y, Even J, and Marincola FM (2003) Active-specific immunization against melanoma: is the problem at the receiving end? *Semin Cancer Biol* **13**:473-80.
 172. Morreau H, Galjart NJ, Gillemans N, Willemsen R, van der Horst GT, and d'Azzo A (1989) Alternative splicing of beta-galactosidase mRNA generates the classic

-
- lysosomal enzyme and a beta-galactosidase-related protein. *J Biol Chem* **264**:20655-63.
173. Morreau H, Galjart NJ, Willemsen R, Gillemans N, Zhou XY, and d'Azzo A (1992) Human lysosomal protective protein. Glycosylation, intracellular transport, and association with beta-galactosidase in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **267**:17949-56.
 174. Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Bersani I, Bono A, Bartoli C, Santinami M, Lombardo C, Ravagnani F, Cascinelli N, Parmiani G, and Anichini A (2003) Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res* **63**:2535-45.
 175. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, and Coffman RL (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**:2348-57.
 176. Mott JD and Werb Z (2004) Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* **16**:558-64.
 177. Munoz E, Beutner U, Zubiaga A, and Huber BT (1990) IL-1 activates two separate signal transduction pathways in T helper type II cells. *J Immunol* **144**:964-9.
 178. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, and Murphy TL (2000) Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* **18**:451-94.
 179. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, and Keilholz U (2003) Natural T cell immunity against cancer. *Clin Cancer Res* **9**:4296-303.
 180. Ntayi C (2003) Implication des métalloprotéinases matricielles-1 et -2 dans l'invasion du mélanome : régulation par le collagène de type I et les peptides d'élastine. *Thèse d'Université nouveau régime, Université de Reims Champagne-Ardenne*.
 181. Ntayi C, Labrousse AL, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W, and Bernard P (2004) Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol* **122**:256-65.
 182. Nutt SL, Vambrie S, Steinlein P, Kozmik Z, Rolink A, Weith A, and Busslinger M (1999) Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nat Genet* **21**:390-5.
 183. O'Regan AW, Hayden JM, and Berman JS (2000) Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results

-
- in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol* **68**:495-502.
184. Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal BB, and Oppenheim JJ (1985) Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol* **135**:3962-8.
 185. Ooyama T, Fukuda K, Oda H, Nakamura H, and Hikita Y (1987) Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro. *Arteriosclerosis* **7**:593-8.
 186. Pacifici R, Carano A, Santoro SA, Rifas L, Jeffrey JJ, Malone JD, McCracken R, and Avioli LV (1991) Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* **87**:221-8.
 187. Pardo A and Selman M (1999) Proteinase-antiproteinase imbalance in the pathogenesis of emphysema: the role of metalloproteinases in lung damage. *Histol Histopathol* **14**:227-33.
 188. Parker DC (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* **11**:331-60.
 189. Parry GC and Mackman N (1994) A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain kappa B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J Biol Chem* **269**:20823-5.
 190. Partridge SM, Davis HF, and Adair GS (1955) The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *Biochem J* **61**:11-21.
 191. Pasco S, Ramont L, Maquart FX, and Monboisse JC (2004) Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**:221-33.
 192. Pasquali-Ronchetti I and Baccarani-Conti M (1997) Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech* **38**:428-35.
 193. Perez RL, Ritzenthaler JD, and Roman J (1999) Transcriptional regulation of the interleukin-1beta promoter via fibrinogen engagement of the CD18 integrin receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**:1059-66.
 194. Perez RL and Roman J (1995) Fibrin enhances the expression of IL-1 beta by human peripheral blood mononuclear cells. Implications in pulmonary inflammation. *J Immunol* **154**:1879-87.
 195. Perlis C and Herlyn M (2004) Recent advances in melanoma biology. *Oncologist* **9**:182-7.

196. Perregaux D and Gabel CA (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* **269**:15195-203.
197. Peterszegi G, Robert AM, and Robert L (1996) Presence of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes. *C R Acad Sci III* **319**:799-803.
198. Peterszegi G and Robert L (1998) Cell death induced in lymphocytes expressing the elastin-laminin receptor by excess agonists: necrosis and apoptosis. *Biomed Pharmacother* **52**:369-77.
199. Peterszegi G, Texier S, and Robert L (1999) Cell death by overload of the elastin-laminin receptor on human activated lymphocytes: protection by lactose and melibiose. *Eur J Clin Invest* **29**:166-72.
200. Piechaczyk M and Blanchard JM (1994) c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol* **17**:93-131.
201. Pierce RA, Deak SB, Stolle CA, and Boyd CD (1990) Heterogeneity of rat tropoelastin mRNA revealed by cDNA cloning. *Biochemistry* **29**:9677-83.
202. Pierce RA, Mariencheck WI, Sandefur S, Crouch EC, and Parks WC (1995) Glucocorticoids upregulate tropoelastin expression during late stages of fetal lung development. *Am J Physiol* **268**:L491-500.
203. Pittet MJ, Valmori D, Dunbar PR, Speiser DE, Lienard D, Lejeune F, Fleischhauer K, Cerundolo V, Cerottini JC, and Romero P (1999) High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals. *J Exp Med* **190**:705-15.
204. Poggi A and Mingari MC (1995) Development of human NK cells from the immature cell precursors. *Semin Immunol* **7**:61-6.
205. Polsky D and Cordon-Cardo C (2003) Oncogenes in melanoma. *Oncogene* **22**:3087-91.
206. Privitera S, Prody CA, Callahan JW, and Hinek A (1998) The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem* **273**:6319-26.
207. Pui JC, Allman D, Xu L, DeRocco S, Karnell FG, Bakkour S, Lee JY, Kadesch T, Hardy RR, Aster JC, and Pear WS (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* **11**:299-308.

208. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, and Aguet M (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**:547-58.
209. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, and Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**:7420-6.
210. Raju K and Anwar RA (1987) A comparative analysis of the amino acid and cDNA sequences of bovine elastin a and chick elastin. *Biochem Cell Biol* **65**:842-5.
211. Rao P, Hsu KC, and Chao MV (1995) Upregulation of NF-kappa B-dependent gene expression mediated by the p75 tumor necrosis factor receptor. *J Interferon Cytokine Res* **15**:171-7.
212. Reiser K, McCormick RJ, and Rucker RB (1992) Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *Faseb J* **6**:2439-49.
213. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I, and Uitto J (1994) Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. *Biochem J* **302** (Pt 2):331-3.
214. Rich CB, Fontanilla MR, Nugent M, and Foster JA (1999) Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription through an AP1/cAMP-response element hybrid site in the distal promoter. *J Biol Chem* **274**:33433-9.
215. Rich CB, Goud HD, Bashir M, Rosenbloom J, and Foster JA (1993) Developmental regulation of aortic elastin gene expression involves disruption of an IGF-I sensitive repressor complex. *Biochem Biophys Res Commun* **196**:1316-22.
216. Robinet A (2003) Régulation de l'expression et/ou de l'activation de la gélatinase A par deux peptides issus de la thrombospondine et de l'élastine: Implication dans l'invasion tumorale et l'angiogenèse. *Thèse d'Université nouveau régime, Université de Reims Champagne-Ardenne*.
217. Rodeck U and Herlyn M (1991) Growth factors in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **10**:89-101.
218. Rodolfo M, Daniotti M, and Vallacchi V (2004) Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Lett* **214**:133-47.
219. Roman J, Ritzenthaler JD, Perez RL, and Roser SL (1999) Differential modes of regulation of interleukin-1beta expression by extracellular matrices. *Immunology* **98**:228-37.

220. Rosenbloom J, Abrams WR, and Mecham R (1993) Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *Faseb J* **7**:1208-18.
221. Rosenbloom J, Bashir M, Kahari VM, and Uitto J (1991) Elastin genes and regulation of their expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **1**:145-56.
222. Rosenbloom J and Cywinski A (1976) Inhibition of proline hydroxylation does not inhibit secretion of tropoelastin by chick aorta cells. *FEBS Lett* **65**:246-50.
223. Rosoff PM, Savage N, and Dinarello CA (1988) Interleukin-1 stimulates diacylglycerol production in T lymphocytes by a novel mechanism. *Cell* **54**:73-81.
224. Ryseck RP, Novotny J, and Bravo R (1995) Characterization of elements determining the dimerization properties of RelB and p50. *Mol Cell Biol* **15**:3100-9.
225. Saunders NA and Grant ME (1984) Elastin biosynthesis in chick-embryo arteries. Studies on the intracellular site of synthesis of tropoelastin. *Biochem J* **221**:393-400.
226. Saurat JH, Grosshans E, Laugier P, and Lachapelle JM (1999) Dermatologie et maladies sexuellement transmissibles, 3ème ed. Masson: Paris.
227. Savino W, Mendes-da-Cruz DA, Silva JS, Dardenne M, and Cotta-de-Almeida V (2002) Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol* **23**:305-13.
228. Schaeffer HJ and Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**:2435-44.
229. Schenk S and Quaranta V (2003) Tales from the crypt[ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol* **13**:366-75.
230. Schindler R, Clark BD, and Dinarello CA (1990) Dissociation between interleukin-1 beta mRNA and protein synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* **265**:10232-7.
231. Schonbeck U, Mach F, and Libby P (1998) Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol* **161**:3340-6.
232. Schutze S, Machleidt T, and Kronke M (1994) The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukoc Biol* **56**:533-41.
233. Sen R and Baltimore D (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**:921-8.

234. Senior RM, Griffin GL, and Mecham RP (1980) Chemotactic activity of elastin-derived peptides. *J Clin Invest* **66**:859-62.
235. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, and Urry DW (1984) Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J Cell Biol* **99**:870-4.
236. Serkkola E and Hurme M (1993) Synergism between protein-kinase C and cAMP-dependent pathways in the expression of the interleukin-1 beta gene is mediated via the activator-protein-1 (AP-1) enhancer activity. *Eur J Biochem* **213**:243-9.
237. Shattuck RL, Wood LD, Jaffe GJ, and Richmond A (1994) MGSA/GRO transcription is differentially regulated in normal retinal pigment epithelial and melanoma cells. *Mol Cell Biol* **14**:791-802.
238. Shaulian E and Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**:2390-400.
239. Sheng M, Thompson MA, and Greenberg ME (1991) CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**:1427-30.
240. Shirakawa F, Saito K, Bonagura CA, Galson DL, Fenton MJ, Webb AC, and Auron PE (1993) The human prointerleukin 1 beta gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol Cell Biol* **13**:1332-44.
241. Shortman K, Vremec D, Corcoran LM, Georgopoulos K, Lucas K, and Wu L (1998) The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunol Rev* **165**:39-46.
242. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, and et al. (1988) cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* **241**:585-9.
243. Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, and Fidler IJ (1994) Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res* **54**:3242-7.
244. Singh RK and Varney ML (1998) Regulation of interleukin 8 expression in human malignant melanoma cells. *Cancer Res* **58**:1532-7.
245. Singh RK and Varney ML (2000) IL-8 expression in malignant melanoma: implications in growth and metastasis. *Histol Histopathol* **15**:843-9.
246. Sprent J (1994) T and B memory cells. *Cell* **76**:315-22.

247. Sprent J and Surh CD (2002) T cell memory. *Annu Rev Immunol* **20**:551-79.
248. Stamatos NM, Curreli S, Zella D, and Cross AS (2004) Desialylation of glycoconjugates on the surface of monocytes activates the extracellular signal-related kinases ERK 1/2 and results in enhanced production of specific cytokines. *J Leukoc Biol* **75**:307-13.
249. Stevenson FT, Torrano F, Locksley RM, and Lovett DH (1992) Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J Cell Physiol* **152**:223-31.
250. Stone PJ, Franzblau C, and Kagan HM (1982) Proteolysis of insoluble elastin. *Methods Enzymol* **82 Pt A**:588-605.
251. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, and Glimcher LH (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**:655-69.
252. Tajima S, Wachi H, Uemura Y, and Okamoto K (1997) Modulation by elastin peptide VGVAPG of cell proliferation and elastin expression in human skin fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **289**:489-92.
253. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, and Aggarwal BB (2003) Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **278**:24233-41.
254. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, and et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**:768-74.
255. Ticchioni M, Raimondi V, Lamy L, Wijdenes J, Lindberg FP, Brown EJ, and Bernard A (2001) Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow. *Faseb J* **15**:341-50.
256. Timar J, Lapis K, Fulop T, Varga ZS, Tixier JM, Robert L, and Hornebeck W (1991) Interaction between elastin and tumor cell lines with different metastatic potential; in vitro and in vivo studies. *J Cancer Res Clin Oncol* **117**:232-8.
257. Treier M, Staszewski LM, and Bohmann D (1994) Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**:787-98.
258. Treisman R (1992) The serum response element. *Trends Biochem Sci* **17**:423-6.
259. Tschoetschel U, Schwing J, Frosch S, Schmitt E, Schuppan D, and Reske-Kunz AB (1997) Modulation of proliferation and lymphokine secretion of murine CD4+

-
- T cells and cloned Th1 cells by proteins of the extracellular matrix. *Int Immunol* **9**:147-59.
260. Tsukada J, Saito K, Waterman WR, Webb AC, and Auron PE (1994) Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 beta gene. *Mol Cell Biol* **14**:7285-97.
 261. Tsurumi C, Ishida N, Tamura T, Kakizuka A, Nishida E, Okumura E, Kishimoto T, Inagaki M, Okazaki K, Sagata N, and et al. (1995) Degradation of c-Fos by the 26S proteasome is accelerated by c-Jun and multiple protein kinases. *Mol Cell Biol* **15**:5682-7.
 262. Tyler DS, Francis GM, Frederick M, Tran AH, Ordonez NG, Smith JL, Eton O, Ross M, and Grimm EA (1995) Interleukin-1 production in tumor cells of human melanoma surgical specimens. *J Interferon Cytokine Res* **15**:331-40.
 263. Uemura Y and Okamoto K (1997) Elastin-derived peptide induces monocyte chemotaxis by increasing intracellular cyclic GMP level and activating cyclic GMP dependent protein kinase. *Biochem Mol Biol Int* **41**:1085-92.
 264. Uitto J (1979) Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases. *J Invest Dermatol* **72**:1-10.
 265. Uitto J, Christiano AM, Kahari VM, Bashir MM, and Rosenbloom J (1991) Molecular biology and pathology of human elastin. *Biochem Soc Trans* **19**:824-9.
 266. Uitto J, Hoffmann HP, and Prockop DJ (1976) Synthesis of elastin and procollagen by cells from embryonic aorta. Differences in the role of hydroxyproline and the effects of proline analogs on the secretion of the two proteins. *Arch Biochem Biophys* **173**:187-200.
 267. Urry DW, Sugano H, Prasad KU, Long MM, and Bhatnagar RS (1979) Prolyl hydroxylation of the polypentapeptide model of elastin impairs fiber formation. *Biochem Biophys Res Commun* **90**:194-8.
 268. van Dam H, Duyndam M, Rottier R, Bosch A, de Vries-Smits L, Herrlich P, Zantema A, Angel P, and van der Eb AJ (1993) Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *Embo J* **12**:479-87.
 269. van der Horst GT, Galjart NJ, d'Azzo A, Galjaard H, and Verheijen FW (1989) Identification and in vitro reconstitution of lysosomal neuraminidase from human placenta. *J Biol Chem* **264**:1317-22.
 270. Vannier E and Dinarello CA (1993) Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H₂ receptors in peripheral blood mononuclear cells: Comparison with IL-1 receptor antagonist. *J Clin Invest* **92**:281.

271. Varga Z, Jacob MP, Csongor J, Robert L, Leovey A, and Fulop T, Jr. (1990) Altered phosphatidylinositol breakdown after K-elastin stimulation in PMNLs of elderly. *Mech Ageing Dev* **52**:61-70.
272. Varga Z, Jacob MP, Robert L, Csongor J, and Fulop T, Jr. (1997) Age-dependent changes of K-elastin stimulated effector functions of human phagocytic cells: relevance for atherogenesis. *Exp Gerontol* **32**:653-62.
273. Varga Z, Jacob MP, Robert L, and Fulop T, Jr. (1989) Identification and signal transduction mechanism of elastin peptide receptor in human leukocytes. *FEBS Lett* **258**:5-8.
274. Verhoef PA, Estacion M, Schilling W, and Dubyak GR (2003) P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J Immunol* **170**:5728-38.
275. Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, and Haegeman G (2003) Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J* **22**:1313-24.
276. Viatour P, Merville MP, Bours V, and Chariot A (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci* **30**:43-52.
277. Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, and Apte RN (2003) IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:2645-50.
278. Vrhovski B and Weiss AS (1998) Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* **258**:1-18.
279. Weis-Fogh T and Anderson SO (1970) New molecular model for the long-range elasticity of elastin. *Nature* **227**:718-21.
280. Westermarck J and Kahari VM (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *Faseb J* **13**:781-92.
281. Wewers MD (2004) IL-1beta: an endosomal exit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10241-2.
282. Willis L (1952) Another finger in the dike. *Can Nurse* **48**:983-5.
283. Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, and Holtmann H (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J* **18**:4969-80.

284. Woods GM, Malley RC, and Muller HK (2005) The skin immune system and the challenge of tumour immunosurveillance. *Eur J Dermatol* **15**:63-9.
285. Wu L, Antica M, Johnson GR, Scollay R, and Shortman K (1991) Developmental potential of the earliest precursor cells from the adult mouse thymus. *J Exp Med* **174**:1617-27.
286. Yamamoto M, Akazawa K, Aoyagi M, Yamamoto N, and Yamamoto K (2002) Changes in elastin-binding protein in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri. *Cell Biol Int* **26**:441-9.
287. Yeh H, Anderson N, Ornstein-Goldstein N, Bashir MM, Rosenbloom JC, Abrams W, Indik Z, Yoon K, Parks W, Mecham R, and et al. (1989) Structure of the bovine elastin gene and S1 nuclease analysis of alternative splicing of elastin mRNA in the bovine nuchal ligament. *Biochemistry* **28**:2365-70.
288. Yusa T, Blood CH, and Zetter BR (1989) Tumor cell interactions with elastin: implications for pulmonary metastasis. *Am Rev Respir Dis* **140**:1458-62.
289. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, and Karin M (1997) The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**:243-52.
290. Zarour HM, Maillere B, Brusic V, Coval K, Williams E, Pouvelle-Moratille S, Castelli F, Land S, Bennouna J, Logan T, and Kirkwood JM (2002) NY-ESO-1 119-143 is a promiscuous major histocompatibility complex class II T-helper epitope recognized by Th1- and Th2-type tumor-reactive CD4+ T cells. *Cancer Res* **62**:213-8.
291. Zhang M and Parks WC (1999) Posttranscriptional regulation of lung elastin expression involves binding of a developmentally regulated cytosolic protein to an open-reading frame cis-element in the messenger RNA. *Chest* **116**:74S.
292. Zhang Y and Rom WN (1993) Regulation of the interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene by mycobacterial components and lipopolysaccharide is mediated by two nuclear factor-IL6 motifs. *Mol Cell Biol* **13**:3831-7.
293. Zheng W and Flavell RA (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**:587-96.

RESUME

La matrice extracellulaire constitue un réseau tridimensionnel servant de soutien aux tissus. Lors des processus immunitaires et d'invasion tumorale cette matrice est remodelée, permettant aux cellules des défenses et cancéreuses de migrer pour atteindre le site tumoral ou de coloniser des tissus distants. Les peptides issus de la dégradation matricielle ne sont pas inertes et peuvent influencer le comportement des cellules par l'intermédiaire de récepteurs membranaires localisés à leur surface. Il a été remarqué que l'élastine présente dans le derme subit une protéolyse importante au niveau du front d'invasion du mélanome. C'est également à cet endroit que les réponses immunes hôtes, représentées par de nombreux lymphocytes, luttent pour empêcher l'invasion très agressive des cellules de mélanome.

Notre travail a permis de montrer que les peptides issus de la dégradation de l'élastine (PDE) induisent, par l'intermédiaire de leur récepteur membranaire S-gal, une augmentation de la synthèse d'IL-1 β dans les cellules de mélanome. Cette cytokine est un facteur soluble pro-inflammatoire très puissant et a été démontrée comme étant un acteur important du développement métastatique du mélanome. Nous montrons par l'utilisation d'approches pharmacologiques et génétiques que les PDE induisent une surexpression de l'IL-1 β par la voie NF- κ B. Les voies de signalisation MAPK Erk 1/2 et p38 sont également activées par les PDE dans les cellules de mélanome. Toutefois ces voies ne participent pas directement à la régulation de l'expression de l'IL-1 β sous l'effet des PDE mais pourraient intervenir dans les mécanismes régulant l'amplitude de l'activation du promoteur de l'IL-1 β et sur la stabilisation du transcrit.

Une deuxième étude nous a permis de mettre en évidence que les PDE induisent un profil sécrétoire cytokinique particulier au sein de lymphocytes T issus de donneurs sains. Les analyses effectuées par cytométrie en flux montrent une augmentation des productions d'IFN γ et d'IL-2 (profil Th1), parallèlement à une inhibition des productions d'IL-5 et d'IL-10 (profil Th2) dans des lymphocytes T CD4⁺ activés par les PDE. Ces résultats confirmés par ELISA et RT-PCR ont également été observés pour différents états d'activation des lymphocytes : basal, activation par un agent mitogène (PHA), pré-orientation Th1 (par l'IL-12) ou Th2 (par l'IL-4). Dans ces cellules, les PDE induisent également l'expression de l'IL-1 β , l'activation de la voie MAPK Erk 1/2 et du facteur de transcription AP-1 impliqué dans la régulation de gènes tels que l'IL-2 et l'IFN γ .

L'ensemble de ces résultats montrent que si les PDE induisent des facteurs de mauvais pronostic au sein de cellules de mélanome notamment par l'activation de la voie NF- κ B, leur pouvoir polarisant Th1 sur les lymphocytes T est en revanche un élément important pour l'immunité anti-cancéreuse. Il sera donc important de poursuivre cette étude afin de déterminer plus précisément les répercussions que peut avoir une telle activation des lymphocytes par les PDE sur le comportement des cellules de mélanome.

MOTS CLES

Mélanome, lymphocytes, peptides d'élastine, signalisation, IL-1 β , polarisation Th1.