### Université de Reims Champagne-Ardenne

UFR Médecine

2008

### THESE

Présentée pour l'obtention du

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

Spécialité: Biochimie et Biologie Moléculaire

Soutenue publiquement le 12 mars 2008

Par

### **Marie-France D'ONOFRIO**

Née le 28 janvier 1977 à Charleville-Mézières (08)

### ETUDE *IN VITRO* DE MECANISMES ANTI-TUMORAUX INDUITS PAR LE LUMICANNE RECOMBINANT SUR LES CELLULES DE MELANOME

Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire CNRS UMR 6237, IFR 53 Interactions Cellules-Microenvironnement UFR Médecine de Reims

### Membres du jury

Rapporteurs :	Monsieur le Docteur Marek HAFTEK (Lyon)
	Monsieur le Docteur Patrick VERRANDO (Marseille)
Examinateurs :	Monsieur le Docteur Jean-Luc CONTET-AUDONNEAU (Nancy)
	Monsieur le Professeur François-Xavier MAQUART (Reims)
Directeur de thèse :	Monsieur le Docteur Yanusz WEGROWSKI (Reims)

A mes parents

A mon frère

A mes filleules

A Damien et Emilie

## Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein du laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, anciennement CNRS UMR 6198 et depuis janvier 2008, CNRS UMR 6237, IFR 53 Interactions Cellules-Microenvironnement de l'UFR Médecine de Reims.

Je tiens à témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart pour m'avoir, dans un premier temps, accueillie au sein du laboratoire puis, pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions qui soient.

Je remercie Monsieur le Docteur Yanusz Wegrowski qui a dirigé cette étude et pour m'avoir fait bénéficier de ses compétences tout au long de mon DEA et de ces années de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Marek Haftek ainsi que Monsieur le Docteur Patrick Verrando pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Je vous remercie d'avoir accepté de la juger et vous exprime ma reconnaissance.

Merci à Monsieur le Docteur Jean-Luc Contet-Audonneau pour sa participation à ce jury de thèse en tant qu'examinateur.

Je remercie Monsieur le Docteur Stéphane Brézillon, arrivé dans notre équipe au cours de ma thèse, pour son aide au cours de l'étude en microscopie laser confocale, tous ses conseils et sa disponibilité.

J'associe à ces remerciements Monsieur le Professeur Philippe Gillery, Mesdames et Messieurs les Docteurs Frank Antonicelli, Georges Bellon, Hervé Emonart, Roselyne Garnotel, William Hornebeck, Didier Marot, Jean-Claude Monboisse, Sylvie Pasco-Brassart et Laurent Ramont pour leurs multiples conseils et remarques au cours des réunions de recherche ou discussions au sein du laboratoire.

Que Madame Corinne Perreau, technicienne de la « lumican team », trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude et de mon profond respect. Tu m'as pris sous ton aile dès mon arrivée, tu m'as transmis ton savoir, tu étais de toutes les parties, les moments forts comme les moins forts. Merci pour tout Coco Darling.

Une pensée spéciale pour le Docteur Boris Vuillermoz. Mon p'tit Boris, tu étais là quand je suis arrivée dans la « lumican team », tu t'es occupé de moi et m'a montré la marche

à suivre ainsi que les pièges à éviter. Travailler avec toi a été un vrai plaisir. Tous mes vœux vous accompagnent, toi et ta petite famille.

Je remercie tous mes amis et collègues du laboratoire, Mesdames Martine Decarme, Aurélie Dupont-Déshorgue, Johanna Lorin, Christèle Sellier et Catherine Lejeune, les jeunes Docteurs Yannick Bontemps, Romain Debret, Jean-Hubert Cauchard, Fatouma Touré-Diabira, Stéphane Jaisson, Stéphane Poitevin, Nadia Sabbah, ainsi que Monsieur Cédric Zeltz et Mademoiselle Sandrine Kurdykowski à qui je souhaite "bon courage" pour la suite. Merci du fond du cœur pour ces moments qui resteront à jamais gravés.

Aux copines du labo : Alex ma louloute, nous sommes arrivées ensemble et tout de suite ça a fait « bang », que tous tes projets se réalisent, tu me manques. La Jess et Lulu, quel bonheur de vous avoir rencontrées, copain Nono aussi, j'ai hésité à te mettre dans ce paragraphe, mais finalement tu as toujours été comme une copine pour moi.

Pour les amis du DEA : Charlotte et Cyrille : je vous souhaite beaucoup de bonheur ; Christelle : merci pour ces moments de réconforts, à ton tour maintenant ; Thomas : un grand merci pour l'aide que tu m'as apportée pour les études en FACS et pour ta gentillesse ; Nadia et Céline : merci pour ces séances de thérapie de groupe autour d'un café.

Merci à Yves Gourdin, responsable du service reprographie, pour sa compétence et sa disponibilité.

Un grand merci à mes amis de toujours, ma famille et ma belle-famille.

Nul mot ne serait assez fort pour exprimer à quel point je remercie mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont soutenue sans condition pendant toutes ces années.

Merci également à ma p'tite Bichoune, mon frère, nous n'avons pas beaucoup eu l'occasion de nous voir ces derniers temps, j'espère que maintenant nous pourrons nous rattraper. Pensée pour Boudine.

Emilie, depuis ton arrivée dans ma vie, les fins de semaine ne sont pas très reposantes mais toujours ensoleillées. Reste comme tu es. Je t'adore.

Damien, merci d'être présent à mes côtés et de me soutenir comme tu le fais. J'espère que dès à présent tous nos projets pourront se réaliser. Je t'aime.

Enfin, je tiens à remercier le Cancéropôle du Grand Est ainsi que la ligue Nationale contre le Cancer (comité de la Marne) pour leur support financier.

# Sommaire

	Pages
Sommaire	1
Liste des Illustrations	9
Liste des Abréviations	15
Liste des Publications et Communications	19
Introduction	23
Généralités	25
CHAPITRE I : LA PEAU ET LE MELANOME	26
1- Structure de la peau	26
1.1- L'hypoderme	26
1.2- Le derme	26
1.3- La jonction dermo-épidermique	27
1.4- L'épiderme	29
1.4.1- Les kératinocytes	31
1.4.2- Les mélanocytes	31
1.4.2.1- Origine	31
1.4.2.2- Répartition	31
1.4.2.3- Caractéristiques	32
1.4.3- Les cellules de Langerhans	33
1.4.4- Les cellules de Merkel	33
2- La matrice extracellulaire dermique	33
2.1- Les collagènes	34
2.2- Les glycoprotéines matricielles	38
2.3- L'élastine	38
2.4- Les protéoglycannes	38
2.4.1- Introduction	38
2.4.1.1- Les glycosaminoglycannes (GAGs)	39
2.4.1.1.1 - L'acide hyaluronique	40
2.4.1.1.2- L'héparine et les héparanes sulfates	41
2.4.1.1.3- Les chondroïtines sulfates	42
2.4.1.1.4- Les dermatannes sulfates	43

2.4.1.1.5- Les kératannes sulfates	43
2.4.1.1.6- Nature de la liason glycanne - protéine des protéoglycannes	44
2.4.1.1.6.1- Liaison O-glycosidique	44
2.4.1.1.6.2- Liaison N-glycosidique	45
2.4.1.2- Classification des protéoglycannes	46
2.4.1.2.1- Les protéoglycannes intracellulaires	46
2.4.1.2.2- Les protéoglycannes membranaires	46
2.4.1.2.3- Les protéoglycannes de la matrice extracellulaire	46
2.4.1.2.3.1- La famille des hyalectannes	46
2.4.1.2.3.2- Protéoglycannes de membrane basale	48
2.4.1.2.3.3- La famille des petits protéoglycannes riches en	
leucine	49
2.4.1.2.3.3.1- Les SLRPs de la classe I	49
2.4.1.2.3.3.2- Les SLRPs de la classe II	50
2.4.1.2.3.3.3- Les SLRPs de la classe III	50
2.4.1.2.3.3.4- Les SLRPs de la classe IV	51
2.4.1.2.3.3.5- Les SLRPs de la classe V	51
2.4.1.2.3.3.6- Localisation des chaînes de GAGs	51
2.4.1.2.3.3.7- Rôles des LRRs des SLRPs	54
2.4.1.2.3.4- Les autres protéoglycannes de la matrice	
extracellulaire	56
2.4.2 Le lumicanne	56
2.4.2.1- Le lumicanne : gène et promoteur	57
2.4.2.2- Structure du lumicanne	59
2.4.2.2.1- Structure primaire	59
2.4.2.2 Structures secondaire et tertiaire	64
2.4.2.3- Régulation de l'expression du lumicanne	65
2.4.2.4- Dégradation du lumicanne	66
2.4.2.5- Effets biologiques du lumicanne	66
2.4.2.5.1-Interactions entre lumicanne et collagène de type I	66
2.4.2.5.2- Rôles du lumicanne dans les tissus	66
2.4.2.5.2.1- Au niveau de la cornée	66
2.4.2.5.2.2- Au niveau de la peau et des tendons	67
2.4.2.5.3- Rôle dans l'inflammation et dans la réponse immunitaire	67
2.4.2.6- Lumicanne et cancer	67
3- Le mélanome	68
3.1- Epidémiologie	68

3.1.1- Incidence et mortalité	68
3.1.2- Facteurs de risque	69
3.1.2.1- Les facteurs de risques constitutionnels	69
3.1.2.1.1- Les facteurs génétiques	69
3.1.2.1.2- Le phototype	69
3.1.2.1.3- La présence de <i>nævi</i>	70
3.1.2.1.4- Le xeroderma pigmentosum	70
3.1.2.1.5- L'immunodépression	70
3.1.2.2- Les facteurs de risques environnementaux	70
3.1.2.2.1- Le soleil	70
3.1.2.2.2- Les rayons ultraviolets artificiels	72
3.1.2.2.3- La photothérapie aux « UVA » ou « PUVA »	72
3.2- Diagnostic clinique et pronostic	73
3.2.1- Diagnostic clinique	73
3.2.2- Critères du pronostic	73
3.2.2.1- La profondeur d'invasion selon Clark et Mihm	73
3.2.2.2- L'indice de Breslow	73
3.3- Mécanisme d'invasion et de métastases	74
3.4- Classification anatomo-clinique des mélanomes	74
3.4.1- Le mélanome à extension superficielle	74
3.4.2- Le mélanome de Dubreuilh	75
3.4.3- Le mélanome acrolentigineux	76
3.4.4- Le mélanome nodulaire	77
CHAPITRE II : LES INTEGRINES : RECEPTEURS DE LA MATRICE	
EXTRACELLULAIRE	78
1- Structure des intégrines	78
1.1- Les domaines extracellulaires	79
1.2- Les domaines cytoplasmiques	81
2- Rôles généraux des intégrines et applications aux mélanomes	81
2.1- Rôle dans l'adhésion cellulaire	81
2.1.1- Adhésion des cellules à la matrice extracellulaire	81
2.1.2- Adhésion cellule-cellule	84
2.2- Voies de signalisation induites par les intégrines	84
2.2.1- Signalisation « inside-out »	85
2.2.2- Signalisation « outside-in »	86

2.2.3- Les différents événements cellulaires découlant des voies de signalisation	
induites par les intégrines	86
Matériels et Méthodes	88
CHAPITRE I : MATERIELS ET REACTIFS	89
1- Liste des fournisseurs de matériels	89
2- Liste des fournisseurs de réactifs et de milieux de culture cellulaire	90
3- Souches cellulaires utilisées	92
CHAPITRE II : METHODES	93
1- Hygiène et sécurité	93
2- Production du lumicanne humain recombinant	93
2.1- Construction du plasmide d'expression pQE30-HLUM	93
2.1.1- Amplification du plasmide pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO et du plasmide d'expression pQE30	93
2.1.1.1- Transformation des bactéries $\alpha$ DH5 et sélection sur agar	93
2.1.1.2- Culture des clones sélectionnés en milieu liquide	94
2.1.1.3- Extraction des plasmides (Plasmid Midi Kit)	94
2.1.2- Digestion enzymatique des plasmides pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO et pQE30	94
2.1.3- Extraction des fragments de restriction (Kit GENECLEAN®)	96
2.1.4- Ligation et transformation des bactéries par le plasmide d'expression	
pQE30-HLUM	96
2.2- Expression et purification du lumicanne humain recombinant	98
2.2.1- Culture bactérienne	98
2.2.2- Extraction du lumicanne recombinant des corps d'inclusion	98
2.2.3- Purification par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA superflow	98
2.2.4- Electrophorèse et Western Blotting du lumicanne recombinant	99
3- Production des peptides dérivés du lumicanne recombinant	100
3.1- Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-9 et production du peptide L 1-9	100
3.2- Construction du plasmide d'expression pQE31-L 4-9 et production du peptide L 4-9	100
4- Digestion du lumicanne par la MMP-2 et la MT1-MMP	103
4.1- Activation de la pro-MMP-2	103
4.2- Digestion du lumicanne	
4.3- Révélation des fragments de digestion	103
5- Evaluation de l'activité gélatinolytique par zymographie	104

5.1- Dosage des activités gélatinolytiques sécrétées dans le milieu	104
5.2- Dosage des activités gélatinolytiques des cellules	104
5.3- Zymographie	104
6- Mesure de l'expression de la MT1-MMP	105
7- Cultures de cellules	105
8- Méthodes colorimétriques de quantification cellulaire	106
8.1- Coloration au violet cristal	106
8.2- Coloration au May-Grünwald-Giemsa	106
8.3- Coloration au MTT	106
8.4- Coloration au WST-1	106
9- Mesure de viabilité cellulaire	107
10- Prolifération cellulaire	107
11- Mesure de l'effet du lumicanne sur l'apoptose	107
12- Migration et invasion cellulaire	108
12.1- Préparation des membranes des Transwell®	108
12.2- Préparation cellulaire	108
12.3- Quantification	108
13- Adhésion cellulaire	109
13.1- Mesure de l'effet des cations divalents sur l'adhésion	109
13.2- Inhibition de l'adhésion cellulaire	110
13.2.1- Par l'EDTA	110
13.2.2- Par les anticorps anti-intégrines	110
13.2.3 Par la rhodocétine	110
14- Cytométrie en flux	110
15- Microscopie laser confocale	111
15.1- Préparation des lamelles de verre, dépôt et fixation des cellules	111
15.2- Immunomarquage	111
16- Analyse statistique des résultats obtenus	112
Résultats	113
CHAPITRE I : EXPRESSION ET CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DU	
LUMICANNE RECOMBINANT	114
1- Expression du lumicanne recombinant par les bactéries IM109(DE3)	114
2- Purification du lumicanne recombinant	117
3- Rendement de production	117
4- Caractéristiques biochimiques du lumicanne recombinant	117
. Caracteristiques of continuinques au funneume recombinant	11/

4.1- Propriétés physico-chimiques du lumicanne recombinant	117
4.2- Essai de dégradation du lumicanne recombinant par la MMP-2 et la MT1-MMP	120
CHAPITRE II : EFFETS DU LUMICANNE RECOMBINANT SUR LES CELLULES	DE
MELANOME ET DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE ACTIVE	122
1- Expression de lumicanne par différents types de cellules	122
2- Recherche d'un effet cytotoxique du lumicanne recombinant	122
3- Effet du lumicanne sur la prolifération des cellules de mélanome A375	125
4- Recherche d'un effet apoptotique du lumicanne sur les cellules de mélanome A375	126
5- Effet du lumicanne recombinant sur la migration et l'invasion des cellules de mélanome	126
5.1- Effet du lumicanne recombinant sur la migration des cellules de mélanome	128
5.2- Effet du lumicanne recombinant sur l'invasion des cellules de mélanome	128
6- Effet du lumicanne recombinant sur l'expression et l'activité des métalloprotéinases	
matricielles	134
6.1- Etude de l'activité gélatinolytique par zymographie	134
6.2- Effet du lumicanne sur l'expression de la MT1-MMP par Western Blotting	134
7- Effet du lumicanne recombinant sur l'adhésion des cellules de mélanome	137
8- Détermination de la séquence peptidique active du lumicanne	140
8.1- Production du peptide L 1-9	140
8.2- Production du peptide L 4-9	140
8.3- Caractéristiques physico-chimiques des peptides issus du lumicanne produits	140
8.4- Effet des peptides L 1-9 et L 4-9 sur l'adhésion des cellules A375	142
8.5- Effet des peptides L 1-9 et L 4-9 sur la migration des cellules A375	142
CHAPITRE III : MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR DU LUMICANNE A LA	
SURFACE DES CELLULES DE MELANOME HUMAIN A375	144
1- Effet de l'EDTA et des cations divalents sur l'adhésion	144
2- Profil d'expression des intégrines à la surface des cellules A375	147
3- Mise en évidence de l' (des) intégrine(s) impliquée(s) dans l'adhésion des cellules A375	
au lumicanne	148
3.1- Recherche de la sous-unité d'intégrine $\beta$ impliquée	148
3.2- Recherche de la sous-unité d'intégrine $\alpha$ associée	148
4- Effet du lumicanne sur la distribution des sous-unités d'intégrines $\beta_1$ et $\alpha_2$ à la surface des	
cellules A375	154
5- Effet du lumicanne sur les fibres de stress d'actine du cytosquelette	156
6- Effet du lumicanne sur la formation des adhésions focales	157

Discussion	159
Conclusions et Perspectives	170
Références Bibliographiques	174
Annexes	195

# Liste des Illustrations

#### LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Structure de la peau.
- Figure 2 : Structure de la jonction dermo-épidermique.
- Figure 3 : Structure de l'épiderme.
- Figure 4 : Le mélanocyte.
- Figure 5 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant l'acide hyaluronique.
- Figure 6 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant l'héparine et les héparannes sulfates.
- Figure 7 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant les chondroïtines sulfates.
- Figure 8 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant les dermatannes sulfates.
- Figure 9 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant les kératannes sulfates.
- Figure 10 : Nature de la liaison glycanne-protéine cœur selon le type de GAG.
- Figure 11 : Dendrogramme phylogénétique et classification des SLRPs.
- Figure 12 : Structure des SLRPs.
- Figure 13 : Structure cristallographique de l'inhibiteur de ribonucléase pancréatique.
- Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la décorine.
- Figure 15 : Modélisation du fragment LRR10-12 de la fibromoduline.
- Figure 16 : Structure du gène du lumicanne.
- Figure 17 : Séquence promoteur du gène du lumicanne humain.
- Figure 18 : Comparaison de séquences protéiques du lumicanne de différentes espèces.
- Figure 19 : Représentation des 3 unités constituant le domaine central du lumicanne humain.
- Figure 20 : Séquence de l'ADNc codant le lumicanne humain et séquence en acides aminés correspondante.
- Figure 21 : Structure secondaire théorique du lumicanne de poulet ainsi que des sites potentiels de substitution par les chaînes de kératanne sulfate.
- Figure 22 : Structure 3D du lumicanne cornéen bovin.
- Figure 23 : Couches de la peau traversées par les différents UV.

- Figure 24 : Mélanome à extension superficielle.
- Figure 25 : Mélanome de Dubreuilh.
- Figure 26 : Mélanome acrolentigineux.
- Figure 27 : Mélanome nodulaire du pied.
- Figure 28: (A) Représentation schématique des domaines extracellulaires, transmembranaires et cytoplasmiques des intégrines hétérodimériques.
  (B) Représentation schématique des domaines I des sous-unités d'intégrine α et β.
- **Figure 29 :** Combinaisons existantes entre les diverses sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .
- Figure 30 : Les protéines de la signalisation intracellulaire et cascades de phosphorylation.
- Figure 31 : Evénements cellulaires déclenchés par les intégrines.
- Figure 32 : Construction du plasmide d'expression pQE30-HLUM.
- Figure 33: (A) Taille théorique des fragments de restriction attendus après digestion du plasmide d'expression pQE30-HLUM par les enzymes HindIII et/ou KpnI.
  (B) Profil électrophorétique de la digestion enzymatique du plasmide d'expression pQE30-HLUM par HindIII et/ou KpnI.
- Figure 34 : Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-9.
- Figure 35 : Construction du plasmide d'expression pQE31-L 4-9.
- Figure 36 : Séquence de l'ADNc codant le lumicanne recombinant et séquence en acides aminés correspondante.
- Figure 37 : (A) Séquence de la région N-terminale de l'ADNc du lumicanne humain inséré dans le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO et sites de clivage des enzymes de restriction KpnI et EcoRV.

(B) Séquence de la région N-terminale du lumicanne recombinant après insertion dans le cadre de lecture ouvert du plasmide pQE30 entre les sites de restriction KpnI et SmaI.

- Figure 38 : Profil comparatif d'expression des protéines par les bactéries JM109(DE3).
- Figure 39: (A) Mise en évidence par SDS-PAGE de la purification du lumicanne recombinant par chromatographie d'affinité sur résine de Ni-NTA Superflow.
  (B) Western Blotting utilisant un anticorps anti-lumicanne.
- Figure 40 : Cinétique de dégradation du lumicanne recombinant par la MMP-2 et la MT1-MMP.

- Figure 41 : Analyse en Western Blotting de la sécrétion de lumicanne dans le milieu de culture de plusieurs cellules.
- Figure 42 : Recherche d'un effet cytotoxique du lumicanne sur les cellules de mélanome humain A375.
- Figure 43 : Effet du lumicanne sur la prolifération des cellules A375.
- Figure 44 : Le lumicanne n'induit pas l'apoptose des cellules A375.
- Figure 45 : Observation des cellules B16F1 en microscopie optique.
- Figure 46 : Observation des cellules A375 en microscopie optique.
- Figure 47 : Effet du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome de souris B16F1.
- **Figure 48 :** Effet du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome humain A375.
- **Figure 49 :** Effet du lumicanne sur l'invasion des cellules de mélanome de souris B16F1 au travers d'une membrane basale artificielle de Matrigel<sup>®</sup>.
- **Figure 50 :** Effet du lumicanne sur l'invasion des cellules de mélanome humain A375 au travers d'une membrane basale artificielle de Matrigel<sup>®</sup>.
- Figure 51 : Zymogramme de milieu de culture de cellules A375.
- Figure 52 : Zymogramme d'extraits membranaires de cellules A375.
- Figure 53 : Effet du lumicanne sur l'expression de la MT1-MMP par les cellules A375.
- Figure 54 : Adhésion de différentes lignées de mélanome sur lumicanne.
- Figure 55 : Mesure de l'adhésion des cellules de mélanome de souris B16F1.
- **Figure 56 :** Mesure de l'adhésion des cellules de mélanome humain A375.
- Figure 57 : Comparaison des séquences en acides aminés du lumicanne recombinant et des peptides L 1-9 et L 4-9 produits.
- Figure 58 : Effet des peptides issus du lumicanne sur l'adhésion des cellules A375.
- Figure 59 : Effet des peptides issus du lumicanne sur la migration des cellules A375.
- Figure 60 : Effet de l'EDTA sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne.
- Figure 61 : Effet des cations divalents sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne.
- Figure 62 : Expression des intégrines à la surface des cellules de mélanome A375.
- Figure 63 : Effet de différents anticorps bloquants anti-intégrines sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne.
- Figure 64 : (A) Effet comparatif de l'anticorps anti-sous-unité β<sub>1</sub> sur l'adhésion des cellules A375 à la BSA, au lumicanne et au collagène de type I.
  (B) Effet concentration-dépendant de l'anticorps anti-sous-unité β<sub>1</sub> sur l'adhésion cellulaire au lumicanne.

- Figure 65 : Effet de la rhodocétine sur l'adhésion cellulaire à la BSA, au lumicanne et au collagène de type I.
- **Figure 66 :** Effet de l'anticorps anti- $\alpha_2\beta_1$  sur l'adhésion des cellules A375 à la BSA, au lumicanne et au collagène de type I.
- **Figure 67 :** Effet du lumicanne sur la distribution membranaire des sous-unités d'intégrine  $\beta_1$  et  $\alpha_2$ .
- Figure 68 : Effet du lumicanne sur le cytosquelette des cellules A375.
- Figure 69 : Effet du lumicanne sur la formation des complexes d'adhésion focale.

### LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Les différents types de collagènes.
Tableau II :	Les principales glycoprotéines de la matrice extracellulaire.
Tableau III :	Principaux protéoglycannes membranaires.
Tableau IV :	Principaux hyalectannes.
Tableau V :	Principaux protéoglycannes de membrane basale.
Tableau VI :	Principaux petits protéoglycannes riches en leucine.
Tableau VII :	Propriétés générales des autres protéoglycannes de la matrice
	extracellulaire.
Tableau VIII :	Tableau récapitulatif des diverses intégrines ainsi que leur(s) ligand(s)
	connu(s).
Tableau IX :	Expression des intégrines à la surface des mélanocytes et des cellules de
	mélanomes.
Tableau X :	Comparaison des propriétés physico-chimiques entre lumicanne humain
	et lumicanne recombinant.
Tableau XI :	Caractéristiques physico-chimiques des peptides issus du lumicanne.

# Liste des Abréviations

### LISTE DES ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APMA	P-Aminophenyl mercuric acetate
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
APS	Persulfate d'ammonium
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Albumine sérique bovine
cf	Confère
Da, kDa	Dalton, kilo Dalton
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (milieu minimum essentiel de
	Eagle modifié par Dulbecco)
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Acide Ethylene-diamine-tetraacetique
et al.	et alii (et les autres)
et coll.	et collaborateurs
GAGs	Glycosaminoglycannes
h, min, s	Heure, minute, seconde
НА	Acide hyaluronique
HEPES	Acide N-(2-hydroxyéthyl)-pipérazine-N'-2-éthane sulfonique
HMW	Marqueurs de haute masse moléculaire
HS	Héparannes sulfates
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule (molécules d'adhésion inter-cellulaire)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
KS	Kératannes sulfates
LB	Milieu de culture « Luria Bertani »
LMW	Marqueurs de faible masse moléculaire
M, mM, μM, nM	Mol/L, mmol/L, µmol/L, nmol/L

MEC	Matrice extracellulaire
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MT-MMP	Métalloprotéinase matricielle de type membranaire
MTT	3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide
m/v	masse/volume
Ni-NTA	Résine de Nickel-acide nitrilotriacétique
NS	Non significatif
Pb	Paires de bases
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
pHi	Point isoélectrique
PMSF	Phénylméthylsulfonylfluorure
PVDF	Difluorure de polyvinylidène
qsp	Quantité suffisante pour
rpm	Rotations par minute
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
	(Electrophorèse de polyacrylamide en présence de SDS, condition
	dénaturante)
SEM	Erreur standard de la moyenne
SLRPS	Small leucine-rich proteoglycans (petits protéoglycannes riches en
	leucine)
SVF	Sérum de veau fœtal
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TBS	Tris Buffer Saline
TBST	Tris Buffer Saline-Tween
TE	Tris-EDTA
ТМВ	3,3',5'5-Tetraméthylbenzidine
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyléthylènediamine
Tween-20	Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate
U	Unités d'activité enzymatique
u.a.	Unités arbitraires
UV	Ultra-violets

VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule (molécule d'adhésion de cellule
	vasculaire)
v/v	volume/volume
X	Coefficient de concentration des tampons et solutions (exemple: $2X =$
	concentré 2 fois)
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- galactopyranose

### Liste des Publications

X

# **Communications**

### LISTE DES PUBLICATIONS

Brézillon S, <u>D'Onofrio MF</u>; Radwanska A, Perreau C, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumican core protein causes disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions in melanoma cells.

Soumis pour publication.

<u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Roughley PJ, Maquart FX, Wegrowski Y. Identification of beta1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican. Biochem Biophys Res Commun 2008; 365(2): 266-272.

Brézillon S, Venteo L, Ramont L, <u>D'Onofrio MF</u>, Perreau C, Pluot M, Maquart FX, Wegrowski Y.

Expression of lumican, a small leucine-rich proteoglycan with antitumour activity, in human malignant melanoma.

Clin Exp Dermatol 2007; 32(4): 405-416.

Vuillermoz B, Khoruzhenko A, <u>D'Onofrio MF</u>, Ramont L, Venteo L, Perreau C, Antonicelli F, Maquart FX, Wegrowski Y.

The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. Exp Cell Res 2004; 296(2): 294-306.

#### LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

Lumican core protein increases melanoma cell adhesion through a β1-type integrin receptor. <u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Radwanska A, Brassart B, Roughley PJ, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX and Wegrowski Y. XVI<sup>ème</sup> réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif, 2007, Caen, France.

Lumican core protein increases melanoma cell adhesion through a  $\beta$ 1-type integrin receptor. <u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Radwanska A, Brassart B, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX and Wegrowski Y. Cancéropôle du Grand Est, III<sup>ème</sup> réunion annuelle de l'axe IV, 2007, Strasbourg, France.

Les cellules de mélanome humain A375 interagissent avec le lumicanne *via* la sous-unité d'intégrine β1. <u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Maquart FX et Wegrowski Y. Journée « Jeunes Chercheurs » de l'IFR 53, 2006, Reims, France.

Contrôle de l'invasion tumorale par une protéine matricielle : le lumicanne. <u>D'Onofrio MF</u>, Vuillermoz B, Khoruzhenko T, Perreau C, Maquart FX et Wegrowski Y. Journée « Jeunes Chercheurs » de l'IFR 53, 2004, Reims, France.

Le lumicanne, un petit proteoglycanne riche en leucine, inhibe la croissance tumorale par induction de l'apoptose. Vuillermoz B, Khoruzhenko T, <u>D'Onofrio MF</u>, Perreau C, Ramont L, Maquart FX et Wegrowski Y. Congrès de la Société Française du Tissu Conjonctif, 2004, Arcachon, France.

Lumican expression decreases tumor growth of mouse melanoma cells. Vuillermoz B, Khoruzhenko T, <u>D'Onofrio MF</u>, Perreau C, Ramont L, Maquart FX et Wegrowski Y. Pathobiology of proteoglycans 3<sup>rd</sup> international conference on proteoglycans, 2003, Parme, Italie.

L'expression de lumicanne par les cellules de mélanome murin inhibe la croissance tumorale. Vuillermoz B, Khoruzhenko T, <u>D'Onofrio MF</u>, Perreau C, Ramont L, Maquart FX et Wegrowski Y. Journée « Jeunes Chercheurs » de l'IFR 53, 2003, Reims, France.

#### LISTE DES COMMUNICATIONS PAR VOIE D'AFFICHE

Le lumicanne recombinant humain promeut l'adhésion des cellules de mélanome humain A375 *via* la sous-unité d'intégrine  $\beta$ 1. <u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Radwanska A, Brassart B, Roughley PJ, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX and Wegrowski Y. 1<sup>er</sup> forum du Cancéropôle du Grand Est, 2007, Vittel, France.

Mécanisme d'inhibition du mélanome par le lumicanne. <u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Radwanska A, Brassart B, Roughley PJ, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX and Wegrowski Y. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, 2007, Lyon, France. **Prix du meilleur poster.** 

Le lumicanne recombinant humain promeut l'adhésion des cellules de mélanome humain A375 *via* la sous-unité d'intégrine  $\beta$ 1. <u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Radwanska A, Brassart B, Roughley PJ, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX and Wegrowski Y. Journée « Jeunes Chercheurs » de l'IFR 53, 2007, Reims, France.

Le lumicanne recombinant humain promeut l'adhésion des cellules de mélanome humain A375 *via* la sous-unité d'intégrine β1. <u>D'Onofrio MF</u>, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Radwanska A, Brassart B, Roughley PJ, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX and Wegrowski Y. XVI<sup>ème</sup> réunion annuelle de la Société Française du Tissu Conjonctif, 2007, Caen, France.

Lumican is expressed in the peritumoral stroma of human malignant melanoma. Brézillon S, Venteo L, Ramont L, <u>D'Onofrio MF</u>, Perreau C, Pluot M, Maquart FX and Wegrowski Y. FECTS XX<sup>th</sup> & ISMB meeting, 2006, Oulu, Finlande.

L'expression de lumicanne par les cellules de mélanome murin inhibe la croissance tumorale. Vuillermoz B, Khoruzhenko T, <u>D'Onofrio MF</u>, Perreau C, Ramont L, Maquart FX et Wegrowski Y. Congrès de la société française du tissus conjonctif, 2003, Paris, France.

Le lumicanne inhibe la croissance du mélanome malin. Vuillermoz B., Khoruzhenko T., <u>D'Onofrio MF</u>, Perreau C, Ramont L, Maquart FX et Wegrowski Y. Congrès Annuel de Recherche Dermatologique, 2003, Rouen, France.

# Introduction

La matrice extracellulaire a longtemps été considérée comme un support architectural pour les cellules du tissu conjonctif. Des données récentes indiquent cependant que la matrice extracellulaire est un des éléments majeurs de régulation de l'activité cellulaire. Les macromolécules de la matrice extracellulaire sont capables d'interagir avec les cellules et d'induire des voies de transduction intracellulaire, conduisant à la modulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération, la migration...

Le lumicanne est une protéine appartenant à la famille des petits protéoglycannes riches en leucine de la matrice extracellulaire et qui est retrouvé sous forme glycosylée dans la matrice extracellulaire dermique ou sous forme protéoglycannique au niveau de la cornée. Des études ont montré que l'invalidation du gène du lumicanne conduit à un défaut de fibrillogenèse du collagène de type I se traduisant par une opacification cornéenne ainsi que par une fragilité accrue de la peau (Chakravarti et coll. 1998).

Le mélanome est une tumeur maligne dont l'incidence a très fortement augmenté ces dernières années. Les cellules cancéreuses, en particulier les cellules de mélanome, se développent au cours du processus tumoral selon une cinétique assez bien codifiée. Les cellules après un stade prolifératif, subissent tout d'abord une phase de croissance horizontale puis verticale et envahissent ensuite les tissus sains environnants. Après ces étapes, elles traversent les membranes basales et finissent par envahir les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour métastaser à distance.

Il a été démontré au laboratoire que le lumicanne est capable inhiber la progression tumorale des cellules de mélanome (Vuillermoz et coll. 2004 ; Brézillon et coll. 2007) or le mécanisme d'action anti-tumoral du lumicanne restait à élucider.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode de production et de purification de lumicanne humain recombinant dans un système procaryote.

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets induits par le lumicanne recombinant sur les cellules de mélanome et à la détermination de la séquence peptidique active.

Dans la dernière partie, nous nous sommes consacrés à l'identification du récepteur du lumicanne à la surface des cellules de mélanome A375 et à l'analyse des répercussions au niveau du cytosquelette.

# Généralités

### **CHAPITRE I : LA PEAU ET LE MELANOME**

#### 1- Structure de la peau

La peau est un organe de revêtement recouvrant la totalité de la surface du corps et en continuité avec les muqueuses au niveau des orifices naturels. Elle est l'organe le plus lourd, son poids est estimé à environ 3,5 kg, et le plus étendu de l'organisme, représentant une surface de 2 m<sup>2</sup>. L'épaisseur de la peau est de 2 mm en moyenne, mais elle peut varier de 1 mm au niveau des paupières (peau fine) à 4 mm au niveau des paumes et des plantes (peau épaisse) pour un adulte jeune et de taille moyenne (Mélissopoulos et Levacher 1998).

La peau est le siège de nombreuses fonctions : fonction de protection, fonction de thermorégulation, fonction sensorielle, fonction d'échange et fonctions métaboliques.

Sur le plan structural, la peau est constituée de trois couches distinctes superposées qui sont, de la profondeur vers la surface :

- l'hypoderme (ou tissus adipeux sous-cutané)

- le derme, séparé de l'épiderme par la jonction dermo-épidermique

- l'épiderme (auquel sont rattachés les annexes épidermiques, follicules pilo-sébacés, ongles et glandes sudoripares) (figure 1).

#### 1.1- L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu adipeux, matelas graisseux plus ou moins épais selon les régions du corps et le sexe, rattaché à la partie inférieure du derme par des expansions de fibres de collagènes et de fibres élastiques. L'hypoderme, par l'intermédiaire de ses cellules graisseuses, les adipocytes, stocke des lipides sous forme de triglycérides et fournit des acides gras en cas de demande énergétique. Il joue un rôle important dans la thermorégulation du fait du caractère isolant de la graisse.

#### 1.2- Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense qui constitue le support solide de la peau. Il renferme le système vasculaire de la peau (l'épiderme n'en possède pas) et joue un rôle important dans la thermorégulation. Il abrite également des fibres nerveuses et des récepteurs sensoriels. Il contient des cellules qui interviennent de façon active dans les mécanismes de défense de l'organisme contre les micro-organismes pathogènes. Le processus de réparation

constitue également une des fonctions essentielles des tissus conjonctifs. Son épaisseur varie considérablement d'un site anatomique à l'autre (maximale dans le dos, minimale sur les paupières). Le derme est subdivisé en deux zones, le derme papillaire (plus superficiel) et le derme réticulaire (plus profond). Le derme comporte une composante cellulaire et une composante matricielle.

La composante cellulaire est constituée essentiellement de fibroblastes qui sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire. Leur activité est intense au cours des phénomènes de cicatrisation. Ils jouent également un rôle dans la multiplication et la différenciation des kératinocytes de l'épiderme. Leur corps cellulaire est aplati et de forme stellaire ou allongé en fuseau, ils possèdent de fins prolongements de cytoplasme. Les autres cellules rencontrées dans le derme sont des cellules impliquées dans la défense de l'organisme : leucocytes, mastocytes et macrophages.

La composante matricielle du derme est décrite ci-après.

#### **1.3-** La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique est une membrane basale complexe jouant le rôle d'interface entre l'épiderme et le derme, élaborée conjointement par les kératinocytes basaux et les fibroblastes. Elle joue un rôle fondamental de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et contrôle les échanges de produits métaboliques entre ces deux compartiments. De plus, elle sert de support de migration des kératinocytes lors de la cicatrisation et est traversée par divers types cellulaires (cellules de Langerhans, lymphocytes,...) lors des processus immunologiques et inflammatoires. Sa structure à quatre étages distincts, visualisée en microscopie électronique à transmission, comprend de l'intérieur vers l'extérieur (figure 2) :

- la zone fibrillaire, synthétisée par les fibroblastes dermiques et constituée essentiellement de fibres d'ancrage de collagène de type VII (Burgeson 1993).
- la *lamina densa*, surtout élaborée par les kératinocytes, est majoritairement constituée de collagène de type IV et forme la zone d'ancrage des filaments et fibres issus de l'épiderme et de la zone fibrillaire. Elle est également constituée de laminine 1, de nidogène et de protéoglycannes.
- la *lamina lucida*, traversées par les filaments d'ancrage (riche en laminine 1, 5 et 6) qui sont plus nombreux au niveau des hémidesmosomes.
- la membrane plasmique des kératinocytes basaux avec leur structure d'attache : les hémidesmosomes. Ces derniers sont formés d'une plaque intracellulaire et de

composants transmembranaires qui constituent un lien permettant l'attachement des kératinocytes basaux de l'épiderme au derme adjacent.







**Figure 2 : Structure de la jonction dermo-épidermique.** Disponible à partir URL : http://alsim.chez-alice.fr/Intro.html

#### 1.4- L'épiderme

L'épiderme (figure 3) est la couche la plus superficielle de la peau. C'est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Son épaisseur varie d'un endroit à l'autre du corps : l'épiderme le plus épais se trouve au niveau palmo-plantaire (1,5 mm) et le plus fin au niveau des paupières (50  $\mu$ m) (Mélissopoulos et Levacher 1998). L'épiderme ne contient aucun vaisseau sanguin ni lymphatique, mais renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres. Il est criblé par les orifices pilo-sébacés (visibles à l'œil nu), d'où s'écoule le sébum et émergent les poils, et les pores par où s'évacue la sueur.

L'épiderme est constitué de quatre populations cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel.



Figure 3: Structure de l'épiderme. Disponible à partir URL : www.freethought-forum.com/forum/article.php
#### **1.4.1- Les kératinocytes**

Les kératinocytes sont les cellules épidermiques les plus nombreuses puisqu'elles représentent 80 à 90 % de la population cellulaire. Leur principale caractéristique est leur capacité à se différencier en fabriquant la kératine selon un processus appelé kératinisation. Les kératinocytes sont agencés dans l'épiderme en couches continues, qui comprennent (de la profondeur vers la surface) : la couche basale (rangée unique de cellules cubiques ou cylindriques), la couche épineuse (5 à 10 assises de cellules plus volumineuses et polyédriques, qui s'aplatissent au niveau des assises les plus superficielles), la couche granuleuse (1 à 3 assises de cellules aplaties) et la couche cornée comportant 5 à 10 assises de cellules (Kanitakis 1997 ; Peyrefitte 1997).

Au niveau de la couche cornée, les kératinocytes sont anucléés, aplatis et complètement kératinisés. On distingue deux sous-couches, la couche compacte ou *stratum compactum* (les kératinocytes y sont étroitement soudés) et la couche desquamante ou *stratum disjonctum* plus superficielle. A ce niveau, les kératinocytes perdent leur cohésion avec les cellules voisines (dégradation des cornéodesmosomes) puis desquament (Mélissopoulos et Levacher 1998).

#### 1.4.2- Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des cellules qui élaborent le pigment naturel de la peau (mélanine). Ils sont localisés au sein de la couche basale épidermique (figure 4).

#### 1.4.2.1- Origine

Les précurseurs des mélanocytes sont les mélanoblastes qui apparaissent dans la crête neurale embryonnaire. Les mélanoblastes empruntent la voie dorso-latérale entre l'ectoderme et le dermo-myotome et se différencient progressivement en mélanocytes et s'établissent au niveau de l'ectoderme en voie de différenciation épidermique (Mélissopoulos et Levacher 1998 ; Poirier et coll. 1999).

#### 1.4.2.2- Répartition

Ils représentent moins de 1 % des cellules épidermiques. Leur répartition à la surface du corps n'est pas homogène : ils sont retrouvés à raison de 2400/mm<sup>2</sup> sur les organes génitaux, 2000/mm<sup>2</sup> sur le visage et 890/mm<sup>2</sup> sur le tronc. Les mélanocytes reposent sur la lame basale de l'épiderme (figure 3) entre les kératinocytes de la couche basale mais ils sont retrouvés aussi au niveau des follicules pileux (papille, infundibulum). L'œil contient également des mélanocytes (Mélissopoulos et Levacher 1998).

# 1.4.2.3- Caractéristiques

Les mélanocytes sont des cellules de grande taille dont les nombreux prolongements (dendrites) peuvent atteindre la troisième couche de kératinocytes. En plus des organites habituels de la cellule, leur cytoplasme renferme des organites spécifiques, les mélanosomes. Ces organites sont ensuite transférés aux kératinocytes voisins où ils forment une calotte supranucléaire protégeant le matériel génétique de l'effet mutagène des rayons U. V. On définit une unité épidermique de mélanisation (UEM) comme l'ensemble formé par l'association d'un mélanocyte (qui synthétise la mélanine dans des mélanosomes) et d'une quarantaine de kératinocytes (qui reçoivent les mélanosomes de ce mélanocyte) (kanitakis 1997).



Figure 4 : Le mélanocyte. Disponible à partir URL : ttp://infocancer.nexenservices.com/

#### 1.4.3- Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans constituent 2 à 5 % de la population cellulaire épidermique. Leur densité est de 400 à 800/mm<sup>2</sup> et diminue chez les sujets âgés ainsi que dans les zones exposées au soleil. Ce sont des cellules dendritiques mobiles qui participent aux défenses immunitaires en captant les antigènes exogènes déposés sur la peau puis en les présentant aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques (Kanitakis 1997; Mélissopoulos et Levacher 1998).

#### 1.4.4- Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel sont localisées dans la couche basale de l'épiderme. Ce sont des cellules neuroendocrines produisant des neuromédiateurs (par exemple : la sérotonine et la neurotensine) et seraient impliquées dans la fonction du tact. Leurs prolongements cytoplasmiques infiltrés entre les kératinocytes enregistrent les moindres vibrations à l'intérieur de l'épiderme et les transmettent à des terminaisons nerveuses (Kanitakis 1997 ; Mélissopoulos et Levacher 1998).

#### 2- La matrice extracellulaire dermique

La matrice extracellulaire du derme comme celle de tous les tissus conjonctifs de l'organisme est composée de protéines appartenant à quatre grandes familles : les collagènes, les glycoprotéines matricielles, l'élastine et les protéoglycannes (Herbage et Wegrowski 1997). La biosynthèse des constituants de la matrice extracellulaire est assurée par les cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes, dans le cas du derme. Chaque protéine exerce une fonction particulière et la combinaison de toutes ces protéines assure à la matrice extracellulaire des propriétés structurales diversifiées ainsi qu'une importante capacité de régulation de l'activité cellulaire (Bosman et Stamenkovic 2003). Cet ensemble de macromolécules constitue, entre autre, une trame permettant l'adhésion et la migration cellulaire.

Les matrikines sont des fragments protéiques issus de la dégradation des macromolécules de la matrice extracellulaire qui peuvent être dotés d'activités régulatrices identiques ou différentes de celles exercées par la protéine dont ils sont issus (Maquart et coll. 2005). Les matrikines comprennent les matricryptines. Le terme de matricryptines a été proposé par Davis et coll. (2000) pour désigner des fragments biologiquement actifs, issus de

molécules de la matrice extracellulaire et contenant des sites cryptiques fonctionnels qui ne sont exposés qu'après une modification structurale ou conformationnelle de la molécule initiale.

Nous aborderons uniquement les quatre grandes classes de protéines de la matrice extracellulaire en développant tout particulièrement les protéoglycannes.

# 2.1- Les collagènes

Les protéines appartenant à la famille des collagènes sont les plus abondantes de l'organisme humain (25 à 30 % des protéines totales). Selon les tissus, elles peuvent représenter jusqu'à 80 % des protéines de la matrice extracellulaire et jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité structurale des tissus et organes chez l'homme (Ricard-Blum et Ruggiero 2005). Les collagènes présentent :

- une conformation en triple hélice, constituée par l'association de trois chaînes polypeptidiques enroulées en hélice, d'abord sur elles-mêmes, puis les unes autour des autres,

- un résidu de glycine tous les trois résidus d'acides aminés (motif répétitif de type Gly-X-Y),

- de nombreux résidus de proline et de 4-hydroxyproline

La fonction hydroxyle de l'hydroxyproline, relayée par une molécule d'eau, sert à établir des liaisons hydrogène à l'intérieur de l'hélice. Pour la plupart des types de collagènes, les domaines hélicoïdaux et non hélicoïdaux alternent. On appelle domaines « NC » (non collagéniques) les zones globulaires et domaines « COL » les segments en triple hélice.

Actuellement, vingt huit types de collagènes ont été décrits chez les vertébrés (tableau I). Plusieurs groupes ont été identifiés au regard de leurs structures et fonctions :

- les collagènes fibrillaires représentent environ 80 % du collagène dermique total,

- les collagènes FACIT (Fibril-Associated with Interrupted Triple helices),
- le collagène des membranes basales,

- deux autres collagènes particuliers, le collagène VI (à filaments perlés) et le collagène VII (formant des fibrilles d'ancrage),

- les collagènes à réseaux hexagonaux,

- les collagènes transmembranaires,

- les multiplexines (multiple triple helix domains and interruptions) s'associant aux membranes basales et

- d'autres collagènes encore mal connus (collagènes XVI, XXII et XXVIII).

**Tableau I : Les différents types de collagènes** (Van der Rest et Garrone 1991 ; Veit et coll. 2006) et disponible à partir de URL : http://www.nlm.nih.gov/sites/entrez/gene

Type de collagène	e Gène et localisation chromosomique Composition moléculaire		Localisation tissulaire		
		Collagènes fibrillaires			
I	COL1A1: 17q21.33	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Derme os dentine ligament tendon		
I	COL1A2: 7q22.1	[α1(I)] <sub>3</sub>	Denne, os, dentine, figament, tendon		
II	COL2A1: 12q13.11-q13.2	[α1(II)] <sub>3</sub>	Cartilage, humeur vitrée		
III	COL3A1: 2q31	[α1(III)] <sub>3</sub>	Derme, vaisseaux sanguins, intestin, gencive		
	COL5A1: 9q34.2-q34.3	$[\alpha_1(V)]_3$	Poumon, cornée, os, placenta		
V	COL5A2: 2q14-q32	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$			
	COL5A3: 19p13.2	$\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha 3(V)$			
	COL11A1: 1p21				
XI	COL11A2: 6p21.3	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	Cartilage, humeur vitrée		
	COL11A3: 12q13-14				
XXIV	COL24A1: 1p22.3	[α1(XXIV)] <sub>3</sub>	Os, cartilage, cornée, peau		
XXVII	COL27A1: 9q32	[a1(XXVII)] <sub>3</sub>	Cartilage, œil, oreille, poumon		

	Collagènes FACITs						
	COL9A1: 6q12-q14						
IX	COL9A2: 1p33-p32	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha 3(IX)$	Cartilage, cornée				
	COL9A3: 20q13.3						
XII	COL12A1: 6q12-q13	[α1(XII)] <sub>3</sub>	Derme, os, tendon, ligament				
XIV	COL14A1: 8q23	$[\alpha 1(XIV)]_3$	Derme, tendon, foie, vaisseaux				
XIX	COL19A1: 6q12-q13	$[\alpha 1(XIX)]_3$	Cerveau, œil, testicule				
XX	COL20A1: 20q13.33	[α1(XX)] <sub>3</sub>	Cartilage, cornée, peau, tendon				
XXI	COL21A1: 6p12.3-p11.2	$[\alpha 1(XXI)]_3$	Vaisseaux				
XXVI	COL26A1: 7q22.1	$[\alpha 1(XXVI)]_3$	Ovaire, testicule				
	Co	ollagène de membranes bas	sales				
	COL4A1 et COL4A2: 13q34						
W	COL4A3: 2q36-q37	Multiples associations	Rein, cristallin, aorte, poumon,				
IV	COL4A4: 2q35-q37		vaisseaux				
	COL4A5 et COL4A6: Xq22						
		Collagène à filaments perl	és				
VI	COL6A1 et COL6A2: 21q22.3	$\alpha 1(M) \alpha 2(M) \alpha 2(M)$	Dormo os placente cortilação				
COL6A3: 2q37		$u_1(v_1) u_2(v_1) u_3(v_1)$	Derme, os, placenta, cartilage				
	С	ollagène de fibrilles d'ancr	age				
VII	COL7A1: 3p21.1	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	Derme				

	Collagènes à réseau hexagonal							
VIII	COL8A1: 3q12.3 COL8A2: 1p34.2	$[\alpha 1(VIII)]_3$ $[\alpha 2(VIII)]_3$ $[\alpha 1(VIII)]_2 \alpha 2(VIII)$ $\alpha 1(VIII) [\alpha 2(VIII)]_2$	Membrane de Descemet de l'œil, paroi aortique					
X	COL10A1: 6q21-q22	$\alpha 1(X) \alpha 2(X) \alpha 3(X)$	Cartilage					
	Collagènes transmembranaires							
XIII	COL13A1: 10q22	$[\alpha 1(XIII)]_3$	Placenta, os, muscle					
XVII	COL17A1: 10q24.3	$[\alpha 1(XVII)]_3$	Epiderme					
XXIII	COL23A1: 5q35.3	[a1(XXIII)] <sub>3</sub>	Os, cartilage, cornée, poumon					
XXV	COL25A1: 4q25	$[\alpha 1(XXV)]_3$	Cerveau					
		Multiplexines						
XV	COL15A1: 9q21-q22	[α1(XV)] <sub>3</sub>	Membrane basale					
XVIII	COL18A1: 21q22.3	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	Foie, rein, capsule du cristallin					
		Collagènes résiduels						
XVI	COL16A1: 1p35-p34	[α1(XVI)] <sub>3</sub>	Placenta					
XXII	COL22A1: 8q24.23	$[\alpha 1(XXII)]_3$	Cartilage, tendon					
XXVIII	COL28A1: 7p21.3	$[\alpha 1(XXVIII)]_3$	Peau, nerfs périphériques, poumon, cœur					

#### 2.2- Les glycoprotéines matricielles

Les glycoprotéines de la matrice extracellulaire possèdent des structures et des propriétés fonctionnelles très diverses. Les glycoprotéines les plus connues sont la fibronectine, les ténascines, la vitronectine ou encore les thrombospondines (tableau II). Ces protéines spécifiques participent aux interactions matrice-matrice ou cellules-matrice. Elles sont par conséquent impliquées dans les phénomènes de migration et d'adhésion cellulaires (Johansson 1996). Comme pour les autres protéines de la matrice extracellulaire, plusieurs matrikines issues de cette classe de protéines matricielles ont été identifiées pour leurs activités biologiques et leur pouvoir de régulation des fonctions cellulaires (Maquart et coll. 2005).

#### 2.3- L'élastine

L'élastine est un élément de la matrice extracellulaire qui, associé à une composante microfibrillaire constituée principalement de glycoprotéines, comme les fibrillines et les « Microfibril-Associated Glycoproteins » (MAGP), forme les fibres élastiques (Kielty et coll. 2002). Ce polymère insoluble formé à partir d'un précurseur soluble, la tropoélastine, est synthétisé par les cellules mésenchymateuses (Rosenbloom et coll. 1993). Les fibres élastiques, composées à 95 % d'élastine, assurent les propriétés de souplesse et d'élasticité de tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques telles que les artères, les poumons ou la peau. Par ailleurs, les peptides issus de la dégradation de l'élastine possèdent de multiples activités biologiques, comme un pouvoir chimiotactique sur les cellules phagocytaires, comme la régulation de la prolifération de nombreux types cellulaires ou encore comme la stimulation de l'angiogenèse *in vitro* (Duca et coll. 2004; Robinet et coll. 2005).

#### 2.4- Les protéoglycannes

#### 2.4.1- Introduction

Les protéoglycannes sont des macromolécules constituées d'une partie protéique, appelée « core protein » ou protéine cœur, sur laquelle sont greffées de façon covalente, des chaînes glycanniques appelées glycosaminoglycannes (GAGs) (Naito 2005). Ils sont retrouvés à l'intérieur des cellules, à la surface des types cellulaires de mammifères et dans la matrice extracellulaire (Delehedde et coll. 2002).

# Tableau II : Les principales glycoprotéines de la matrice extracellulaire.

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

# 2.4.1.1- Les glycosaminoglycannes (GAGs)

Les GAGs sont des polysaccharides linéaires constitués de répétitions d'unités disaccharidiques. Ces unités disaccharidiques se composent d'une hexosamine, soit la glucosamine (GlcN), soit la galactosamine (GalN), substituée ou non par un groupement acétyl ou sulfate sur la fonction amine, et d'un acide uronique, soit l'acide glucuronique (GlcA), soit l'acide iduronique (IdoA). De plus, les fonctions hydroxyles en position 3 et/ou 6

des hexosamines et en position 2 des acides uroniques peuvent être sulfatées (Silbert et coll. 1997). Les GAGs sont donc des molécules fortement chargées négativement, ce qui différencie les protéoglycannes des autres glycoprotéines. Cette polarité des GAGs leur confère certaines fonctions biologiques comme l'hydratation des tissus, la fixation des cations ou un rôle de barrière de filtration ionique (Iozzo et Murdoch 1996 ; Johanson 1996 ; Iozzo 1998). Ils peuvent représenter de 50 à 95 % du protéoglycanne sur lequel ils sont branchés et constituent 0,5 à 2 % de la masse sèche du derme.

#### 2.4.1.1.1- L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) ou hyaluronanne (figure 5) est le plus simple des GAGs. Il est formé de la répétition du motif disaccharidique suivant : [acide D-glucuronique  $\beta$ -1,3-N-acétyl-D-glucosamine]. A la différence des autres GAGs, l'acide hyaluronique n'est ni sulfaté, ni lié de façon covalente à une protéine (Fraser et coll. 1997 ; Weigel et coll. 1997). Il est le principal GAG du derme, ce dernier renfermant la moitié de l'acide hyaluronique de l'organisme (Bertheim et Hellstrom 1994) ; il est retrouvé également dans le cartilage, l'œil, le cordon ombilical ainsi que dans tous les liquides du corps, à l'exception du sang (Fraser et coll. 1997). Sa masse moléculaire varie de 300 kDa à 2000 kDa.



Acide D-glucuronique  $\beta(1\rightarrow 3)$  N-acétyl-D-glucosamine  $\beta(1\rightarrow 4)$ 

# Figure 5: Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant l'acide hyaluronique (d'après Voet et Voet 1998).

#### 2.4.1.1.2- L'héparine et les héparannes sulfates

L'héparine et les héparannes sulfates (HS) sont constitués de la répétition d'unités disaccharidiques formées d'acide uronique (acide L-iduronique ou D-glucuronique) lié à la D-glucosamine par une liaison  $\alpha$ -1,4 ou  $\beta$ -1,4. L'héparine et les héparannes sulfates (figure 6) sont synthétisés à partir d'un précurseur non sulfaté constitué d'unités renfermant un acide glucuronique et une N-acétylglucosamine (Bame et coll. 1991 ; Lindahl et coll. 1998). L'héparine et les héparannes sulfates diffèrent par leur teneur en groupements N-sulfatés (> 70 % pour l'héparine et < 50 % pour les héparannes sulfates).



Acide L-iduronique-2-sulfate  $\beta(1\rightarrow 4)$  N-sulfo (ou N-acétyl)-D-glucosamine-6-sulfate  $\alpha(1\rightarrow 4)$ 



Acide D-glucuronique  $\alpha(1\rightarrow 4)$  N-sulfo (ou N-acétyl)-D-glucosamine-6-sulfate  $\alpha(1\rightarrow 4)$ 

Figure 6 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant l'héparine et les héparannes sulfates (d'après Voet et Voet 1998).

#### 2.4.1.1.3- Les chondroïtines sulfates

Les chondroïtes sulfates (CS) (figure 7) sont constitués d'unités disaccharidiques formées d'acide D-glucuronique lié à la N-acétylgalactosamine par une liaison  $\beta$ -1,3, elle même liée par son autre extrémité à l'acide D-glucuronique par une liaison  $\beta$ -1,4. Les sulfatations ont lieu majoritairement sur les résidus de N-acétylgalactosamine en position 4, c'est le cas des chondroïtines-4-sulfates, ou en position 6, c'est le cas des chondroïtines-6-sulfates.



Acide D-glucuronique  $\beta(1\rightarrow 3)$  N-acétyl-D-galactosamine-4-sulfate  $\beta(1\rightarrow 4)$ 



Acide D-glucuronique  $\beta(1\rightarrow 3)$  N-acétyl-D-galactosamine-6-sulfate  $\beta(1\rightarrow 4)$ 

# **Figure 7 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant les chondroïtines sulfates** (d'après Voet et Voet 1998).

#### 2.4.1.1.4- Les dermatannes sulfates

Les dermatannes sulfates (DS) (figure 8) dérivent du même précurseur que les chondroïtines sulfates. La présence d'une uronyl épimérase suffit à convertir les chondroïtines sulfates en dermatannes sulfates. Cette épimérase agit au niveau du C5 de l'acide D-glucuronique, le convertissant en acide L-iduronique.



Acide L-iduronique  $\alpha(1\rightarrow 3)$  N-acétyl-D-galactosamine-4-sulfate  $\beta(1\rightarrow 4)$ 

**Figure 8 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant les dermatannes sulfates** (d'après Voet et Voet 1998).

#### 2.4.1.1.5- Les kératannes sulfates

Les kératannes sulfates (KS) (figure 9) ont été identifiés pour la première fois à partir d'extraits de cornée (Suzuki 1939). Il existe actuellement trois classes de kératannes sulfates nommées : KSI, KSII et KSIII. A l'origine, les désignations KSI et KSII étaient basées sur les différences entre les KS de cornée ou de cartilage. Actuellement, la classification des KS repose sur le type de liaison entre le KS et la protéine cœur et non sur leur localisation tissulaire (Funderburgh 2000). Le terme de KSI inclut les KS liés aux résidus d'asparagine de la protéine cœur par une liaison N-glycosidique. Le terme KSII désigne les KS liés à la protéine cœur par une liaison GalNAc-O-Ser/Thr. Il est à noter que les KSI contiennent des résidus de mannose alors que les KSII n'en contiennent pas (figure 10). Le terme de KSIII désigne les KS reliés à la protéine cœur par une liason Man-O-Ser (Krusius et coll. 1986).



D-galactose  $\beta(1\rightarrow 4)$  N-acétyl-D-glucosamine 6-sulfate  $\beta(1\rightarrow 3)$ 

Figure 9 : Formule moléculaire de l'unité disaccharidique constituant les kératannes sulfates (d'après Voet et Voet 1998).

# 2.4.1.1.6- Nature de la liason glycanne - protéine des annes

# protéoglycannes

Cette liaison peut être de nature différente selon le type de GAG mais également pour un même type (cas du KS) selon sa localisation tissulaire. Les liaisons rencontrées sont soit de nature O-glycosidique soit de nature N-glycosidique (figure 10).

#### 2.4.1.1.6.1- Liaison O-glycosidique

Pour les chondroïtines sulfates, les dermatannes sulfates et les héparannes sulfates, la liaison implique un résidu de xylose lié par une liaison O-glycosidique à un résidu de sérine. Pour les kératannes sulfates du cartilage (KSII) la liaison est de type mucin-like, soit un résidu de N-acétyl galactosamine lié O-glycosidiquement à un résidu de sérine ou de thréonine (Tai 1997).

#### 2.4.1.1.6.2- Liaison N-glycosidique

Pour les kératanes sulfates de cornée (KSI) la liaison est apparentée à celle des Nglycoprotéines, c'est-à-dire qu'une N-acétylglucosamine est liée par une liaison Nglycosidique à un résidu d'asparagine. Il est à noter que pour les chaînes de types KSI et KSII, le greffage d'un acide sialique sur les extrémités terminales non réductrices du motif oligosaccharidique termine leur polymérisation.



**Figure 10 : Nature de la liaison glycanne-protéine cœur selon le type de GAG.** CS : Chondroïtine sulfate, DS : Dermatanne sulfate, HS : Heparanne sulfate, KS : Kératanne sulfate, ASN : Asparagine, Gal : Galactose, GalNAc : N-acétylgalactosamine, GlcA : Acide glucuronique, GlcNAc : N-acétylglucosamine, Fuc : Fucose, HexA : Acide hexuronique (glucuronique ou iduronique), Man : Mannose, SA : Acide sialique, SER : Sérine, THR : Thréonine, Xyl : Xylose.

#### 2.4.1.2- Classification des protéoglycannes

#### 2.4.1.2.1- Les protéoglycannes intracellulaires

Les serglycines sont des protéoglycannes intracellulaires granulaires, retrouvées de manière abondante dans les granules de sécrétion des mastocytes, des basophiles et des cellules NK (Natural killer). Le cœur protéique des serglycines est le plus petit des cœurs protéiques connus (14-19 kDa).

#### 2.4.1.2.2- Les protéoglycannes membranaires

Parmi les protéoglycannes de la surface cellulaire, on retrouve les syndécannes qui sont des protéoglycannes transmembranaires, les glypicannes qui sont ancrés à la membrane par un pied glycosylphosphatidylinositol (GPI), mais également d'autres protéoglycannes (tableau III).

#### 2.4.1.2.3- Les protéoglycannes de la matrice extracellulaire

Il est classique de subdiviser les protéoglycannes de la matrice extracellulaire en deux catégories en fonction de leur taille :

- Les protéoglycannes de grande taille, dans ce groupe on distingue :

- les protéoglycannes de type hyalectannes (aggrécanne, versicanne,...)

- les protéoglycannes de membrane basale (perlécanne, agrine,...)

- Les protéglycannes de petite taille ou petits protéoglycannes interstitiels caractérisés par la répétition d'un motif riche en leucine (small leucine-rich proteoglycans ou SLRPs).

#### 2.4.1.2.3.1- La famille des hyalectannes

Les hyalectannes (Tableau IV) sont des protéoglycannes de grande taille qui répondent à une définition structurale de base du cœur protéique organisé en trois domaines :

- le domaine N-terminal liant l'acide hyaluronique

- le domaine central ou domaine de liaison des chaînes de GAG

- le domaine C-teminal ou LEC (Lectin-EGF-Complement regulatory protein like proteins) capable de fixer les lectines (Iozzo 1998).

	Protéine cœur	Type de glycosaminoglycannes
Protéoglycannes	(~ kDa)	(nombre)
Syndécannes Syndécanne 1 :		Hánaranna sulfata (3-4)
(syndécanne)	31	Chondroïtine/Dematanne sulfate (2)
Syndécanne-2 :	20	
(fibroglycanne)	20	Heparanne suitate (3-4)
Syndécanne-3 :	38	Héparanne sulfate (3-4)
(N-syndécanne)		
(Amphiglycanne	20	Héparanne sulfate (3-4)
Ryudocanne)	20	Teparame surface (5-1)
Glypicannes		
Glypicanne	64	Héparanne sulfate (4)
K-Glypicanne	57	Héparanne sulfate
OCI-5, Glypicanne-3	50	Héparanne sulfate
Cérébroglycanne	59	Héparanne sulfate (5)
Glypicanne-5		
Glypicanne-6		
Hyalectannes membranaires		
CD44, HERMES, H- CAM, PGp-1, épicanne,lymphocyte homing receptor, RHAMM	80-100	Héparanne/Chondroïtine sulfate
Divers		
Thrombomoduline	57	Chondroïtine sulfate
FAT	500	Héparanne sulfate
NG2	300	Chondroïtine sulfate
HIP	18	Chondroïtine sulfate
Podocalyxine-like	55	Chondroïtine sulfate
Bêtaglycanne	90	Héparanne sulfate
Neuroglycanne-C	120	Chondroïtine sulfate
Phosphacanne	92	Chondroïtine sulfate
Dystroglycanne	153-43	
Sarcoglycanne	50	

# Tableau III : Principaux protéoglycannes membranaires (d'après Praillet et coll. 1998).

		Localisation chromosomique		Protéine cœur	Type de glycosaminoglycannes			
Protéoglycannes	Gène	Humain	Souris	(~ kDa)	(nombre)			
Versicanne	CSPG2	5q13.2	13	265-370	Chondroïtine/Dermatanne sulfate (10-30)			
Aggrécanne	AGC1	15q26	7	220	Chondroïtine sulfate/Kératanne sulfate (~ 100)			
Neurocanne	NCAN		8	136	Chondroïtine sulfate (3-7)			
Brévicanne	BCAN	1q25-q31	3	100	Chondroïtine sulfate (1-3)			

Tableau IV : Principaux hyalectannes (d'après Iozzo 1998).

# 2.4.1.2.3.2- Protéoglycannes de membrane basale

Ces protéoglycannes participent à la structuration des membranes basales en association avec la laminine et le collagène de type IV (Tableau V).

Tableau V	: Principaux	protéoglycannes	de membrane	basale	(d'après	Iozzo 1998	8).
-----------	--------------	-----------------	-------------	--------	----------	------------	-----

		Localisation chromosomique		Protéine cœur	Type de glycosaminoglycannes
Protéoglycannes	Gène	Humain	Souris	(~ kDa)	(nombre)
Perlécanne	HSPG2	1q36	4	400-467	Héparanne/Chondroïtine sulfate (3)
Agrine	AGRN	1q32-pter	4	250	Héparanne sulfate (3)
Bamacanne				138	Chondroïtine sulfate (3)

#### 2.4.1.2.3.3- La famille des petits protéoglycannes riches en

#### leucine

Les SLRPs (Small Leucine-Rich Proteoglycans) sont des protéines de la matrice extracellulaire ayant en commun de contenir plusieurs répétitions riches en leucine (Hocking et coll. 1998). Cette famille renferme au moins 15 membres qui ont été répartis en cinq classes suivant l'espacement des résidus de cystéines de l'extrémité N-terminale de la protéine cœur. Ils peuvent également être répartis suivant l'organisation de leur gène ou le type de GAG (Tableau VI et figures 11 et 12).

#### 2.4.1.2.3.3.1- Les SLRPs de la classe I

La classe I est caractérisée par la présence d'une séquence consensus riche en cystéine de motif suivant : CX<sub>3</sub>CXCX<sub>6</sub>C, au niveau du domaine N-terminal. De plus, ces SLRPs ont en commun de contenir 10 répétitions riches en leucine (Leucine Rich Repeats, ou LRR) au niveau du domaine central de la protéine cœur et sont tous codés par un gène contenant 8 exons. Les 10 LRR sont codés par 6 exons (exons III-VIII) (Iozzo 1999).

Cette classe comprend entre autres la décorine et le biglycanne qui sont les plus homologues mais également l'asporine et l'ECM2. La décorine et le biglycanne ont une structure primaire très similaire suggérant une évolution à partir d'un gène ancestral (Kresse et coll. 1993). Ces protéoglycannes contiennent un domaine N-terminal qui est habituellement substitué soit par une (cas de la décorine) soit par deux (cas du biglycanne) chaînes de chondroïtine/dermatanne sulfate.

Le SLRP le plus caractérisé de cette classe est la décorine. La décorine présente avec le collagène une interaction de haute affinité : Kd = 0,7 nM. *In vitro*, elle est capable de retarder la fibrillogénèse et de diminuer le diamètre des fibres de collagène néoformées (Brown et Vogel 1989). Une étude réalisée sur des souris déficientes en décorine a montré qu'elles présentaient des fibrilles d'épaisseur non-uniformes ainsi qu'une fragilité de la peau (Danielson et coll. 1997). La décorine est capable de moduler l'adhésion cellulaire (Winnemoller et coll. 1992) et de neutraliser l'activité de facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$  (Yamaguchi et coll. 1990). De plus, il a été montré que la décorine est un inhibiteur puissant de la croissance cellulaire. Elle agit directement sur les voies de transduction en conduisant à l'activation de la p21<sup>Waf1</sup> qui est un inhibiteur de kinases cycline-dépendantes et donc à l'arrêt immédiat du cycle cellulaire en phase G1 (De Luca et coll. 1996 ; Santra et coll.

1997). Enfin, il a été montré *in vivo* que la décorine est impliquée dans le processus d'angiogenèse en réponse à un stress inflammatoire (Nelimarkka et coll. 2001).

Le biglycanne fixe le TGF- $\beta$  avec la même constante d'affinité que la décorine, par contre son affinité pour le collagène de type I est plus faible : Kd = 87 nM (Schonherr et coll. 1995). Les différences les plus marquantes entre la décorine et le biglycanne ont été mises en évidence lors de la régulation de leur synthèse. Le taux d'expression du biglycanne dans les fibroblastes issus de donneurs adultes est faible et disparaît après plusieurs passages (Schonherr et coll. 1993). De plus, la synthèse de biglycanne diminue et celle de la décorine augmente avec l'âge (Fedarko et coll. 1992). Le TGF- $\beta$ , le PDGF, le bFGF, l'acide rétinoïque augmentent en général la synthèse de biglycanne et diminuent celle de la décorine dans différents systèmes cellulaires *in vitro*. Les glucocorticoïdes augmentent la synthèse de la décorine et diminuent celle du biglycanne ; Le TNF $\alpha$  diminue la synthèse des deux protéoglycannes (Herbage et Wegrowski 1997).

#### 2.4.1.2.3.3.2- Les SLRPs de la classe II

Les SLRPs de la classe II présentent une séquence riche en cystéine de type CX<sub>3</sub>CXCX<sub>9</sub>C et sont codés seulement par 3 exons avec un large exon central codant l'ensemble des 10 LRRs.

La classe II comprend cinq membres qui peuvent être divisés en trois sous-familles. La fibromoduline et le lumicanne constituent la première sous-famille et présentent 48 % d'homologie de structure. Le kératocanne et le PRELP constituent la seconde sous-famille avec 55 % d'homologie de structure alors que l'osthéoadhérine forme une sous-famille distincte avec 37-42 % d'homologie avec les autres membres de cette classe (Iozzo 1999).

La fibromoduline est exprimée dans les cartilages et les tendons (Kreis et Vale 1993). Comme la décorine, SLRP de classe I, la fibromoduline est aussi capable d'inhiber la fibrillogénèse du collagène (Hedbom et Heinegard 1989) et de fixer le TGF- $\beta$  (Hildebrand et coll. 1994). De plus, il a été montré que la décorine, la fibromoduline et le lumicanne en se fixant aux collagènes de type I et II permettraient de les protéger contre les dégradations dues à la collagènase-1 (MMP-1) et à la collagènase-3 (MMP-13) (Geng et coll. 2006).

## 2.4.1.2.3.3.3- Les SLRPs de la classe III

La classe III est constituée de l'épiphycanne et de l'ostéoglycine qui présentent seulement 40 % d'homologie de structure, ainsi que de l'opticine. Ces protéoglycannes se

distinguent par la présence d'une région riche en cystéine de type CX<sub>2</sub>CXCX<sub>6</sub>C et par la présence de seulement 6 LRRs. De plus, ils sont codés par un gène contenant 7 exons, les LRRs sont codés par 3 exons (exons V-VII) (Iozzo 1999).

#### 2.4.1.2.3.3.4- Les SLRPs de la classe IV

La classe IV comprend la nyctalopine et la chondroadhérine. L'absence d'expression ou la mutation du gène de la nyctalopine entraîne une diminution de la vision dans l'obscurité accompagnée d'une forte myopie (Pusch et coll. 2000). La chondroadhérine est fortement exprimée dans certaines zones comme le cartilage, le tissu osseux, les tendons, la moelle osseuse et par les cellules de chondrosarcome (Tasheva et coll. 2004).

## 2.4.1.2.3.3.5- Les SLRPs de la classe V

Le podocanne possède des caractéristiques structurales particulières. Il est donc considéré comme le premier membre d'une nouvelle classe (classe V). Il s'agit d'une glycoprotéine contenant des oligosaccharides N-glycosylés mais en aucun cas d'un protéoglycanne (Ross et coll. 2003).

### 2.4.1.2.3.3.6- Localisation des chaînes de GAGs

Les GAGs sont localisés, selon les membres, au niveau N-terminal ou sur le domaine central. Pour la décorine, le biglycanne et l'épiphycanne, les chaînes de type CS/DS sont localisées au niveau du domaine N-terminal. Les autres membres de la famille des SLRPs possèdent des chaînes de type KS localisées au niveau de résidus d'ASN du domaine central. Ces chaînes, notamment pour le lumicanne, la fibromoduline et le kératocanne peuvent être de type poly-N-acétyllactosamine peu sulfatée (forme dite glycoprotéique des Protéo KS). On peut également rencontrer dans ce domaine des points de N-glycosylation de nature variable (N-glycanne du type lactosamine ou polymannose).

Tableau VI : Principaux petits protéoglycannes riches en leucine (Iozzo 1998 ; Lorenzo et	
coll. 2001 ; Nishiu et coll. 1998).	

		Localisation chro	omosomique	Protéine cœur	Type de glycosaminoglycannes
Protéoglycannes	Gène	Humain	Souris	(~ kDa)	(nombre)
Classe I					
Décorine	DCN	12q21.3-q23	10	36	Dermatanne/Chondroïtine sulfate (1)
Biglycanne	BGN	Xq28	Х	38	Dermatanne/Chondrïtine sulfate (1- 2)
Asporine		9q31.1-32		39	
ECM2	ECM2	9q22.3		55	
Classe II					
Fibromoduline	FMOD	1q32	1	42	Kératanne sulfate (2-3)
Lumicanne	LUM	12q21.3-22	10	37-38	Kératanne sulfate (3-4)
Keratocanne		12q23		38	Kératanne sulfate (3-5)
PRELP	PRELP	1q32	1	44	Kératanne sulfate (2-3)
Osteoadhérine		9q22		42	Kératanne sulfate (2-3)
Classe III					
Epiphycanne	DSPG3	12q21		35	Dermatanne/Chondroïtine sulfate (2-3)
Ostéoglycine	OG	9q22.2-3		35	Kératanne sulfate (2-3)
Opticine		1q32		35	
Classe IV					
Nyctalopine	NYX	Х			
Chondroadhérine	CHAD	17q21.33	11	38	
Classe V					
Podocanne		1q23		95	



**Figure 11 : Dendrogramme phylogénétique et classifications des SLRPs.** L'espacement des résidus de cystéines du domaine N-terminal pour les 5 classes est indiqué (d'après McEwan et coll. 2006).



**Figure 12 : Structure des SLRPs.** La protéine cœur de la décorine, du biglycanne, de la fibromoduline ou du lumicanne est représentée par 2 domaines contenant un pont disulfure entourant un domaine contenant 10 (11 pour le lumicanne) régions riches en leucine (LRR : Leucine-Rich Repeats). La séquence consensus de chaque LRR est encadrée. La leucine (L) peut être remplacée par les différents acides aminés indiqués. Dans le cas de la décorine ou du biglycanne, il y a une ou deux chaînes de chondroïtine/dermatanne sulfate (DS) respectivement, au niveau de la région N-terminale. Dans le cas de la fibromoduline et du lumicanne, 1 à 4 chaînes de kératanne sulfate (KS) peuvent résider entre les différentes LRR (d'après Roughley 2006).

#### 2.4.1.2.3.3.7- Rôles des LRRs des SLRPs

Les protéines contenant des répétitions riches en leucine (LRRs) ont en commun de présenter une structure en forme d'arche. Cette structure a été proposée après étude cristallographique d'une protéine ne contenant que des LRRs : l'inhibiteur de ribonucléase pancréatique (RNI) (figure 13). Précédemment, certains rôles de la décorine et de la fibromoduline ont été énoncés. De récentes études ont pu mettre en évidence l'importance de cette structure en forme d'arche et l'interaction des LRRs avec certaines molécules comme le collagène de type I.



**Figure 13 : Structure cristallographique de l'inhibiteur de ribonucléase pancréatique** (d'après Kobe et Deisenhofer 1993 ; McEwan et coll. 2006).

En ce qui concerne la décorine, il a été montré que son interaction avec le collagène de type I s'effectue au niveau des 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> répétitions riches en leucine de la protéine (Svensson et coll. 1995). Récemment, il a été montré que la région de la décorine fixant le collagène de type I est situé au niveau des LRR5 et LRR6. Les résidus Arg207 et Asp210 de la LRR6 semblent cruciaux pour cette fixation (Kalamajski et coll. 2007). Ces résidus d'acides aminés sont exposés à l'extérieur du feuillet  $\beta$  formé par la LRR6 (figure 14) les rendant ainsi accessibles. Enfin, il a été montré que la LRR5 de la décorine humaine possède une activité anti-angiogenique (Sulochana et coll. 2005).



**Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la décorine.** Les résidus d'acides aminés Arg207 et Asp210 de la LRR6 sont indiqués (d'après Kalamajski et coll. 2007).

Une étude récente à mis en évidence le site majeur de fixation du collagène de type I à la fibromoduline, localisé dans la LRR11 au niveau de Glu353 et de Lys355. Comme énoncé pour le modèle précédent, les résidus Glu353 et Lys 355 sont exposés à l'extérieur du feuillet  $\beta$  formé par la LRR11 (figure 15) (Kalamajski et Oldberg 2007).



**Figure 15 : Modélisation du fragment LRR10-12 de la fibromoduline** (d'après Kalamajski et Oldberg 2007).

# 2.4.1.2.3.4- Les autres protéoglycannes de la matrice

# extracellulaire

Les autres protéoglycannes de la matrice extracellulaire sont listés dans le tableau VII. On notera que certains collagènes (IX, XII, XIV) sont aussi des protéoglycannes.

	_	Localisation chromosomique	Protéine cœur	Type de glycosaminoglycannes
Protéoglycannes	Gène	Humain	(~ kDa)	(nombre)
Les collagènes FACIT				
Type IX	COL9A1 COL9A2 COL9A3	6q12-q14 1p33-p32 20q13.3		Chondroïtine sulfate
Type XII	COL12A1	6q12-q13		Chondroïtine sulfate
Type XIV	COL14A1	8q23		Chondroïtine sulfate
Divers				
Testicanne	SPOCK	5q31	44	Héparanne/Chondroïtine sulfate (1-2)
CSF-1, M-CSF, PG-100			106	Chondroïtine sulfate
BM-PG (bone marrow PG)			20	Chondroïtine sulfate
Claustrine, MAP1B			70	Kératanne sulfate
Peptide riche en proline (PRP)	)		38	Chondroïtine sulfate

Tableau	VII:	Propriétés	générales	des	autres	protéoglycannes	de	la	matrice
extracellu	ılaire.								

#### 2.4.2- Le lumicanne

Le lumicanne est un membre de la famille des petits protéoglycannes riches en leucine (SLRPs), identifié à l'origine en tant que protéoglycanne cornéen substitué par des chaînes de kératanne sulfate dont la taille s'étend de 50 à 100 kDa (Hassell et coll. 1980 ; Naito 2005). Le lumicanne est également exprimé sous forme de glycoprotéine peu ou non sulfatée dont la taille s'étend de 55 à 57 kDa dans d'autres tissus, comme le tissu artériel (Funderburgh et coll. 1991), le cartilage articulaire (Grover et coll. 1995), la peau (Corpuz et coll. 1996), les poumons (Dolhnikoff et coll. 1998), le pancréas (Lu et coll. 2002 (a)), l'utérus (San Martin et coll. 2003). L'ARNm du lumicanne est exprimé par la sclère humaine (Johnson et coll. 2006).

#### 2.4.2.1- Le lumicanne : gène et promoteur

Le gène du lumicanne a été cloné chez le poulet (Blochberger et coll. 1992), le bœuf (Funderburgh et coll. 1993), l'homme (Chakravarti et coll. 1995), la souris (Funderburgh et coll. 1995) et chez la caille (Corpuz et coll. 2000). Le gène du lumicanne humain (LUM) a été localisé sur le chromosome 12q21.3-q22 (Chakravarti et coll. 1995). Il comporte 3 exons séparés par des introns de 2,2 et 3,5 kpb (Grover et coll. 1995 et 2000). Le premier intron réside 21 bases avant le codon d'initiation de la traduction (ATG). Le second intron réside 152 bases avant le codon stop (TAA). Les 3 exons du gène s'étendent sur 74, 883 et 770 pb, respectivement (Grover et coll. 2000). L'exon 1 est situé au niveau de la région non traduite du lumicanne (Ying et coll. 1997). L'exon 2 contient la majeure partie de la séquence codant tous les domaines de répétitions riches en leucine. L'exon 3 code le reste de la séquence, à savoir le domaine C-terminal du lumicanne (figure 16).



**Figure 16 : Structure du gène du lumicanne.** Les 3 exons du gène du lumicanne sont représentés par des rectangles numérotés. Les codons initiateur de la traduction, ATG, et stop, TAA sont localisés respectivement au niveau de l'exon 2 et de l'exon 3 (d'après Kao et Liu 2003).

L'analyse du promoteur du gène LUM humain (figure 17) révèle la présence de cinq boîtes TATAAA au niveau de la région distale, or il ne possède pas de boîte TATAA habituelle à proximité du site d'initiation de la transcription. Mais une séquence TATCA située 41 pb en amont du gène semble nécessaire à la régulation de la transcription. Le promoteur possède également une seule boîte GC située 74 pb avant le site d'initiation de la transcription. Bien que la boîte TATCA ne puisse à elle seule initier la transcription, elle semble toutefois essentielle au déroulement de la transcription associée à la boîte GC. Sp3 a été identifié comme élément activateur de la transcription se liant à la boîte GC. Un site de liaison GATA localisé entre les pb –386 et –391 a été identifié comme nécessaire pour la répression de la transcription. Le promoteur du lumicanne de souris ne possède pas cet élément de répression (Grover et coll. 2000).

-	1616	GTATATGGTTGCACAAGACTTTACAATGAGCTGGGTCCAATATAATGCATTTGAGG
-	1560	CTGT <mark>TATAAA</mark> TACCACAACACATGTATTGCTT <mark>TATAAA</mark> GAAAAATCTTAAGGAATGGATA
-	1500	GGTGGAGGTTTTCTAACAAGAGCTCAGATTATAGAATTTGATACACTCAAAATTAATACA
-	1440	TAGCATTGTTTTAAGAATCCTCTTATAACAAGATCACTTAATTATATTCGATTGATT
-	1380	CTCTTTCTCTTAATCCCT <mark>TATAAA</mark> TTTATTCAGTTACTTTGTTGAAATTGAGGCCTATCA
-	1320	CTAATTTCCTTAAAATAATATTAGGTTTAATGTTATGTT
-	1260	ATTAGCTTACTTTCAAGAAGATTACTTTTTGTTTTTGAACACTGCTAATTAAAAAAAA
-	1200	CCATTTATTCTAATAGTCTTTTTTCGGACAAATGCTGTATTAGTCATGGAGTTAATTTTC
-	1140	CACAAGTCTCACTGCTAAAATGTGATATAGTTATTTTTAAAGACAAAAATACCAATGTGA
-	1080	CAACTTATATTCCAAAATATATTGTTGTAAAAGTTCT <mark>TATAAA</mark> CATGAGGAAATGAACAT
-	1020	TTTAGAAAAAATCTCATAAATATATC <mark>TGATAA</mark> AATCACAAAATCGCAAACTAGCACAAG
-	960	GATTTAAGTACATCTCTCATTTGCTGAAACCATGCATCAGGAGCTGATAATGAAAGATAT
-	900	ATCCAGCCAGGCCTTTGGGAGATTATAACTTTGAATAACTTTTAACTTTGAAAAAAAA
-	840	ACTAGCATGCAATGAAAGATTCTTGCCTTGTGATACTTTTAG <mark>TATAAA</mark> TTTATTTTTTT
-	780	CTCTGTTCTTTTATGTTTTTTGGCATTAAGCTATAGAATGCTCTCCCCAAGTAAGGTTTT
-	720	GGGTGAATTCCTAAACGAAATCCACAAAATAAAAAACAGGCAAGACTTTGCTGATTGGTT
-	660	CCAGACCTGAATAACATAAAATGAGTCTCCTTAGCATTAGAAGTAAACTTGAAATGTTGA
-	600	TATTTATCATGTGTATCCAAGTGTATATGAAGCATATTTTATATTTTTTAAAACTAATGT
-	540	AAGCTACCCTCATGGCCAAAAAATTAAGTTAGTCCAAGTAAATCAATATTGATTTCAAAA
-	480	G <mark>TGATAG</mark> GCAAAGGGATTCAATTCCTCTGAGTCTGTTCATTTGCGTTTTCCGGAAATTAT
-	420	TTGCCCTGCTTATGATTTCTGAGATCTTT <mark>AGATAA</mark> ACA <mark>TGATAG</mark> TTGGCTGAGCACATTG
-	360	CACTTAATTGTTGCCACAGCCACAGATGTAAAGAGGCTTTGTAAGAAAAATGTTCTCACA
-	300	GTGAGCTTCCTTATTTGAAGCAGGACTCAACTTCTTGGTTAAAAGCTATGGTATTTGAGC
-	240	${\tt CTAGCTTCACACACATATCTCTCTCCCCATTCCCATAGGGAATGAGCTGGGCTGTCCTTTC}$
-	180	${\tt TCCCCACGTTCACCTGCACTTCGTTAGAGAGCAGTGTTCACATGCCACACCACAAGATCC}$
-	120	CCACAATGACATAACTCCATTCAGAGACTGGCGTGACTGGGCTGGGCTCCCCCCCC
-	60	CCCTTCAGCTCTTG <mark>TATCA</mark> CTCAGAATCTGGACGCCAGTTCCGTCCTGACAGAGTTCACA
+	1	GCATATATTGGTGGATTCTTGTCCATAGTGCATCTGCTTTAAGAATTAACGAAAGCAGTG
+	61	TCAAGACAGTAAGG

**Figure 17 : Séquence promoteur du gène du lumicanne humain.** La région promotrice est numérotée de –1616 à –1 et la séquence transcrite du premier exon est numérotée de +1 à +74. La position des éléments du promoteur potentiellement impliqués dans la régulation de la transcription du gène sont indiqués : les cinq boîtes TATAAA sont surlignées en jaune, la boîte GC en bleu, la boîte TATCA en vert et les sites de liaison GATA en rose (d'après Grover et coll. 2000).

#### 2.4.2.2- Structure du lumicanne

#### 2.4.2.2.1- Structure primaire

L'ADNc du lumicanne humain comporte un cadre de lecture ouvert de 1014 pb codant une protéine cœur de 338 acides aminés (Chakravarti et coll. 1995). Dans le cas du bœuf, la protéine cœur du lumicanne est constituée de 342 acides aminés (Funderburgh et coll. 1993), chez la souris, elle est constituée comme chez l'humain de 338 acides aminés (Funderburh et coll. 1995) alors que chez le poulet, elle est constituée de 343 acides aminés (Blochberger et coll. 1992) (figure 18).

Le cœur protéique du lumicanne présente quatre domaines majeurs (Kao et coll. 2003) :

• Le premier domaine, ou domaine I, correspond au peptide signal.

Le lumicanne possède un peptide signal de 18 acides aminés (Grover et coll. 1995). Il a été proposé, pour l'ensemble des membres des SLRPs, que ce propeptide aurait des fonctions de site de reconnaissance et d'attachement pour la xylosyltransférase, la première enzyme intervenant dans la biosynthèse des GAGs (Oldberg et coll. 1996). Cependant, cette caractéristique du propeptide n'est pas conservée dans le cas du lumicanne, du keratocanne, ni de la fibromoduline (Funderburgh et coll. 1995 ; Iozzo et coll. 1996 ; Oldberg et coll. 1989).

◆ Le domaine II, situé en position N-terminale, est dépourvu de répétitions riches en leucine. Contrairement à la décorine, au biglycanne et à l'épiphycanne pour lesquels ce domaine possèdent des sites de fixation pour les GAGs, le lumicanne, le keratocanne et la fibromoduline y présentent des résidus de tyrosine sulfatée (Funderburgh et coll. 1995 ; Oldberg et coll. 1989 ; Corpuz et coll. 1996). Le domaine II possède un regroupement de 4 résidus de cystéine hautement conservés dont la séquence consensus est la suivante : CX<sub>2</sub>. <sub>3</sub>CXCX<sub>6-9</sub>C, où X est un acide aminé quelconque. Ces résidus de cystéines sont impliqués dans la formation de ponts disulfure au niveau de la région N-terminale de la protéine coeur. Ces ponts disulfures formés en position N et C-terminale de la protéine cœur sont essentiels à la fixation des fibrilles de collagène. En effet, le rôle de ces cystéines hautement conservées à été étudié. Il a été montré que ce domaine riche en cystéine du lumicanne joue un rôle important dans la fibrillogénèse du collagène de type I ainsi que dans l'interaction lumicanne-collagène I (Carlson et coll. 2003).

humain	MSLSAFTLFLALIGGTSGQYYDYDFPLSIYGQSSPNCAPECNCPESYPSAMYCDEL	56
bovin	MNLGVFPLLLALIGGASSTYPDYYEYYDFPQALYGRSSPNCAPECNCPESYPSAMYCDEL	60
souris	MNVCAFSLALALVGSVSGQYYDYDIPLFMYGQISPNCAPECNCPHSYPTAMYCDDL	56
poulet	MTLNSLPIFLVLISGIFCQYDYG-PADDYGYDPFGPSTAVCAPECNCPLSYPTAMYCDNL	59
	* * * * * * * ****** ***	
humain	KLKSVPMVPPGIKYLYLRNNOIDHIDEKAFENVTDLOWLILDHNLLENSKIKGRVFSKLK	116
bovin	KLKSVPMVPPGIKYLYLRNNOIDHIDDKAFENVTDLOWLILDHNLLENSKIKGKVFSKLK	120
souris	KLKSVPMVPPGIKYLYLRNNOIDHIDEKAFENVTDLOWLILDHNLLENSKIKEKVFSKLK	116
poulet	KLKTIPIVPSGIKYLYLRNNMIEAIEENTFDNVTDLOWLILDHNHLENSKIKGRVFSKLK	119
L	*** * ** ******* * * * * * ************	
humain	QLKKLHINHNNLTESVGPLPKSLEDLQLTHNKITKLGSFEGLVNLTFIHLQHNRLKED	174
bovin	QLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLVDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIHLQHNQLKED	178
souris	QLKKLHINYNNLTESVGPLPKSLQDLQLTNNKISKLGSFDGLVNLTFIYLQHNQLKED	174
poulet	NLKKLHINYNNLTEAVGPLPKTLDDLQLSHNKITKVNPGALEGLVNLTVIHLQNNQLKTD	179
-	****** ***** ***** * **** * *** * * ****	
humain	AVSAAFKGLKSLEYLDLSFNQIARLPSGLPVSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFNALQYL	234
bovin	AVSAALKGLKSLEYLDLSFNQMTKLPSGLPVSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFSALQYL	238
souris	AVSASLKGLKSLEYLDLSFNQMSKLPAGLPTSLLTLYLDNNKISNIPDEYFKRFTGLQYL	234
poulet	${\tt SISGAFKGLNSLLYLDLSFNQLTKLPTGLPHSLLMLYFDNNQISNIPDEYFQGFKTLQYL}$	239
	* *** ** ******* ** *** *** *** *** *** ****	
humain	RLSHNELADSGIPGNSFNVSSLVELDLSYNKLKNIPTVNENLENYYLEVNQLEKFDIKSF	294
bovin	${\tt RLSHNELADSGVPGNSFNVSSLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKSF$	298
souris	${\tt RLSHNELADSGVPGNSFNISSLLELDLSYNKLKSIPTVNENLENYYLEVNELEKFDVKTF$	294
poulet	${\tt RLSHNKLTDSGIPGNVF} \underline{{\tt NIT}} {\tt SLVELDLSFNQLKSIPTVSENLENFYLQVNKINKFPLSSF}$	299
	**** * *** *** ** ** ** ** * ** **** * *	
humain	CKILGPLSYSKIKHLRLDGNRISETSLPPDMYECLRVANEVTLN 338	
bovin	CKILGPLSYSKIKHLRLDGNHITQTSLPPDMYECLRVANEITVN 342	
souris	CKILGPLSYSKIKHLRLDGNPLTQSSLPPDMYECLRVANEITVN 338	
poulet	CKVVGPLTYSKITHLRLDGN <u>NLT</u> RADLPQEMYNCLRVAADISLE 343	
	** *** **** ****** ** ** *****	

**Figure 18 : Comparaison de séquences protéiques du lumicanne de différentes espèces.** Les \* indiquent les résidus d'acides aminés identiques. Les 5 séquences consensus de N-glycosylation NX(S/T) (où N correspond à l'asparagine, X à n'importe quel acide aminé, S à la sérine et T à la thréonine) pour le lumicanne de poulet sont soulignées (Dunlevy et coll. 1998). L'alignement de séquences à été réalisé grâce au programme ClustalW Multiple Alignment disponible sur le site http://www.ebi.ac.uk ◆Le domaine III, ou domaine central est une région hautement conservée de 305 à 308 acides aminés. Il contient 9 répétitions riches en leucine avec des variations au niveau de la séquence consensus LXXLXLXXNXL/I où L correspond à la leucine, X à n'importe quel acide aminé, N à l'asparagine et I à l'isoleucine.

Le domaine central est subdivisé en unités (figure 19) :

- l'unité 1 est constituée de 71 acides aminés (de la position 63 à 133)

- l'unité 2 est constituée de 68 acides aminés (de la position 134 à 201)

- l'unité 3 est constituée de 70 acides aminés (de la position 202 à 271)

Chacune de ces 3 unités renferment 3 motifs de répétitions riches en leucine différents (Blochberger et coll. 1992 ; Funderburgh et coll. 1993). Comme pour le lumicanne bovin, la protéine cœur humaine contient 4 sites potentiels de N-glycosylation situés aux positions 87, 126, 159 et 251 dont tous ou certains peuvent être substitués par des chaînes de kératanne sulfate (Chakravarti et coll. 1995).

◆ Le domaine IV, situé en position C-terminale, est constitué de 66 acides aminés et contient 2 résidus de cystéine séparés par 32 acides aminés. Les deux résidus de cystéine sont reliés par un pont disulfure entraînant ainsi la formation d'une boucle de 41 ou 42 acides aminés. Il contient également 2 répétitions riches en leucine partielles : une se situant entre les acides aminés 281 à 286, l'autre, se situant entre les acides aminés 309 à 314. Pour Chakravarti et coll. (1995), il y a donc au total 11 répétitions riches en leucine pour le lumicanne humain (figure 20).



Figure 19 : Représentation des 3 unités constituant le domaine central du lumicanne humain. Les répétitions riches en leucine sont alignées. Les résidus d'acides aminés identiques sont encadrés. Une séquence consensus est déterminée pour chaque motif (d'après Chakravarti et coll. 1995). (Ces 3 domaines ont été définis à l'origine par Blochberger et coll. en 1992 pour le lumicanne de poulet).

ATG	AGT	CTA	AGT	GCA	TTT	ACT	CTC	TTC	CTG	GCA	TTG	ATT	GGT	GGT	ACC	AGT	GGC	CAG	TAC	60	pb
Met	Ser	Leu	Ser	Arg	Phe	Thr	Leu	Phe	Leu	Arg	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Tyr	20	aa
TAT	GAT	TAT	GAT	TTT	CCC	CTA	TCA	ATT	TAT	GGG	CAA	TCA	TCA	CCA	AAC	TGT	GCA	CCA	GAA	120	pb
Tyr	Asp	Tyr	Asp	Phé	Pro	Leu	Ser	Ile	Tyr	Gly	Gln	Ser	Ser	Pro	Asn	Cys	Ala	Pro	Glu	40	aa
TGT	AAC	TGC	CCT	GAA	AGC	TAC	CCA	AGT	GCC	ATG	TAC	TGT	GAT	GAG	CTG	AAA	TTG	AAA	AGT	180	pb
Cys	Asn	Cys	Pro	Glu	Ser	Tyr	Pro	Ser	Ala	Met	Tyr	Cys	Asp	Glu	Leu	Lys	Leu	Lys	Ser	60	aa
GTA	CCA	ATG	GTG	CCT	CCT	GGA	ATC	AAG	TAT	CTT	TAC	CTT	AGG	AAT	AAC	CAG	ATT	GAC	CAT	240	pb
Val	Pro	Mét	Val	Pro	Pro	Gly	Ile	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Gln	Ile	Asp	His	80	aa
ATT	GAT	GAA	AAG	GCC	TTT	GAG	AAT	GTA	ACT	GAT	CTG	CAG	TGG	CTC	ATT	CTA	GAT	CAC	AAC	300	pb
Ile	Asp	Glu	Lys	Ala	Phé	Glu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gln	Trp	Leu	Ile	Leu	Asp	His	Asn	100	aa
CTT	CTA	GAA	AAC	TCC	AAG	ATA	AAA	GGG	AGA	GTT	TTC	TCT	AAA	TTG	AAA	CAA	CTG	AAG	AAG	360	pb
Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Arg	Val	Phé	Ser	Lys	Leu	Lys	Gln	Leu	Lys	Lys	120	aa
CTG	CAT	ATA	AAC	CAC	AAC	AAC	CTG	ACA	GAG	TCT	GTG	GGC	CCA	CTT	CCC	AAA	TCT	CTG	GAG	420	pb
Leu	His	Ile	Asn	His	Asn	Asn	Leu	Thr	Glu	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Pro	Lys	Ser	Leu	Glu	140	aa
GAT	CTG	CAG	CTT	ACT	CAT	AAC	AAG	ATC	ACA	AAG	CTG	GGC	TCT	TTT	GAA	GGA	TTG	GTA	AAC	480	pb
Asp	Leu	Gln	Leu	Thr	His	Asn	Lys	Ile	Thr	Lys	Leu	Gly	Ser	Phé	Glu	Gly	Leu	Val	Asn	160	aa
CTG	ACC	TTC	ATC	CAT	CTC	CAG	CAC	AAT	CGG	CTG	AAA	GAG	GAT	GCT	GTT	TCA	GCT	GCT	TTT	540	pb
Leu	Thr	Phé	Ile	His	Leu	Gln	His	Asn	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Phé	180	aa
<mark>Leu</mark> AAA	Thr GGT	Phé CTT	Ile AAA	His TCA	Leu CTC	<b>Gln</b> GAA	His TAC	Asn CTT	Arg GAC	Leu TTG	Lys AGC	Glu TTC	Asp AAT	Ala CAG	Val ATA	Ser GCC	Ala AGA	Ala CTG	Phé CCT	180 600	aa pb
<mark>Leu</mark> AAA Lys	Thr GGT Gly	Phé CTT Leu	Ile AAA Lys	His TCA Ser	Leu CTC Leu	Gln GAA Glu	His TAC Tyr	Asn CTT Leu	Arg GAC Asp	Leu TTG Leu	Lys AGC <mark>Ser</mark>	Glu TTC <b>Phé</b>	Asp AAT <b>Asn</b>	Ala CAG <mark>Gln</mark>	Val ATA <b>Ile</b>	Ser GCC Ala	Ala AGA Arg	Ala CTG Leu	Phé CCT Pro	180 600 200	aa pb aa
Leu AAA Lys TCT	Thr GGT Gly GGT	Phé CTT Leu CTC	Ile AAA Lys CCT	His TCA Ser GTC	Leu CTC Leu TCT	Gln GAA Glu CTT	His TAC Tyr CTA	Asn CTT Leu ACT	Arg GAC Asp CTC	Leu TTG Leu TAC	Lys AGC <b>Ser</b> TTA	Glu TTC <b>Phé</b> GAC	Asp AAT <b>Asn</b> AAC	Ala CAG <mark>Gln</mark> AAT	Val ATA <b>Ile</b> AAG	Ser GCC Ala ATC	Ala AGA Arg AGC	Ala CTG Leu AAC	Phé CCT Pro ATC	180 600 200 660	aa pb aa pb
Leu AAA Lys TCT Ser	Thr GGT Gly GGT Gly	Phé CTT Leu CTC Leu	Ile AAA Lys CCT Pro	His TCA Ser GTC Val	Leu CTC Leu TCT Ser	Gln GAA Glu CTT Leu	His TAC Tyr CTA Leu	Asn CTT Leu ACT Thr	Arg GAC Asp CTC Leu	Leu TTG Leu TAC Tyr	Lys AGC Ser TTA Leu	Glu TTC Phế GAC Asp	Asp AAT Asn AAC Asn	Ala CAG <mark>Gln</mark> AAT <b>Asn</b>	Val ATA Ile AAG Lys	Ser GCC Ala ATC Ile	Ala AGA Arg AGC Ser	Ala CTG Leu AAC Asn	Phé CCT Pro ATC Ile	180 600 200 660 220	aa pb aa pb aa
Leu AAA Lys TCT Ser CCT	Thr GGT Gly GGT Gly GAT	Phé CTT Leu CTC Leu GAG	Ile AAA Lys CCT Pro TAT	His TCA Ser GTC Val TTC	Leu CTC Leu TCT Ser AAG	Gln GAA Glu CTT Leu CGT	His TAC <b>Tyr</b> CTA Leu TTT	Asn CTT Leu ACT Thr AAT	Arg GAC Asp CTC Leu GCA	Leu TTG Leu TAC Tyr TTG	Lys AGC Ser TTA Leu CAG	Glu TTC Phé GAC Asp TAT	Asp AAT ASN AAC ASN CTG	Ala CAG <b>Gln</b> AAT <b>Asn</b> CGT	Val ATA Ile AAG Lys TTA	Ser GCC Ala ATC Ile TCT	Ala AGA Arg AGC Ser CAC	Ala CTG Leu AAC Asn AAC	Phé CCT Pro ATC Ile GAA	180 600 200 660 220 720	aa pb aa pb aa pb
Leu AAA Lys TCT Ser CCT Pro	Thr GGT Gly GGT Gly GAT Asp	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu	Tle AAA Lys CCT Pro TAT Tyr	His TCA Ser GTC Val TTC Phé	Leu CTC Leu TCT Ser AAG Lys	Gln GAA Glu CTT Leu CGT Arg	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé	Asn CTT Leu ACT Thr AAT Asn	Arg GAC Asp CTC Leu GCA	Leu TTG Leu TAC Tyr TTG	Lys AGC Ser TTA Leu CAG Gln	Glu TTC Phé GAC Asp TAT Tyr	Asp AAT ASN AAC ASN CTG Leu	Ala CAG Gln AAT ASN CGT Arg	Val ATA Ile AAG Lys TTA	Ser GCC Ala ATC Ile TCT Ser	Ala AGA Arg AGC Ser CAC <b>His</b>	Ala CTG Leu AAC Asn AAC <b>Asn</b>	Phé CCT Pro ATC Ile GAA Glu	180 600 200 660 220 720 240	aa pb aa pb aa pb aa
Leu AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG	Thr GGT GJy GJy GAT Asp GCT	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT	Ile AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA	Leu CTC Leu TCT Ser AAG Lys ATA	Gln GAA Glu CTT Leu CGT Arg CCT	His TAC <b>Tyr</b> CTA Leu TTT Phé GGA	Asn CTT Leu ACT Thr AAT Asn AAT	Arg GAC Asp CTC Leu GCA Arg TCT	Leu TTG Leu TAC TTG Leu TTC	Lys AGC Ser TTA Leu CAG Gln AAT	Glu TTC Phé GAC Asp TAT Tyr GTG	Asp AAT ASN AAC CTG Leu TCA	Ala CAG Gln AAT CGT Arg TCC	Val ATA Ile AAG Lys TTA Leu	Ser GCC Ala ATC Ile TCT Ser GTT	Ala AGA Arg AGC Ser CAC <b>His</b> GAG	Ala CTG Leu AAC Asn AAC <b>Asn</b> CTG	Phé CCT Pro ATC Ile GAA Glu GAT	180 600 200 660 220 720 240 780	aa pb aa pb aa pb aa pb
Leu AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG Leu	Thr GGT Gly GGT GAT Asp GCT Ala	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT Asp	Ile AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT Ser	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA Gly	Leu CTC Leu TCT Ser AAG Lys ATA Ile	Gln GAA CTT Leu CGT Arg CCT Pro	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly	Asn CTT Leu ACT Thr AAT ASn AAT Asn	Arg GAC Asp CTC Leu GCA Arg TCT Ser	Leu TTG Leu TAC Tyr TTG Leu TTC	Lys AGC Ser TTA Leu CAG Gln AAT Asn	Glu TTC <b>Phé</b> GAC <b>Asp</b> TAT Tyr GTG	Asp AAT AAC ASN CTG Leu TCA Ser	Ala CAG Gln AAT CGT CGT TCC Ser	Val ATA Ile AAG Lys TTA Leu CTG	Ser GCC Ala ATC Ile TCT Ser GTT Val	Ala AGA Arg AGC Ser CAC His GAG Glu	Ala CTG Leu AAC ASN AAC CTG Leu	Phé CCT Pro ATC Ile GAA GLU GAT ASP	180 600 200 660 220 720 240 780 260	aa pb aa pb aa pb aa pb aa
Leu AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG Leu CTG	Thr GGT GLy GLY GAT ASP GCT Ala TCC	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT Asp TAT	Ile AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT Ser AAC	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA Gly AAG	Leu CTC Leu TCT AAG Lys ATA Ile CTT	Gln GAA CTT Leu CGT Arg CCT Pro AAA	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly AAC	Asn CTT Leu ACT AAT AAT ASN AAT ASN	Arg GAC Asp CTC GCA GCA Arg TCT Ser CCA	Leu TTG Leu TAC Tyr TTG Leu TTC Phé ACT	Lys AGC Ser TTA Leu CAG Gln AAT ASn GTC	Glu TTC Phá GAC Asp TAT Tyr GTG Val AAT	Asp AAT ASN AAC CTG CTG Leu TCA Ser GAA	Ala CAG Gln AAT CGT Arg TCC Ser AAC	Val ATA Ile AAG TTA CTG CTG CTT	Ser GCC Ala ATC TCT Ser GTT GAA	Ala AGA Arg Ser CAC GAG GAG Glu	Ala CTG Leu AAC Asn AAC CTG Leu TAT	Phé CCT Pro ATC GAA GAA GAT ASP TAC	180 600 200 660 220 720 240 780 260 840	aa pb aa pb aa pb aa pb aa
Leu AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG Leu CTG	Thr GGT Gly GGT GAT Asp GCT Ala TCC Ser	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT Asp TAT	Ile AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT Ser AAC <b>ASN</b>	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA Gly AAG Lys	Leu CTC Leu TCT Ser AAG Lys ATA Ile CTT	Gln GAA CTT Leu CGT Arg CCT Pro AAA Lys	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly AAC Asn	Asn CTT Leu ACT Thr AAT AAT AAT ASN ATA Ile	Arg GAC Asp CTC GCA GCA Arg TCT Ser CCA Pro	Leu TTG Leu TAC TTG Leu TTG Phé ACT	Lys AGC <b>Ser</b> TTA CAG GLN AAT ASN GTC Val	Glu TTC GAC Asp TAT Tyr GTG Val AAT Asn	Asp AAT AAC ASN CTG CTG Leu Ser GAA Glu	Ala CAG <b>Gln</b> AAT CGT ACG Ser AAC	Val ATA AAG Lys TTA Leu CTG Leu	Ser GCC Ala ATC Ile TCT Ser GTT Val GAA Glu	Ala AGA Arg Ser CAC His GAG Glu AAC	Ala CTG Leu AAC ASN AAC CTG Leu TAT	Phé CCT Pro ATC GAA GLU GAT ASP TAC	180 600 200 660 220 720 240 780 260 840 280	aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa
AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG <b>Leu</b> CTG	Thr GGT Gly GIy GAT Asp GCT Ala TCC Ser GAG	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT Asp TAT TYT GTC	Tle AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT Ser AAC AAR	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA Gly AAG Lys CAA	Leu CTC Leu TCT Ser AAG Lys ATA Ile CTT Leu CTT	Gln GAA CTT Leu CGT Arg CCT Pro AAA Lys GAG	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly AAC Asn AAG	Asn CTT Leu ACT AAT AAT AAT ASN ATA Ile TTT	Arg GAC Asp CTC GCA Arg TCT Ser CCA Pro GAC	Leu TTG Leu TAC TTG Leu TTC Phé ACT Thr	Lys AGC Ser TTA CAG GIN AAT ASN GTC Val AAG	Glu TTC <b>Phố</b> GAC TAT TYT GTG Val AAT ASN	Asp AAT AAC ASN CTG CTG TCA Ser GAA Glu TTC	Ala CAG AAT ASN CGT ACC Ser AAC ASN TGC	Val ATA Lle TTA CTG CTG Leu CTT	Ser GCC Ala ATC TCT Ser GTT Val GAA Glu ATC	Ala AGA Arg AGC CAC GAC GAG GAG AAC ASN	Ala CTG Leu AAC Asn AAC CTG Leu TAT Tyr GGG	Phé CCT Pro ATC GAA GAU GAU GAT TAC TAC	180 600 200 660 220 720 240 780 260 840 280 900	aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb
AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG CTG CTG CTG	Thr GGT Gly GGT GAT Asp GCT Ala TCC Sar GAG GLu	Phé CTT Leu CTC Leu GAG GAU GAU TAT TAT GTC Val	AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT AAC AAA AAT	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA Gly AAG Lys CAA Gln	Leu CTC Leu TCT Ser AAG Lys ATA Ile CTT Leu CTT	Gln GAA Glu CTT Leu CGT Arg CCT Pro AAA Lys GAG Glu	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly AAC AAS AAG Lys	Asn CTT Leu ACT Thr AAT ASn AAT ASn ATA Ile TTT Phé	Arg GAC Asp CTC Leu GCA Arg TCT Ser CCA Pro GAC Asp	Let TTG Leu TAC TTG Leu TTC Phé ACT Thr ATA Ile	Lys AGC Ser TTA CAG G1n AAT ASN GTC Val AAG Lys	Glu TTC Phé GAC TAT TYT GTG Val AAT ASN AGC Ser	Asp AAT AAC AAC CTG CTG TCA Ser GAA GIu TTC Phé	Ala CAG Gln AAT CGT ACG TCC Ser AAC ASn TGC	Val ATA AAG Lys TTA CTG CTG CTT CTT AAG	Ser GCC Ala ATC Ile GTT GAA GAA GAA ATC Ile	Ala AGA Arg CAC Ser GAC GAG GAG AAC AAC CTG Leu	Ala CTG Leu AAC Asn AAC CTG CTG TAT TAT GGG Gly	Phé CCT Pro ATC Ile GAA GA1 GA1 GAT TAC Tyr CCA Pro	180 600 200 660 220 720 240 780 260 840 280 900 300	aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa
AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG CTG CTG CTG CTG CTG	Thr GGT Gly GGT GAT Asp GCT Ala TCC Ser GAG Glu TCC	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT Asp TAT TAT GTC Val TAC	AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT AGT AAC ASN AAT TCC	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA Gly AAG CAA AGIn AAG	Leu CTC Leu TCT Ser AAG Lys ATA Ile CTT Leu CTT Leu ATC	Gln GAA CTT Leu CGT Arg CCT Pro AAA Lys GAG Glu AAG	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly AAC ASn AAG Lys CAT	Asti CTT Leu ACT AAT ASN ATA Ile TTT Phé TTG	Arg GAC Asp CTC Leu GCA Arg TCT CCA Pro GAC Asp CGT	Let TTG Leu TAC TTG CU TTG ACT Thr ACT Thr ATA Ile TTG	Lys AGC Sar TTA CAG Gln AAT ASn GTC Val AAG Lys GAT	Glu TTC Phé GAC Asp TAT TYT GTG Val AAT AAT ASC Ser GGC	Asp AAT ASN AAC CTG TCA Ser GAA GIu TTC Phé AAT	Ala CAG Gln AAT CGT AcGT CC Ser AAC AAC AAC Cys Cys	Val ATA Ile AAG TTA CTG CTG CTT CTT AAG Lys AAG	Ser GCC Ala ATC TCT Ser GTT Val GAA GLu ATC Ile TCA	Ala AGA Arg Ser CAC His GAG GAU AAC CTG CTG CTG GAA	Ala CTG Leu AAC ASN AAC CTG CTG TAT Tyr GGG Gly ACC	Phé CCT Pro ATC GAA Glu GAT TAC TYT CCA Pro AGT	180 600 200 660 220 720 240 780 260 840 280 900 300 960	aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb
AAA AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG CTG CTG CTG CTG CTG	Thr GGT Gly GGT GAT Asp GCT Ala TCC Ser GAG GLU Ser	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT Asp TAT Tyr GTC Val TAC Tyr	LLe AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT Ser AAC ASN AC ASN TCC Ser	His TCA Ser GTC Val TTC Fhé GGA Gly AAG CAA CAA CAA Lys	Leu CTC Leu TCT AAG Lys ATA Ile CTT Leu CTT Leu ATC	Gln GAA CTT CTT CGT Arg CCT Pro AAA Lys GAG Glu AAG Lys	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly AAC ASn AAG Lys CAT His	Asn CTT Leu ACT AAT ASN AAT ASN ATA Ile TTT Phé TTG Leu	Arg GAC Asp CTC GCA Arg CCA Ser CCA Pro GAC Asp CGT Arg	Lev TTG Leu TAC TTG Leu TTG ACT TTC ATA Lle TTG	Lys AGC Ser TTA CAG CAG AAT AAS GTC Val AAG Lys GAT ASP	Glu TTC Phé GAC TAT TYT GTG Val AST AST AST Ser GGC Gly	Asp AAT ASN AAC CTG TCA Ser GAA Glu TTC Phé AAT	Ala CAG Gln AAT CGT ACC Ser AAC ASN TGC CVS CGC Arg	Val ATA Ile AAG TTA CTG CTT CTT AAG Lys ATC	Ser GCC Ala ATC TCT Ser GTT GAA GLU ATC Ile TCA Ser	Ala AGA Arg AGC CAC <b>His</b> GAG <b>GIU</b> AAC CTG Leu GAA GIU	Ala CTG Leu AAC ASN AC <b>CTG</b> <b>Leu</b> TAT TAT GGG Gly ACC Thr	Phé CCT Pro ATC GAA GLU GAA GLU GAT TAC Tyr CCA Pro AGT Ser	180 600 200 660 220 720 240 780 260 840 280 900 300 960 320	aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa
AAA AAA Lys TCT Ser CCT Pro CTG CTG CTG CTG CTG Leu CTG Leu	Thr GGT Gly GGT Gly GAT Asp GCT Ala TCC Ser GAG Glu TCC Ser CCA	Phé CTT Leu CTC Leu GAG Glu GAT Asp TAT TYT CTT TAC TYT CCG	LLE AAA Lys CCT Pro TAT Tyr AGT AGT AGT AAC ASN CC Ser GAT	His TCA Ser GTC Val TTC Phé GGA Gly AAG CAA CAA CAA AAG Lys ATG	Leu CTC Leu CTT Ser AAG Lys ATA Lle CTT Leu CTT Lou ATC Luc	Gln GAA CTT CTT CGT Arg CCT Arg CCT Arg CCT Arg GAA GAA	His TAC Tyr CTA Leu TTT Phé GGA Gly AAC Asn AAG Lys CAT His TGT	Ann CTT Leu ACT Thr AAT ASN AAT ASN ATA Ile TTT Phé TTG Leu CTA	Arg GAC Asp CTC GCA Arg TCT CCA Pro GAC Asp CGT Arg CGT	Let TTG TAC TYr TTG Leu TTC Phé ACT Thr ATA Ile TTG CU	Lys AGC Ser TTA Leu CAG GIn AAT AAT AAT Val AAG Lys GAT ASP GCT	Glu TTC Phé GAC Asp TAT TYT GTG CAT ASN AGC Ser GGC Gly AAC	Asp AAT ASN AC CTG CTG CTG CTG CA CA Glu TTC Phé AAT CAN	Ala CAG Gln AAT CGT TCC Ser AAC ASn TGC Cys CGC Arg GTC	Val ATA Ile AAG Lys CTG CTG CTG AAG Lys AAC Lys ATC	Ser GCC Ala ATC TCT GTT GTT GAA GIU ATC Ile TCA Ser CTT	Ala AGA Arg AGC Ser CAC GAG AGA CTG CTG Leu GAA Glu AAT	Ala CTG Leu AAC ASN ACTG CTG TAT TYT GGG Gly ACC Thr TAA	Phé CCT Pro ATC Ile GAA Glu GAT TAC Tyr CCA Pro AGT Ser	180 600 220 720 240 780 260 840 280 900 300 960 320 1017	aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb aa pb

Figure 20 : Séquence de l'ADNc codant le lumicanne humain et séquence en acides aminés correspondante. Les 11 répétitions riches en leucine sont surlignées. Les régions surlignées en rose représentent les motifs riches en leucine suivant exactement la séquence : LxxLxLxxNxL/I et celles surlignées en bleu représentent les motifs qui s'en rapprochent (d'après Grover et coll. 1995 ; Chakravarti et coll. 1995). Les résidus de cystéine sont surlignées en vert.

#### 2.4.2.2- Structures secondaire et tertiaire

Les zones présentant des répétitions riches en leucine se présentent généralement sous la forme de feuillets  $\beta$  (Krantz et coll. 1991). La figure 21 représente la structure secondaire du lumicanne de poulet et indique tous les sites potentiels de N-glycosylation et ceux substitués par les chaînes de kératanne sulfate. Les 10 premières répétitions riches en leucine sont contenues dans le domaine central enroulé situé entre les domaines N et C-terminaux. La onzième répétition riche en leucine est située entre les deux cystéines à l'intérieur du domaine C-terminal. La séquence **XLX**, issue de la répétition riche en leucine LXXLXLXXN, est positionnée au sommet de l'enroulement. Cette succession d'enroulements se courbe en une structure en forme d'arche (figure 22). La face interne de la structure en forme d'arche semble impliquée dans les interactions protéine-protéine et notamment dans la liaison avec le collagène alors que la face externe sur laquelle sont fixées les chaines de GAGs semble jouer un rôle dans l'espacement des fibrilles de collagène (Dunlevy et coll. 1998).



Figure 21 : Structure secondaire théorique du lumicanne de poulet ainsi que des sites potentiels de substitution par les chaînes de kératanne sulfate. La localisation des feuillets  $\beta$  au niveau des répétions riches en leucine, les sites de N-glycosylation et de substitution par les chaînes de kératanne sulfate ainsi que les ponts disulfures sont indiqués (d'après Dunlevy et coll. 1998).





### 2.4.2.3- Régulation de l'expression du lumicanne

Funderburgh et coll. (2001) ont montré qu'un traitement des kératocytes cornéens par le TGF-β1 inhibait l'expression de lumicanne. Par contre, le TGF-β2, lui, régule positivement son expression (Saika et coll. 2003).

Après traitement de chondrocytes articulaires humains par certaines cytokines, il a été montré qu'elles pouvaient agir en modulant la synthèse des chaînes de kératanne sulfate. En effet, le b-FGF, l'IGF-1 et le TGF- $\beta$  sont capables de modifier la taille et le degré de substitution des chaînes de kératanne sulfate/polylactosamine. L'IL-1 $\beta$  induirait l'expression de lumicanne dépourvu de chaîne de kératanne sulfate/polylactosamine (Melching et Roughley 1999).

Il a été montré, chez des sujets sains, une diminution du taux d'expression d'ARNm de lumicanne par les fibroblastes dermiques au cours du vieillissement cutané (Vuillermoz et coll. 2005).

#### 2.4.2.4- Dégradation du lumicanne

Le lumicanne est capable d'être clivé en de nombreux sites par la MT1-MMP mais également par la MT3-MMP et la MMP-2 (Li et coll. 2004). Les MMP-1 et MMP-13, elles, ne semblent pas le dégrader (Geng et coll. 2006).

#### 2.4.2.5- Effets biologiques du lumicanne

#### 2.4.2.5.1-Interactions entre lumicanne et collagène de type I

La présence de fibrilles de collagène de diamètre irrégulier et de plus, présentant un espacement variable a été observé dans le stroma cornéen ainsi qu'au niveau de la peau de souris dont le gène du lumicanne a été invalidé. Ces anomalies suggèrent fortement que le lumicanne joue un rôle important dans la régulation de la fibrillogenèse du collagène de type I (Chakravarti et coll. 1998).

Le lumicanne en se fixant au collagène jouerait également un rôle de protecteur en camouflant les sites de clivage des collagénases comme la MMP1 ou la MMP13 (Roughley 2006).

#### 2.4.2.5.2- Rôles du lumicanne dans les tissus

#### 2.4.2.5.2.1- Au niveau de la cornée

Chez des souris *Lum*<sup>-/-</sup>, une observation en microscopie électronique du stroma cornéen postérieur a révélé des fibres de collagène de diamètre anormalement épais et désorganisées alors qu'au niveau du stroma cornéen antérieur, les fibres apparaissent de taille normale. La désorganisation des fibres de collagène explique ainsi l'opacification cornéenne observée. L'expression de lumicanne au niveau de la cornée est donc essentielle à la transparence cornéenne (Chakravarti et coll. 1998 et 2000).

Au niveau de la cornée, en dehors de son implication dans la fibrillogénèse du collagène, il interviendrait également dans la cicatrisation en modulant l'adhésion ou la migration des cellules épithéliales cornéennes (Saika et coll. 2000).

Il a également été montré que le taux d'ARNm du lumicanne fluctue légèrement au cours du développement embryonnaire cornéen mais est maintenu à un niveau très élevé par rapport au taux d'expression d'ARNm du kératocanne et de l'ostéoglycine. Le lumicanne jouerait donc un rôle dans l'embryogenèse (Dunlevy et coll. 2000).
# 2.4.2.5.2.2- Au niveau de la peau et des tendons

Le défaut de fibrillogenèse du collagène de type I dans le modèle de souris dont l'expression de lumicanne est invalidée (*Lum*<sup>-/-</sup>) entraîne une fragilité de la peau et des tendons (Chakravarti et coll. 1998; Jepsen et coll. 2002).

# 2.4.2.5.3- Rôle dans l'inflammation et dans la réponse immunitaire

Il a été montré que le lumicanne sous forme protéique et glycoprotéique, et non sous forme protéoglycannique, est capable de se fixer aux macrophages. La présence de lumicanne au niveau de cornées pathologiques pourrait permettre d'attirer les macrophages au niveau des régions d'inflammation (Funderburgh et coll. 1997).

En plus de réguler l'apoptose, la voie de signalisation Fas-FasL est impliquée dans l'initiation et l'amplification des réponses inflammatoires (Hohlbaum et coll. 2001 ; Saas et coll. 1999 ; Wajant et coll. 2003). Le lumicanne, se liant à FasL, faciliterait l'induction de Fas et serait donc capable de réguler la réponse inflammatoire au travers de la voie de signalisation induite par Fas-FasL (recrutement de macrophages et neutrophiles, induction de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) (Vij et coll. 2005).

L'influence du lumicanne sur la voie de signalisation induite par TLR4 (Toll-Like Receptor 4) a également été étudiée. En effet, le lumicanne se lierait au CD14 (protéine de surface des macrophages, neutrophiles et monocytes liant le LPS (lipopolysaccharide, endotoxine bactérienne)) et permettrait ainsi la présentation du LPS au TLR4 qui induirait de ce fait la production de TNF $\alpha$ , de IL-1 $\beta$  et de IL-6. Le lumicanne jouerait donc un rôle dans la réponse immunitaire induite par le LPS chez les macrophages (Wu et coll. 2007).

# 2.4.2.6- Lumicanne et cancer

De nombreuses études ont montré que le lumicanne est également impliqué dans la tumorogenèse. Par exemple, une accumulation de lumicanne a été observée dans le stroma de plusieurs tumeurs cancéreuses comme dans le cas du carcinome mammaire (Leygue et coll. 2000), des tumeurs pancréatiques (Lu et coll. 2002 (a)) et colorectales (Lu et coll.2002 (b)). De plus il a été montré qu'un faible taux d'expression de lumicanne était associé à un très mauvais pronostic dans le cas du cancer du sein (Troup et coll. 2003).

Dans le cas du mélanome, il a été montré que le lumicanne est capable d'inhiber la croissance et la progression tumorale *in vivo* chez la souris en régulant la migration cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Vuillermoz et coll. 2004). De plus, le lumicanne est exprimé au

niveau du stroma péritumoral avec une diminution significative de son expression associée à une augmentation du niveau d'invasion selon Clark (Brézillon et coll. 2007) (définition voir généralités paragraphe 3.2.2.1).

Enfin, une étude récente a montré que le lumicanne possèderait des propriétés antiangiogéniques. Il inhiberait l'angiogenèse des cellules MB114 (cellules endothéliales de cerveau de souris) (Albig et coll. 2007).

# 3- Le mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne qui n'est ni un carcinome (tumeur épithéliale maligne) ni un sarcome (tumeur conjonctive maligne) mais qui est développée au dépens des mélanocytes. Le mélanome peut se développer à partir de n'importe quelle zone contenant des mélanocytes. Cependant, environ 90 % des mélanomes sont des tumeurs cutanées. Les autres (10 %) concernent des tumeurs des muqueuses ainsi que des tumeurs de la rétine. Le plus souvent, le mélanome est « *de novo* » sur une peau sans anomalie, plus rarement il s'agit d'un nævus qui dégénère. Le mélanome, en dehors de sa forme ophtalmologique, est exceptionnel chez l'enfant, rare avant 20 ans. Au-delà, il survient à tous les âges.

# 3.1- Epidémiologie

## 3.1.1- Incidence et mortalité

L'incidence du mélanome croît depuis plusieurs décennies. Elle double tous les 10 ans depuis 50 ans dans tous les pays du monde. L'incidence en 1995 en France était évaluée à environ 7 à 8 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants (Menegoz et coll. 1997), soit une moyenne entre 5 000 à 6000 nouveaux cas par an, chiffres qui se situent dans la moyenne européenne.

En 2000, le nombre estimé de nouveaux cas de mélanomes cutanés était de 7231, avec 58 % de cas féminins et 42 % de cas masculins. On notait d'importantes disparités géographiques entre les 9 départements français pourvus de registres. L'augmentation de l'incidence s'est accompagnée d'une augmentation de la mortalité. Entre 1969 et 1997, la mortalité par mélanome a été multipliée par 2,7 chez la femme et par 2,9 chez l'homme. En 2000, 1364 décès étaient attribués au mélanome. Les taux de mortalité standardisés sur la population mondiale étaient de 1,6 cas annuels pour 100 000 habitants chez l'homme et 1,1 cas annuels pour 100 000 habitants chez la femme (Grange 2005). En Europe, une augmentation importante de l'incidence et de la mortalité a été enregistrée dans tous les pays depuis les années 1950. Elle était plus précoce et plus importante dans les pays d'Europe du Nord, suivis par ceux d'Europe de l'Ouest, puis de l'Est et du Sud. L'analyse des tendances évolutives récentes montre, dans les pays à très forte incidence comme ceux d'Europe du Nord, une tendance à la stabilisation de l'incidence et une diminution de la mortalité chez les jeunes.

Les incidences françaises et européennes restent loin derrière les records observés et solidement établis en Australie (25 à 35 cas annuels pour 100 000 habitants) et dans les populations blanches d'Hawaï (20 cas annuels pour 100 000 habitants) (Hall et coll. 1999; Czarnecki et coll. 2000 ; Dennis et coll. 1993). Ces fortes disparités géographiques ont été largement expliquées : l'exposition solaire aux heures riches en rayons ultraviolets A et surtout B, intermittente plus que permanente, par des sujets de peau blanche, claire (rousse ou blonde) souvent prédisposés génétiquement à avoir de nombreux nævi pigmentaires, augmente manifestement le risque de mélanome.

# **3.1.2-** Facteurs de risque

#### **3.1.2.1-** Les facteurs de risques constitutionnels

# 3.1.2.1.1- Les facteurs génétiques

Environ 10 % des mélanomes surviennent dans un contexte de mélanome familial, défini comme au moins 2 mélanomes sur 3 générations. Le risque est beaucoup plus marqué si des personnes du premier degré ont été touchées. Le risque de mélanome primitif multiple est de l'ordre de 3 %, et 9 à 12 % des mélanomes surviennent dans un contexte familial lié ou non à un syndrome de *naevi* atypiques. Plusieurs gènes de sensibilité sont vraisemblablement impliqués. Au moins 3 gènes de sensibilité au mélanome ont été identifiés et localisés sur le bras court du chromosome 1, sur le bras long du chromosome 6 et sur le bras court du chromosome 9 (Bale et coll. 1989 ; Trent et coll. 1990 ; Cannon-Albright et coll. 1992).

# **3.1.2.1.2-** Le phototype

Le phototype traduit la sensibilité individuelle au soleil. Les individus à peau claire, qui bronzent peu ou pas, et qui brûlent au soleil (phototypes I et II de Fitzpatrick), sont plus exposés au mélanome que les individus qui bronzent bien (Phototypes III et IV) (Dore et coll. 1990).

#### 3.1.2.1.3- La présence de nævi

La présence de nombreux *naevi* (grains de beauté) sur le corps est un facteur de risque si le nombre de naevi est supérieur à 100 et si leur taille est supérieure à 2 mm. Leur présence multiplie le risque par 4 ou 5 d'avoir un mélanome.

Le problème des *naevi* atypiques (*nævi* de grande taille > 6 mm, de forme et d'aspect irréguliers) est important à considérer ; on peut en distinguer deux variétés, sporadiques ou familiales, avec antécédents de mélanome dans la famille. La présence de *naevi* atypiques est associée à un risque accru de mélanome, risque qui a pu être évalué à 10 % en dix ans (Marghoob et coll. 1994).

Les *nævi* congénitaux présentent un risque de transformation maligne surtout s'ils sont de grande taille.

#### 3.1.2.1.4- Le xeroderma pigmentosum

Il s'agit d'une une maladie congénitale rare, associée à une sensibilité aux rayons UV. Les patients atteints par cette affection n'ont pas la possibilité de réparer l'ADN endommagé suite à l'agression par les rayons UV. Cette anomalie de réparation de l'ADN induit une sensibilité aux cancers cutanés, et plus particulièrement au mélanome.

# 3.1.2.1.5- L'immunodépression

Elle favorise la survenue du mélanome malin. Un taux accru de mélanomes malins a été mis en évidence chez les patients immunodéprimés (greffés rénaux, patients atteints de lymphomes, chimiothérapie). Ces patients doivent être surveillés de façon régulière en particulier s'ils ont de nombreux *nævi*.

#### **3.1.2.2-** Les facteurs de risques environnementaux

# 3.1.2.2.1- Le soleil

Le principal facteur étiologique du mélanome est l'abus d'exposition au soleil. Cependant, les données épidémiologiques sont encore assez contradictoires, et le lien entre mélanome et exposition au soleil est complexe (Dore et coll. 1990 ; Elwood et coll. 1994 ; Boyle et coll. 1995).

Le mélanome est essentiellement une maladie des populations à peau claire. Il existe une association entre latitude de résidence et l'incidence du mélanome dans les populations blanches, et une association entre la durée de résidence à faible latitude et le risque de mélanome. Cependant, en Europe, ce gradient de latitude est inversé, le mélanome étant plus fréquent en Norvège qu'en Grèce ou au Portugal.

De plus, il existe une association entre le risque de mélanome et l'exposition récréative au soleil (pendant les loisirs). Chez l'adulte, le rôle de l'exposition brutale et intermittente au soleil à été suspecté (Holman et coll. 1986).

Une étape importante de l'initiation du mélanome paraît se situer dans l'enfance. Il apparaît aujourd'hui que le nombre de *naevi* pigmentaires est un indicateur de l'ensoleillement reçu durant l'enfance (Kelly et coll. 1994). Les expositions prolongées avant l'âge de 10 ans augmentent le risque de mélanome. En cas de brûlures solaires reçues dans l'enfance, le risque de survenue ultérieure d'un mélanome double.

L'exposition au rayonnement ultraviolet solaire est cancérigène pour l'homme et induit aussi bien des carcinomes cutanés que des mélanomes. Il est à présent bien établi que l'ADN peut être endommagé à toutes les longueurs d'onde d'UV. Le rôle cancérigène des UVB est parfaitement démontré (Donawho et coll. 1994). La relation avec les UV de plus grande longueur d'onde (UVA) est moins directe (figure 23), mais elle a été mise en évidence à la fois par des données expérimentales et épidémiologiques. Bien que moins efficace que l'UVB, l'irradiation aux UVA peut déclencher l'apparition de mélanome (Seltow et coll. 1993).



**Figure 23: Couches de la peau traversées par les différents UV.** Disponible à partir URL : http://infocancer.nexenservices.com/

# 3.1.2.2.2- Les rayons ultraviolets artificiels

Chez l'homme, l'exposition aux lampes et bancs solaires augmenterait le risque de mélanome (Walter et coll. 1990 ; Autier et coll. 1994).

# 3.1.2.2.3- La photothérapie aux « UVA » ou « PUVA »

Cette technique, utilisée dans le traitement du psoriasis, est également un facteur de risque de mélanome, lorsqu'elle est utilisée à haute dose. Ce risque impose un contrôle dosimétrique strict, en particulier pour les organes génitaux masculins. Ceux-ci doivent être protégés pendant les séances.

# **3.2- Diagnostic clinique et pronostic**

# 3.2.1- Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique repose sur l'analyse morphologique d'une lésion cutanée selon les règles de l'ABCDaire. Un mélanome se présente habituellement sous la forme d'une lésion :

A- <u>A</u>symétrique

B- à Bords irréguliers

C- de <u>C</u>ouleur inhomogène

D- de Diamètre supérieur à 6 mm

E- et dont l'Evolution ou l'Extension est permanente

Toute lésion suspecte de mélanome doit être excisée en vue d'un examen histopathologique.

# 3.2.2- Critères du pronostic

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

# 3.2.2.1- La profondeur d'invasion selon Clark et Mihm

Le niveau d'invasion, selon Clark et Mihm (Clark et coll. 1969), est basé sur le concept de franchissement de « barrières anatomiques ». Cette classification permet de définir 5 stades, dénommés : « Clark » avec un chiffre allant de « I » à « V » : Niveau I ou « Clark I » : mélanome malin strictement intra-épidermique Niveau II ou « Clark II » : envahissement du derme papillaire Niveau III ou « Clark III » : envahissement de la jonction réticulo-papillaire du derme Niveau IV ou « Clark IV » : envahissement du derme réticulaire Niveau IV ou « Clark IV » : envahissement du derme réticulaire

# 3.2.2- L'indice de Breslow

La classification de Breslow est basée sur l'épaisseur de la tumeur, en millimètres. La mesure est effectuée à l'oculaire micrométrique et se fait à partir d'une coupe histologique standard. Elle mesure l'épaisseur maximum comprise entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la base de la tumeur (cellule maligne la plus profonde).

L'épaisseur est une appréciation de la masse de la tumeur. Il existe une corrélation presque linéaire entre l'épaisseur et le pronostic (Breslow 1970). Selon la classification de Breslow :

**Epaisseur :** < 0,75 mm = niveau II de Clark

De 0,76 à 1,50 mm = niveau III de Clark Entre 1,51 à 4 mm = niveau IV de Clark 4 mm = niveau V de Clark

# 3.3- Mécanisme d'invasion et de métastases

Le mélanome a d'abord une progression horizontale. Pendant cette phase horizontale de croissance, le mélanome est déjà invasif car il a franchi la jonction épiderme-derme. Cette « phase horizontale » de croissance s'étale sur plusieurs mois voire plusieurs années, jusqu'à 7 ans.

Non traité, le mélanome peut débuter sa phase dite « verticale » d'invasion en profondeur. Cette phase est caractérisée par un nodule qui fait saillie et qui peut suinter ou saigner. La « phase verticale » est d'abord peu invasive (micro-invasive) mais est à haut risque métastatique.

Le mélanome a un très grand potentiel métastatique, il est donc très important de détecter et traiter les mélanomes à un stade précoce. Pour le mélanome, on décrit :

- Les métastases cutanées ou « métastases en transit » sont issues des cellules qui ont quitté la tumeur primitive mais n'ont pas encore atteint les ganglions de drainage.

- Les métastases « classiques » qui se font par migration des cellules tumorales, soit par voie lymphatique, soit par voie sanguine.

Les principales localisations secondaires métastatiques sont pulmonaires, hépatiques et cérébrales (Thomas 2002).

# 3.4- Classification anatomo-clinique des mélanomes (Achten et Ledoux-Corbusier 1986)

# 3.4.1- Le mélanome à extension superficielle

Le mélanome à extension superficielle ou SSM (Superficial Spreading Melanoma) (figure 24) est la forme la plus fréquemment rencontrée de mélanome. Il représente environ 60 à 70 % des cas de mélanome. Il s'observe chez des sujets âgés en moyenne de 40 à 50 ans. Il siège en n'importe quel point du corps mais plus volontiers sur le dos chez l'homme et sur la jambe chez la femme. La lésion est constituée d'une tâche mélanique dont la couleur varie du brun au noir avec des zones plus colorées et parfois des plages rougeâtres ou bleutées.

Cette formation, plane ou légèrement surélevée s'étend horizontalement au point de pouvoir atteindre plusieurs centimètres de diamètre. Ce type de mélanome est invasif. Il évolue en deux phases successives :

- La phase de croissance intra-épidermique horizontale est très longue. Elle s'étale sur plusieurs mois, voire plusieurs années.

- La phase de croissance verticale, s'effectue en quelques mois seulement. Elle est caractérisée par un nodule qui fait saillie et qui peut suinter et saigner.



**Figure 24 : Mélanome à extension superficielle.** Disponible à partir URL : http://www.laconferencehippocrate.com/conhipp/excancer.asp

### 3.4.2- Le mélanome de Dubreuilh

Le mélanome de Dubreuilh (figure 25) se rencontre dans 5 à 10 % des cas de mélanome. Il s'agit d'une forme de mélanome qui touche plus volontiers les personnes âgées, le plus souvent au visage, plus rarement (10 %) au dos des mains ou aux jambes. Elle fait suite à une mélanose de Dubreuilh, qui est un état précancéreux. La lésion est polychrome : brun foncé ou noir avec certaines zones plus claires tandis que d'autres sont rougeâtres ou bleutées. Pour ce mélanome, la phase « horizontale » intra-épidermique est très longue. Elle dure de 10 à 20 ans. Sur cette lésion peuvent apparaître des formations plus infiltrées voire

nodulaire pigmentées ou non, qui peuvent suinter ou saigner, se recouvrir d'une croûte et qui correspondent à la croissance verticale de la lésion, témoin de sa transformation maligne.



**Figure 25 : Mélanome de Dubreuilh.** Disponible à partir URL : http://www.laconferencehippocrate.com/conhipp/excancer.asp

# **3.4.3-** Le mélanome acrolentigineux

Le mélanome acrolentigineux ou ALM (Acral Lentiginous Melanoma) (figure 26) représente 5 à 10 % des mélanomes. Situé sur la paume des mains, la plante des pieds et les extrémités digitales où il s'observe tantôt autour, tantôt sous l'ongle. Ces mélanomes évoluent également en une phase horizontale et une phase verticale. Autour de l'ongle, la formation réalise le panaris mélanique d'Hutchinson avec le plus souvent une coloration noirâtre longitudinale de la tablette unguéale.



**Figure 26 : Mélanome acrolentigineux.** Disponible à partir URL : http://generaliste.medimedia.tm.fr/gene/tl\_fch/dossfmc/gene-2340-fmc.pdf

# 3.4.4- Le mélanome nodulaire

Le mélanome nodulaire ou NM (Nodular Melanoma) (figure 27) représente 15 à 20 % des mélanomes et s'observe vers 50-60 ans. A l'inverse des différents types de mélanomes cités ci-dessus, cette forme a d'emblée une croissance verticale et a pour caractéristique d'être rapidement invasive et plus agressive.



**Figure 27: Mélanome nodulaire du pied.** Disponible à partir URL : http://generaliste.medimedia.tm.fr/gene/tl fch/dossfmc/gene-2340-fmc.pdf

# CHAPITRE II : LES INTEGRINES : RECEPTEURS DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

Les intégrines constituent une large famille de récepteurs membranaires capables de se lier à divers composants de la matrice extracellulaire. Elles interviennent non seulement dans la fixation des cellules à la matrice extracellulaire mais également dans la communication inter et intra-cellulaire (Hynes 1992 ; Ffrench-Constant et Colognato 2004). Les intégrines sont impliquées dans d'importants processus comme le développement et la différenciation, la migration cellulaire, la cicatrisation et le processus métastatique.

# 1- Structure des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques composées de deux sousunités,  $\alpha$  (120 à 180 kDa) et  $\beta$  (90 à 110 kDa), liées de manière non covalente. Cette association s'effectue par le biais de cations divalents. Les deux sous-unités sont constituées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire à une traversée et d'une courte queue cytoplasmique de 20 à 50 acides aminés (figure 28A). Toutefois, il existe une exception à cette structure, rencontrée pour la sous-unité  $\beta$ 4, qui possède un large domaine cytoplasmique de plus de 1000 acides aminés. Le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$ est relié aux composants du cytosquelette (Hynes 1987). Actuellement, chez les mammifères, 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été dénombrées et s'assemblent selon 24 combinaisons possibles (Hynes 2002) (figure 29). Les intégrines peuvent être regroupées en quatre sousfamilles (Kuphal et coll. 2005) :

La sous-famille de  $\beta$ 1, la plus importante, est capable de se combiner à 12 sous-unités  $\alpha$ . Les intégrines  $\beta$ 1 sont largement exprimées à la surface de nombreux types cellulaires et lient principalement les molécules de la MEC aux cellules.

Les sous-familles de  $\beta 2$  et  $\beta 7$  sont des récepteurs spécifiques des leucocytes et interviennent dans les interactions intercellulaires.

La sous-famille de  $\alpha v$  joue un rôle important dans l'organogénèse chez les mammifères et comprend des intégrines qui sont exprimées aussi bien par diverses cellules non cancéreuses, endothéliales, épithéliales, que par différentes cellules cancéreuses (Van der Flier et Sonnenberg 2001).

La sous-famille de  $\beta$ 3 semble associée à une augmentation de la tumorogénicité des mélanomes malins. L'hétérodimère  $\alpha v\beta$ 3 est fortement impliqué dans le développement de

mélanomes malins et dans d'autres tumeurs. L'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 est exprimée par les plaquettes et joue un rôle dans la coagulation sanguine. De plus,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 semble impliquée dans l'invasion des cellules de mélanome humain (Trikha et coll. 1997).

# **1.1-** Les domaines extracellulaires

Le domaine extracellulaire des sous-unités d'intégrine  $\alpha$  contient 7 répétitions homologues, chacune de 60 acides aminés de long. Ces répétitions, au niveau de l'extrémité N-terminale, présentent une structure en forme d'hélice (figure 28A). Chez les mammifères, 9 sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 11,  $\alpha$ D,  $\alpha$ E,  $\alpha$ L,  $\alpha$ M et  $\alpha$ X) contiennent un domaine d'environ 200 acides aminés connu sous le nom de domaine inséré (domaine I) homologue du domaine A du facteur de Von Willebrand. Pour les sous-unités  $\alpha$  qui le possèdent (figure 28B), le domaine I représente le site de fixation du ligand et est donc impliqué dans les interactions protéine-protéine (Hynes 2002 ; Luo et coll. 2007). Ces sous-unités  $\alpha$  contiennent également un site d'adhésion dépendant des ions métalliques ou MIDAS (Metal Ion Dependent Adhesion Site) situé au niveau de l'extrémité supérieure du domaine I/A et qui fait partie intégrante de la poche de liaison du ligand. Certaines sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8 et  $\alpha$ v) sont clivées de manière protéolytique au voisinage du domaine transmembranaire et les deux chaînes sont connectées par un pont disulfure (figure 28A).

Les sous-unités  $\beta$  contiennent quatre segments riches en cystéine au voisinage de la région transmembranaire d'environ 40 acides aminés de long (figure 28A). Un domaine Ilike, contenu par certaines sous-unités  $\beta$ , est capable de lier directement le ligand et de pallier ainsi à l'absence de domaine I de certaines sous-unités  $\alpha$  (figure 28B). Ces sous-unités  $\beta$ comprennent également un domaine MIDAS. Ce domaine MIDAS est capable de s'associer à une partie de la structure en forme d'hélice de la sous-unité  $\alpha$  et, de ce fait, forme le site de liaison du ligand de l'intégrine (Hynes 2002 ; Kuphal 2005).



Figure 28 : (A) Représentation schématique des domaines extracellulaires, transmembranaires et cytoplasmiques des intégrines hétérodimériques (Kuphal et coll. 2005). (B) Représentation schématique des domaines I des sous-unités d'intégrine  $\alpha$  et  $\beta$  (Humphries et coll., 2006).



Figure 29 : Combinaisons existantes entre les diverses sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Les sous-unités  $\alpha$  hachurées ou pointillées en gris possèdent un domaine I/A (Hynes 2002).

# 1.2- Les domaines cytoplasmiques

En dépit du fait que les domaines cytoplasmiques des sous-unités d'intégrines  $\alpha$  et  $\beta$  soient plus petits que leurs domaines extracellulaires (généralement moins de 50 acides aminés) (figure 28), ils jouent un rôle important dans les fonctions des intégrines. Les domaines cytoplasmiques des sous-unités d'intégrines  $\alpha$  et  $\beta$  connectent les molécules de la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine et induisent certaines voies de signalisation en recrutant de nombreuses protéines menant à différentes cascades de phosphorylation (figure 30).

# 2- Rôles généraux des intégrines et applications aux mélanomes

# 2.1- Rôle dans l'adhésion cellulaire

# 2.1.1- Adhésion des cellules à la matrice extracellulaire

De nombreuses intégrines se lient aux protéines de la matrice extracellulaire dont elles sont le récepteur. Parmi les ligands de la matrice extracellulaire on retrouve entre autres la fibronectine, les laminines, les collagènes, la vitronectine, etc... (tableau VIII). Cette liaison est dépendante de cations-divalents comme les cations calcium, magnésium et manganèse. Le site de reconnaissance de ces protéines par de nombreuses intégrines est le tripeptide RGD (Ruoslahti et Pierschbacher 1987). Cependant, d'autres sites de reconnaissance ont été identifiés comme la séquence GPEILDVPST issue de la fibronectine sur laquelle se fixe l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (Guan et Hynes 1990), la séquence KQAGDV issue du fibrinogène sur laquelle se fixe l'intégrine  $\alpha IIb\beta 3$  (Ginsberg et coll. 1988) ou la séquence DGEA du collagène de type I sur laquelle se fixe l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (Yamamoto et coll. 1993).



**Figure 30 : Les protéines de la signalisation intracellulaire et cascades de phosphorylation** (Cornillon et coll. 2003).

**Tableau VIII : Tableau récapitulatif des diverses intégrines ainsi que leur(s) ligand(s) connu(s)** (Hynes 1992 ; Ruoslahti 1991 ; Kuphal 2005).

Sous-	-unités	
β	α	Ligands connus
β1	α1	Collagènes (I, II, IV, VI), laminines
	α2	Collagènes (I, II, III, IV), laminines, chondroadhérine, fibronectine, α3β1
	α3	Collagènes (I, IV), laminines, fibronectine, thrombospondine
	α4	Fibronectine, VCAM-1
	α5	Fibronectine, fibrine, L1-CAM
	α6	Laminines
	α7	Laminines
	α8	Ténascine, fibronectine, and vitronectine
	α9	Ténascine
	α10	Collagènes (I, IV, VI)
	α11	Collagènes (I, II, III)
	αν	Vitronectine, fibronectine
β2	αL	ICAM-1, ICAM-2
	αΜ	Composant du complément C3b, fibrinogène, facteur X, ICAM-1
	αX	Fibrinogène, C3b
	αD	VCAM-1
β3	αIIb	Fibrinogène, fibronectine, facteur de Von Willebrand, thrombospondine
	αν	Vitronectine, fibrinogène, facteur de Von Willebrand, thrombospondine, fibronectine, ostéopontine, collagène IV
β4	α6	Laminine
β5	αν	Vitronectine, ostéopontine

β6	αν	Fibronectine
β7	α4 αΕ	Fibronectine, VCAM-1 E-cadhérine
β8	αν	Fibrine

# 2.1.2- Adhésion cellule-cellule

Certaines intégrines se lient à des protéines membranaires situées à la surface d'autres cellules (appelées aussi « contre-récepteurs »). Les protéines d'adhésion intercellulaires, ICAM-1 et ICAM-2, on été identifiées comme « contre-récepteur » pour l'intégrine  $\alpha L\beta 2$  située à la surface des leucocytes (Springer 1990) et le contre récepteur pour l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  est VCAM-1 (Elices et coll. 1990). ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1 appartiennent à la famille des immunoglobulines.

# 2.2- Voies de signalisation induites par les intégrines

La transduction des signaux *via* les intégrines s'effectue de manière bidirectionnelle entre la matrice extracellulaire et la cellule. Les intégrines sont capables d'activer des voies de signalisation qui affectent la prolifération cellulaire, la différentiation, la migration et bien d'autres événements (figure 31).



Figure 31 : Evénements cellulaires déclenchés par les intégrines (Hynes 2002).

## 2.2.1- Signalisation « inside-out »

La voie de signalisation dite « inside-out » s'effectue de la cellule vers la matrice extracellulaire. Certaines intégrines sont constitutivement exprimées à la surface des cellules or ces intégrines ne présentent pas d'activité fonctionnelle permanente, c'est le cas de  $\beta 2$  à la surface des leucocytes évitant ainsi un état inflammatoire permanent. L'activation des intégrines est donc modulée. Le mécanisme « inside-out » débute au niveau du cytosquelette qui agit comme un modulateur du signal c'est-à-dire en modulateur de l'affinité des récepteurs pour leur ligand. Ce mécanisme entraîne des changements de conformation des domaines extracellulaires des intégrines induits par la séparation des queues cytoplasmiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , et conduisant ainsi à la modification d'affinité des intégrines pour leur récepteur (O'Toole et coll. 1991 ; Kuphal et coll. 2005).

# 2.2.2- Signalisation « outside-in »

Inversement, la voie de signalisation dite « outside-in » s'effectue de la matrice extracellulaire vers la cellule et est responsable de la réponse cellulaire induite par la fixation du ligand sur son récepteur.

# 2.2.3- Les différents événements cellulaires découlant des voies de signalisation induites par les intégrines (figure 30)

L'implication des intégrines dans la motilité cellulaire, l'invasion, la croissance et la survie des cellules de mélanome est à présent bien établie (Parise et coll. 2000 ; Tsuji et coll. 2002 ; Felding-Haberman et coll. 2002). Une liste des différentes intégrines exprimées par les cellules de mélanomes à été établie par Kuphal et coll. en 2005 (tableau IX). Il a été montré que l'expression de certaines intégrines comme  $\alpha\nu\beta3$  et  $\alpha3\beta1$ , dans les cas du mélanome et des carcinomes mammaires et de la prostate, est associée à un phénotype métastatique (Felding-Habermann 2003). L'intégrine  $\alpha\nu\beta3$  semble être importante pour l'adhésion des cellules de mélanomes au collagène dermique et à la suppression de l'apoptose (Montgomery et coll. 1994 ; Petitclerc et coll. 1999).

Le contrôle de la migration dépend de réarrangements au niveau du cytosquelette et de la redistribution des intégrines à la surface cellulaire. Les cellules ainsi polarisées projettent des lamellipodes à l'avant qui s'attachent à la MEC *via* les intégrines. Parallèlement, les contacts cellules-MEC se détachent à l'arrière de la cellule lui permettant ainsi d'avancer au travers de la MEC (Raucher et Sheetz 2000). Ce processus correspond à un recyclage des intégrines. Les intégrines sont connectées au cytosquelette *via* des protéines lien comme la paxilline ou la taline qui sont associées à la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) (Critchley 2000 ; Liu et coll. 2000). La paxilline se lie à plusieurs protéines, comme la vinculine ou l'actopaxine, qui lient l'actine à des régulateurs de la polymérisation et qui, de ce fait contrôlent l'organisation du cytosquelette (Felding-Habermann 2003).

Les intégrines supportant la migration agissent donc de concert avec les protéines de la signalisation cellulaire, les protéines du cytosquelette et les métalloprotéinases pour optimiser la motilité cellulaire et l'invasion. La protéine la plus étudiée interagissant avec les intégrines est la protéine FAK. Il s'agit d'une protéine de 125 kDa co-localisée avec les intégrines au niveau des complexes d'adhésion focale et qui régule l'assemblage du cytosquelette d'actine. FAK contrôle de nombreux processus biologiques comme l'étalement, la prolifération, la migration, la survie cellulaire (Parsons et coll. 2000). FAK semble être requis pour l'adhésion

des cellules de mélanome. Pour les cellules migratoires, FAK est généralement activée, bien que dans certains cas, la phosphorylation de FAK soit corrélée à une diminution de la migration. Il a été montré qu'une inhibition de l'expression de FAK par les cellules de mélanome provoque une perte de l'adhésion cellulaire et une diminution de la migration (Li et coll. 1998). Des expériences d'invalidation de l'expression de FAK par des cellules de carcinome ont montré l'importance de FAK dans la migration cellulaire (Hauk et coll. 2001).

**Tableau IX : Expression des intégrines à la surface des mélanocytes et des cellules de mélanomes** (Kuphal et coll. 2005).

Intégrines	Mélanocytes in situ	Mélanocytes in vitro	Mélanomes primaires et métastatiques	Mélanomes in vitro
α1β1	_	-	+	
α2β1	-		+	+
α3β1		+	+	+
α4β1	-	-	+	-
α5β1	-	+	+	+
α6β1		+	+	+
α7β1	-		+	-
ανβ3	-	+	+	+
ανβ5			+	+
αΠρβ3				+

- : pas d'expression

+ : expression

# Matériels

&

# Méthodes

# **CHAPITRE I : MATERIELS ET REACTIFS**

Les fournisseurs de matériels et de réactifs utilisés pour réaliser les différentes expériences ont été répertoriés dans les listes présentées ci-après (listes alphabétiques).

# 1- Liste des fournisseurs de matériels

Fournisseurs	Matériels
<b>BD Biosciences</b>	Cytomètre en flux FACSCalibur, pipettes stériles
BD Falcon	Grattoirs de cellules
Beckman	Centrifugeuse, spectrophotomètre
Biorad	Mini Protean 3, transblot
Dominique Dutscher	Aiguilles, cryotubes, filtres, flacons de culture Nunc, hémacytomètre, membranes de dialyse MWCO 12-14000 Da et 3500 Da, plaques de culture Nunc, seringues, Thin certs – TC insert 24 puits Greiner, Transwell Costar
Edwards	Lyophilisateur
Eppendorf	Appareil à PCR thermocycler, centrifugeuse, microtubes low binding, pipettes automatiques
Heraeus instruments	Incubateur à CO <sub>2</sub>
Jouan	Hotte à flux laminaire MSC 12
Metler Toledo	pH-mètre
Millipore	Membrane en difluorate de polyvinylidène Immobilon-P transfert
Nikon	Microscope UV Eclipse TE 300
Olympus	Microscope confocal IX70

Starlab	Pointes pour micropipettes
Titertek	Lecteur de microplaques Multiskan PLUS MK II
Vilber lourmat	Analyseur d'images Bioprofil
Zeiss	Microscope optique Axiovert25

# 2- Liste des fournisseurs de réactifs et de milieux de culture cellulaire

Fournisseurs	Réactifs
AbCys	Anticorps monoclonaux anti-intégrines humaines $\alpha_1$ (clone FB12), $\alpha_2$ (clone P1E6), $\alpha_3$ (clone P1B5), $\alpha_4$ (clone P1H4), $\alpha_5$ (clone P1D6), $\alpha_6$ (clone GoH3), $\alpha_v$ (clone P3G8), $\alpha_v\beta_3$ (clone LM609), $\alpha_2\beta_1$ (clone BHA2.1) et $\beta_1$ (clone 6S6), anticorps polyclonal anti-MT1-MMP, fibronectine humaine
Bio101	Kit Geneclean
Biolegend	Anticorps polyclonal anti-paxilline humaine
BIO-RAD	Bio-Rad Protein Assay, kit Silver Stain Plus
Calbiochem	MT1-MMP, Pro-MMP2
CITIFLUOR Ltd	Citifluor
EUROMEDEX	Acrylamide-Bisacrylamide solution 30 %, agar, ampicilline, bleu de bromophénol, Eluta Tube <sup>™</sup> , glucose, HEPES, IPTG, kit de déphosphorylation, MgCl <sub>2</sub> , NaCl, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , SDS, TAE 10X, Tris Amino, urée ultra pure

Invitrogen	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgG <sub>1</sub> , Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-rabbit IgG <sub>1</sub> , Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 conjugated phalloidin, bactéries $\alpha$ DH5, D-PBS, D-PBS + CaCl <sub>2</sub> + MgCl <sub>2</sub> , EDTA, enzymes de restriction, Hoechst-33342, marqueur de taille $\phi$ X174, milieu de culture bactérien Luria Bertani, milieu de culture cellulaire DMEM, Mc Coy's 5A, RPMI 1640, pénicilline-streptomycine, RNase A, tampon de digestion 10X, Taq ADN polymérase haute fidélité, trypsine, trypsine-EDTA, X-Gal
GE Healthcare	Anti-rabbit Ig Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey), hyperfilm, kit d'extraction Biotrak, kit ECL Plus Western Blotting Detection System
Institut de chimie physiologique et de pathobiochimie, Université de Münster, Allemagne	Rhodocétine élaborée par le Dr. J.A. Eble
LGC Promochem, ATCC	Milieu de culture pour cellules A375 : DMEM ajusté à 1,5 g/L de bicarbonate de Na
MERCK	DTT, MnCl <sub>2</sub> , méthanol
PAA Laboratories GmbH	SVF
Pharmacia and UpJohn	Doxorubicine
Promega	Bactéries JM109(DE3), tampon de digestion plasmidique MULTI-CORE™ 10X
QIAGEN	Résine Ni-NTA superflow, plasmides pQE30, pQE31
Roche	Cell Proliferation Reagent WST-1, DNA dilution buffer 5X, Rapid DNA Ligation Kit

Santa Cruz Biotechnology	Anticorps polyclonal anti-pFAK (TyrY397)
Serotec	Anticorps monoclonal anti-vinculine humaine
	Acide ascorbique, agarose, anticorps anti-actine, APMA, APS,
	$\beta$ -mercaptoéthanol, bleu de Coomassie G250, bleu de
	Coomassie R250, BET, BSA, DEPC, DMSO, ECM GEL
SIGMA <sup>®</sup>	(Matrigel <sup>®</sup> ), EDTA, gélatine-agarose, glycérol, glutaraldéhyde,
	IgG1 isotype control (MOPC-21), marqueurs de poids
	moléculaires HMW et LMW, MTT, protéinase K, TEMED,
	Triton <sup>®</sup> X-100, Tween 20, violet cristal
VWR PROLARO RDH	Acétate de potassium, acide acétique, CaCl <sub>2</sub> , chloroforme,
	ethanol absolu, HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KCl, NaOH, propan-2-ol
Whatman	Papier absorbant 3MM

# 3- Souches cellulaires utilisées

A375 (ATCC<sup>®</sup> Number: CRL-1619<sup>™</sup>): cellules de mélanome humain hautement métastatiques, adhérentes.

**B16F1** (ATCC<sup>®</sup> Number: CRL-6323<sup>TM</sup>): cellules de mélanome de souris faiblement métastatiques, adhérentes.

HT144 (ATCC<sup>®</sup> Number: HTB- $63^{TM}$ ): cellules de mélanome humain hautement métastatiques, adhérentes.

**UACC903** (données par le Dr. J.M. Trent, Université du Michigan, Cancer Center, Ann Arbor, MI, USA) : cellules de mélanome humain hautement métastatiques, adhérentes.

# **CHAPITRE II : METHODES**

# 1- Hygiène et sécurité

Les manipulations réalisées au cours de ce travail ont été menées selon les règles d'hygiène et de sécurité établies et validées par la direction du laboratoire de Biochimie médicale et Biologie moléculaire de la faculté de Médecine de Reims.

Les déchets sont triés selon leur nature (biologiques, radioactifs, toxiques ou nuisibles pour l'environnement, papeteries) en vue de leur élimination conformément à la réglementation en vigueur ou de leur recyclage.

# 2- Production du lumicanne humain recombinant

# 2.1- Construction du plasmide d'expression pQE30-HLUM

Le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO contenant l'ADNc du lumicanne humain a été obtenu par le Dr. P.J. ROUGHLEY (Genetics unit, M<sup>c</sup>Gill University, Montreal). Cet ADNc possède un cadre de lecture ouvert codant une protéine de 338 acides aminés.

2.1.1- Amplification du plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO et du plasmide d'expression pQE30

# 2.1.1.1- Transformation des bactéries E. coli aDH5 et sélection sur agar

Deux types de transformation ont été réalisés en parallèle. La première concerne la transformation des bactéries  $\alpha$ DH<sub>5</sub> par le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO, la seconde concerne la transformation de ces mêmes bactéries par le plasmide d'expression pQE30.

Après une incubation de 30 min sur glace, le mélange de plasmides et de bactéries subit un choc thermique 90 secondes à 42°C, suivi d'un refroidissement rapide. Après une pré-incubation d'1 heure à 37 °C dans 750  $\mu$ L de LB, le mélange est concentré par centrifugation. Enfin, 200  $\mu$ L de culture sont étalés sur boîte de pétri contenant 10 mL de LB à 1,5 % d'Agar et 100  $\mu$ g/mL d'ampicilline. Pour les bactéries transformées par le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO contenant l'insert du lumicanne, le milieu ci-dessus contient en plus 140  $\mu$ g/mL d'IPTG et 100  $\mu$ g/mL d'X-GAL. Les bactéries sont incubées une nuit à 37°C.

# 2.1.1.2- Culture des clones sélectionnés en milieu liquide

Les colonies contenant l'insert du lumicanne sont prélevées et ensemencées dans 20 mL de LB à 100 µg/mL d'ampicilline puis sont incubées à 37°C pour la nuit sous agitation.

# 2.1.1.3- Extraction des plasmides (Plasmid Midi Kit)

Les cultures bactériennes sont centrifugées (1500 g, 15 min) et le culot bactérien est repris dans 400  $\mu$ L de tampon de solubilisation (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH8 et contenant 100  $\mu$ g/mL de RNase A) auxquels sont ajoutés 400  $\mu$ L d'une solution de lyse membranaire (NaOH 200 mM, SDS 1% (m/v)). Le mélange est laissé 4 minutes à température ambiante puis est déposé 1 minute sur glace. L'ADN bactérien est ensuite précipité par ajout de 400  $\mu$ L d'une solution d'acétate de potassium 3 M à pH 5,5. Le mélange est ensuite incubé 10 minutes sur glace. Après centrifugation (2000 g, 10 min à 4°C) le surnageant est prélevé et les plasmides sont précipités par ajout de 0,7 volume d'isopropanol. Après centrifugation (17000 g, 15 min à 4°C), le culot plasmidique est séché puis lavé par 1 mL d'éthanol 75 % (v/v) froid.

# 2.1.2- Digestion enzymatique des plasmides pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO et pQE30

Les suspensions plasmidiques sont centrifugées (17000 g, 15 min à 4°C), le culot est repris dans 20  $\mu$ L d'eau puis chauffé à 65°C pendant 5 minutes afin de dénaturer d'éventuelles protéases bactériennes. La digestion enzymatique des plasmides est ensuite réalisée dans un volume de 50  $\mu$ L contenant 5  $\mu$ L de tampon de digestion MULTI-CORE<sup>TM</sup> 10X. Le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO est digéré par 6  $\mu$ L de KpnI à 10 U/ $\mu$ L et 6  $\mu$ L de EcoRV à 10 U/ $\mu$ L, le plasmide pQE30 est, quant à lui, digéré par 2,5  $\mu$ L de KpnI à 10 U/ $\mu$ L et 2,5  $\mu$ L de SmaI à 10 U/ $\mu$ L. Le volume est complété par de l'eau qsp 50 $\mu$ L. La digestion enzymatique du plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO est réalisée à 37°C durant 90 minutes. Quant à celle du plasmide pQE30, elle s'effectue d'abord à 25°C (température optimale pour SmaI) durant 90 minutes puis la solution est vérifiée par une électrophorèse en gel d'agarose 1 % (m/v) contenant du BET. Les fragments sont visualisés sous rayonnement U.V.



**Figure 32: Construction du plasmide d'expression pQE30-HLUM.** Le fragment de 1418 pb contenant l'ADNc du lumicanne humain est inséré dans le plasmide pQE30 linéarisé par les enzymes KpnI et SmaI pour former le plasmide d'expression pQE30-HLUM dont la séquence codant le lumicanne recombinant se trouve flanquée des codons 6xHis. aa : acide aminé, Amp et Kan : gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine, ATG : codon start, Col E1 : origine de réplication, MCS : site de multi-clonage, pb : paire de bases, Plac et LacZa : promoteur lac et gène lacZ, STOP : codons stop dans les 3 cadres de lecture ouverts.

# 2.1.3- Extraction des fragments de restriction (Kit GENECLEAN®)

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

# 2.1.4- Ligation et transformation des bactéries par le plasmide d'expression pQE30 HLUM

La ligation est réalisée selon le protocole Rapid DNA Ligation Kit : à 10  $\mu$ L de solution de plasmide pQE30 digéré par les enzymes KpnI et SmaI, sont ajoutés 5 $\mu$ L de solution contenant l'ADNc du lumicanne humain obtenu après digestion du plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO par les enzymes KpnI et EcoRV, ainsi que 15  $\mu$ L de tampon de ligation 2X et 1  $\mu$ L de ligase (5 U/ $\mu$ L). La réaction se déroule à température ambiante durant 30 minutes (figure 32).

La transformation des bactéries  $\alpha$ DH5 par le plasmide pQE30-HLUM, la sélection des clones, la culture en milieu liquide et l'extraction du plasmide s'effectuent comme décrites dans le paragraphe 2.1.1 à l'exception de la sélection des clones sur agar qui est réalisée en absence d'IPTG et de X-GAL, le plasmide d'expression n'étant pas doté du gène codant l'enzyme  $\beta$ -galactosidase il n'y a donc pas de sélection blanc/bleu possible.

Afin de vérifier la présence de l'insert du lumicanne dans le plasmide pQE30-HLUM, un premier échantillon est digéré par l'enzyme de restriction HindIII, un second échantillon est digéré conjointement par HindIII et KpnI. Puis une électrophorèse en gel d'agarose 1 % (m/v) contenant du BET est réalisée et les fragments de digestion sont ensuite visualisés sous rayonnement U.V. (figure 33B). Les bandes révélées sous U.V. après digestion par HindIII et KpnI reflètent les tailles théoriques attendues à savoir, 3442 pb, 746 pb et 555 pb, à l'exception du fragment de 134 pb, la bande correspondante étant trop diffuse. Après digestion par HindIII, les tailles des fragments obtenus correspondent également aux tailles théoriques attendues, 4188 pb, 555 pb à l'exception du fragment de 134 pb comme précédemment (figure 33A).

L'insert du lumicanne contenu dans le plasmide a été séquencé par la société MWG Biotech. Pour cela, 2 µL de plasmide non digéré sont dilués dans 18 µL d'eau, 2 µL d'acétate de sodium 3 M et dans 3 volumes d'éthanol 100 %. La suspension est laissée une nuit à -20°C afin de précipiter l'ADN. Après centrifugation (12000 g, 20 min à 4°C) le culot est repris dans 1 mL d'éthanol 75 % puis évaporé à sec.

Les bactéries E.coli JM109(DE3), souche d'expression de protéines, sont transformées par le plasmide d'expression pQE30-HLUM selon la procédure décrite ci-dessus.



Figure 33 : (A) Taille théorique des fragments de restriction attendus après digestion du plasmide d'expression pQE30-HLUM par les enzymes HindIII et/ou KpnI. (B) Profil électrophorétique de la digestion enzymatique du plasmide d'expression pQE30-HLUM par HindIII et/ou KpnI.

# 2.2- Expression et purification du lumicanne humain recombinant

# 2.2.1- Culture bactérienne

Les bactéries JM109(DE3) transformées par le plasmide d'expression pQE30-HLUM sont ensemencées dans 25 mL de LB contenant 100  $\mu$ g d'ampicilline/mL. La pré-culture est ensuite incubée à 37°c sous agitation pour la nuit. Puis la pré-culture est diluée dans 100 mL de LB à 50  $\mu$ g d'ampicilline/mL de manière à partir d'une culture dont l'absorbance à 600 nm est de 0,15. La culture est ensuite incubée à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une 0,5<abs<sub>600 nm</sub><0,7.

L'induction de la synthèse de lumicanne recombinant est réalisée par ajout d'IPTG dont la concentration finale est de 0,4 mM. Après 4 heures d'induction, la suspension est centrifugée (2000 g, 15 min à 4°C). Le culot est repris dans 1,5 mL de tampon TE (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4). La suspension bactérienne est soit conservée à - 80°C soit soniquée directement.

## 2.2.2- Extraction du lumicanne recombinant des corps d'inclusion

Les bactéries sont éclatées par sonication sur glace (3 fois 15 sec avec 1 min d'arrêt entre chaque sonication, à l'amplitude 12). Après centrifugation (2000 g, 30 min à 4°C), le culot est repris dans 2 mL de tampon Tris 10 mM, pH 8. La suspension est centrifugée (2000 g, 30 min à 4°C), puis le culot est repris dans 2 mL de tampon d'extraction (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM et urée 8M, pH 8). La suspension est agitée pendant 30 minutes à 4°C. Après centrifugation (12000 g, 15 min à 4°C), le surnageant est récupéré.

# 2.2.3- Purification par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA superflow

Le surnageant mélangé à 1 mL de résine Ni-NTA superflow est agité pendant 1 heure à température ambiante. Après dépôt dans une colonne, ce mélange est lavé successivement par 4 mL de tampon (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM et urée 8M) à pH 6,3 et 5,9. Puis, le lumicanne recombinant est élué par du tampon (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM et urée 8M, pH 4,5). La solution de lumicanne recombinant purifié est ensuite dialysée contre de l'eau distillée pendant 3 jours à 4°C (avec renouvellement de l'eau 3 fois par jour) pour éliminer l'urée. Le lumicanne recombinant est lyophilisé puis conservé à - 20°C. Il sera solubilisé soit par une solution de PBS urée 6M soit par une solution d'acide acétique 18 mM juste avant utilisation.

# 2.2.4- Electrophorèse et Western blotting du lumicanne recombinant

Après solubilisation du lyophilisat dans l'urée 6 M ou dans l'acide acétique 18 mM, le lumicanne recombinant produit est dosé selon la méthode Bradford (Bradford 1976) grâce au réactif Bio-Rad Protein Assay. Les résultats sont exprimés en mg/mL.

Les échantillons sont ensuite analysés par électrophorèse de type SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Laemmli 1970). Les gels de séparation et de concentration contiennent respectivement 10 % et 4 % (m/v) de polyacrylamide. A 10  $\mu$ L de la solution de lumicanne recombinant sont ajoutés 10  $\mu$ L de tampon échantillon 2X (Tris 0,5 M, pH 6,8, SDS 4% (m/v), Glycérol 20 % (v/v) et bleu de bromophénol 2% m/v)) ainsi que 3 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les échantillons réduits sont ensuite dénaturés par chauffage (3 min à 90°C) puis déposés dans le gel. La migration s'effectue pendant environ 90 minutes, d'abord à 10 mA/gel (concentration des échantillons) puis à 20 mA/gel (séparation des échantillons), dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0,5 % (m/v), pH 8,6). Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie R250 (Bleu de Coomassie R250 0,05 % (m/v), acide acétique 10 % (v/v) et propan-2-ol 25 % (v/v)) pendant 20 minutes sous agitation puis décolorés dans l'acide acétique 10 %.

Pour le Western blotting, après migration, le gel est équilibré 30 minutes dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 7,5 % (v/v), pH 8,3). Puis les protéines (environ 10 μg/puits) sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 45 minutes sous une intensité de 10 mA/gel. Pour la révélation, la membrane est saturée 2 heures dans un tampon TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4, Tween 20 0,05 %) contenant 5 % de lait écrémé (m/v) et lavée dans du TBS-T. On réalise ensuite une incubation d'une nuit à 4 °C en présence de l'anticorps polyclonal anti-lumicanne dirigé contre la région C-terminale de la protéine cœur (donné par le Dr. P.ROUGHLEY ; Genetics unit, M<sup>c</sup>Gill University, Montreal)) dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans du TBST à 1 % de lait écrémé (m/v). Après 3 lavages au TBST, la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire de lapin marqué à la péroxydase et dilué au 1/10000<sup>ème</sup> dans du TBST à 1 % de lait écrémé térémé. Trois lavages de 10 minutes au TBST puis un lavage de 5 minutes au TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4) sont effectués. La révélation se fait par chimioluminescence et est réalisée grâce au Kit ECL Plus. Le film d'autoradiographie est développé, séché puis photographié.

# 3- Production des peptides dérivés du lumicanne recombinant

# 3.1- Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-9 et production du peptide L 1-9

La construction du plasmide pQE30-L 1-9 est représentée en figure 34.

La digestion enzymatique du plasmide d'expression pQE30-HLUM a été réalisée dans un volume final de 20  $\mu$ L contenant 2  $\mu$ L de tampon de digestion 10X, 2  $\mu$ L de HindIII à 10 U/ $\mu$ L et qsp 20  $\mu$ L d'eau. Cette réaction se déroule à 37°C pendant 90 minutes.

Après électrophorèse en gel d'agarose 1 % contenant du BET, la bande d'intérêt correspondant au plasmide ouvert est excisée. Le fragment de gel de 1 cm X 0,5 cm est transféré à l'intérieur d'un Eluta Tube<sup>TM</sup>. Le volume est complété par l'ajout de 700  $\mu$ L de tampon de migration TAE 1X. L'éléctroélution est effectuée à 100 volts pendant 40 à 50 minutes. Le plasmide issu du gel est ensuite prélevé et précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de potassium 3 M et d'1 volume d'isopropanol. La solution est déposée 24 heures à - 20°C. Après centrifugation (10000g, 15 min à 4°C), le précipité plasmidique est lavé à l'éthanol 70 %.

La ligation du plasmide sur lui-même est ensuite réalisée comme précédemment selon le protocole Rapid DNA Ligation Kit : le précipité plasmidique est repris par 10  $\mu$ L de tampon de dilution 1X, 10  $\mu$ L de tampon de ligation 2X et 1 $\mu$ L de ligase. La réaction se déroule à température ambiante durant 30 minutes.

Une fois amplifiés par les bactéries  $\alpha DH_5$ , les plasmides sont extraits afin de transformer les bactéries d'expression protéique JM109(DE3). Le peptide L 1-9 a été ensuite produit est purifié dans les mêmes conditions que le lumicanne recombinant.

# 3.2- Construction du plasmide d'expression pQE31-L 4-9 et production du peptide L 4-9

La construction du plasmide pQE31-L 4-9 est représentée en figure 35.

La digestion du plasmide d'expression pQE30-HLUM à été réalisée par les enzymes de restriction HindIII et PstI dans les mêmes conditions que pour la préparation du plasmide pQE30-L 1-9.

En parallèle, le plasmide pQE31 à été digéré par les mêmes enzymes de restriction.

Les différents produits de digestion sont ensuite soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1 % contenant du BET. Les fragments de gel contenant l'ADNc codant le peptide L 4-9 ainsi que le plasmide pQE31 ouvert en sont ensuite extraits puis électroélués dans les mêmes conditions que pour la construction du plasmide pQE30-L 1-9.

La ligation et l'amplification du plasmide pQE31-L 4-9 ainsi que la production et la purification du peptide L 4-9 ont été réalisées suivant le protocole établi pour la production du lumicanne recombinant.



**Figure 34 : Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-9.** Le plasmide pQE30-HLUM est linéarisé après digestion par l'enzyme de restriction HindIII puis le plasmide est lié sur lui même pour former le plasmide d'expression pQE30-L 1-9 dont la séquence code le peptide contenant les LRR 1 à 9. Amp : gène de résistance à l'ampicilline, Col E1 : origine de réplication, **pb :** paire de bases.



**Figure 35 : Construction du plasmide d'expression pQE31-L 4-9.** Le fragment de 365 pb contenant l'ADNc du peptide L 4-9 est sous-cloné dans le plasmide pQE31 linéarisé par les enzymes HindIII et PstI pour former le plasmide d'expression pQE31-L 4-9 dont la séquence code le peptide contenant les LRR 4 à 9. **Amp :** gène de résistance à l'ampicilline, **ATG :** codon start, **Col E1 :** origine de réplication, **MCS :** site de multi-clonage, **pb :** paire de bases, **STOP :** codons stop dans les 3 cadres de lecture ouverts.
### 4- Digestion du lumicanne par la MMP-2 et la MT1-MMP (d'après Li et coll. 2004)

### 4.1- Activation de la pro-MMP-2

Afin d'activer la pro-MMP-2, 200 ng d'enzyme sont solubilisés dans 12,4  $\mu$ l de tampon Tris-test (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 5mM, pH 7,5) et 1,8  $\mu$ l de solution d'APMA (APMA 10 mM dans NaOH 0,1 N). La solution est préparée dans un microtube low binding. Le mélange est ensuite incubé 2 heures à 37°C ou la nuit à 4°C et à l'obscurité.

### 4.2- Digestion du lumicanne

Le lumicanne recombinant dissous dans l'acide acétique 18 mM est ensuite incubé, durant 24 heures, en présence de la solution de MMP-2 activée ou de la MT1-MMP (domaine catalytique repris uniquement dans du tampon Tris-test) à raison de 1  $\mu$ g de lumicanne pour 100 ng d'enzyme. Le volume réactionnel est repris dans 1 volume de tampon échantillon 2X ainsi que 3 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les échantillons réduits sont ensuite dénaturés par chauffage (3 min à 90°C) puis déposés dans le gel à raison de 0,5  $\mu$ g de lumicanne/puits. La digestion du lumicanne est analysée par électrophorèse de type SDS-PAGE. Les gels de séparation et de concentration contiennent respectivement 12 % et 4 % (m/v) de polyacrylamide.

### 4.3- Révélation des fragments de digestion

Les protéines sont révélées grâce au kit Silver Stain Plus par réaction avec l'AgNO<sub>3</sub> (Gottlieb et Chavko 1987).

Après électrophorèse, le gel est incubé dans une solution de fixation (méthanol 50 % (v/v), acide acétique 10 % (v/v), fixative enhancer concentrate 10 % (v/v)) pendant 20 minutes sous agitation puis rincé 2 fois 10 minutes dans de l'eau. Le gel est ensuite incubé dans une solution de coloration préparée juste avant emploi (solution de complexe d'argent 5 % (v/v), solution modératrice de réduction 5 % (v/v), réactif de développement de l'image 5 % (v/v), solution accélératrice de developpement 2,5 % (v/v)) pendant 20 minutes. La réaction est stoppée par incubation dans une solution d'acide acétique à 5 % (v/v).

### 5- Evaluation de l'activité gélatinolytique par zymographie

### 5.1- Dosage des activités gélatinolytiques sécrétées dans le milieu

Les cellules sont ensemencées sur des plaques 24 puits (200000 cellules/puits) tapissées par du lumicanne ou de la BSA (60 µg/puits), incubées 24 heures en présence de milieu contenant 10 % de SVF. Le milieu de culture est ensuite éliminé et les couches cellulaires sont rincées 2 fois avec du milieu sans SVF. Les cellules sont alors incubées 24 ou 48 heures dans du milieu sans SVF. Les milieux de culture sont prélevés, centrifugés pour éliminer les débris cellulaires puis dilués dans 1 volume de tampon échantillon 2X.

### 5.2- Dosage des activités gélatinolytiques des cellules

Les cellules sont rincées 3 fois avec 1 mL de TBS<sup>++</sup> froid (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 7,6). La couche cellulaire est récupérée après ajout de 200  $\mu$ L de TBS<sup>++</sup> froid contenant 1,5 % de triton X-114, puis incubée 15 min à 4°C sous agitation forte et centrifugée (1000 g, 10 min à 4°C). Le surnageant prélevé est chauffé à 37°C pendant 5 minutes puis centrifugé (5000 g, 10 min à 22°C). La phase supérieure correspondant à la phase aqueuse est diluée dans 50  $\mu$ L de TBS<sup>++</sup> froid ; 50  $\mu$ L de gélatine-agarose sont ajoutés à la solution. Après 30 minutes d'incubation sous agitation douce à 4°C, la solution est centrifugée à 380 g et le culot de gélatine-agarose est rincé 3 fois avec 1 mL de TBS<sup>++</sup> froid. Les gélatinases fixées sur le gel de gélatine-agarose sont éluées avec 25  $\mu$ L de tampon échantillon 2X sous agitation forte pendant 15 minutes à 4°C. Après une dernière centrifugation (380 g, 1 min à 22°C) le surnagent est récupéré à l'aide d'une pipette Hamilton (Bordier 1981 ; Monsky et coll. 1993).

### 5.3- Zymographie

Les différents échantillons sont soumis à une électrophorèse (20 mA/gel) en gel de polyacrylamide 10 %, SDS 0,1 %, contenant de la gélatine 0,1 %. Après migration, le gel est lavé dans une solution de Triton X-100 à 2,5 % (m/v) (2 lavages de 30 minutes pour éliminer le SDS et renaturer les protéines) puis incubé 18 heures à 37°C dans un tampon contenant du Tris 50 mM, NaCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,6. Cette étape correspond à la dégradation de la gélatine par les enzymes protéolytiques. Le gel est ensuite coloré par une solution de bleu de Coomassie G250 (bleu de Coomasie 0,1 % (m/v), acide acétique 10 % (v/v), méthanol 40 % (v/v)) pendant 30 minutes, puis décoloré par une solution contenant 10 % d'acide acétique

et 20 % de méthanol jusqu'à l'apparition de bandes blanches correspondant aux zones de digestion par les gélatinases. Les gels sont ensuite photographiés.

### 6- Mesure de l'expression de la MT1-MMP

Les cellules sont cultivées comme précédemment en plaque 24 puits tapissés de 60  $\mu$ g de lumicanne ou de BSA. Après 24 et 48 heures d'incubation dans un milieu sans SVF, les cellules sont rincées avec du PBS, décollées par une solution de trypsine-EDTA 0,25%, puis centrifugées (400 g, 2 min, température ambiante).

Le culot cellulaire est déposé sur la glace, puis dilué par 200  $\mu$ L de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1,5mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, ZnCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ M, Brij35 0,01 % (v/v), Triton X-100 0,25 % (v/v), pH7,6) du kit d'extraction de MT1-MMP Biotrak. Après homogénéisation, la solution est incubée 15 minutes sur la glace puis centrifugée (2000 g, 10 min à 4°C). Le surnageant est récupéré et les protéines dosées selon la méthode Bradford grâce au réactif BIO-RAD protein assay. Le volume correspondant à 20  $\mu$ g de protéines est prélevé et additionné de tampon échantillon 5X et de 3 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol puis soumis à électrophorèse. Le Western blotting est réalisé en utilisant l'anticorps polyclonal anti-MT1-MMP humaine.

### 7- Cultures de cellules

Les cellules sont conservées congelées, plongées dans l'azote liquide, dans du DMEM pour les cellules A375 et UACC903, du RPMI 1640 pour les cellules B16F1 et dans du Mc Coy's 5A pour les cellules HT144. Ces milieux de culture contiennent, pour la congélation, 20 % (v/v) de SVF et 10 % (v/v) de DMSO. Après décongélation, dans un premier temps, à température ambiante et confinées dans du coton cardé, puis à 37°C, la suspension cellulaire est diluée dans 15 ml de DMEM contenant 20 % de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100  $\mu$ g/ml de streptomycine. Les cellules sont cultivées dans des flacons de 25 ou de 75 cm<sup>2</sup> à 37°C sous atmosphère humide et contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 24 heures, le milieu est remplacé par un milieu frais contenant 10 % de SVF pour les cellules A375, UACC903 et HT144, et 5 % de SVF pour les cellules B16F1. Au bout de 3 jours, les cellules arrivent à confluence et sont détachées par trypsinisation (0,25 % de trypsine (v/v) dans PBS ou 0,25 % de trypsine–EDTA pour les cellules A375). Chaque trypsinisation correspond à un passage.

### 8- Méthodes colorimétriques de quantification cellulaire

### 8.1- Coloration au violet cristal

Les cellules, cultivées en plaque de culture 24 ou 96 puits, sont rincées par du PBS et fixées par ajout de 300 ou 100  $\mu$ L d'une solution de glutaraldéhyde 1,1 % (v/v) dans du PBS pendant 20 minutes puis rincées à l'eau distillée et séchées. Les noyaux des cellules sont colorés par ajout de 300 ou 100  $\mu$ L d'une solution de violet cristal 0,1 % (m/v) dans du tampon HEPES 0,2 M pH 6,0 pendant 20 minutes (Kueng et coll. 1989). L'excès de colorant est éliminé. Les plaques sont abondamment rincées et séchées. Le colorant fixé est extrait par ajout de 500 ou 200  $\mu$ L d'acide acétique 10 % (v/v). L'absorbance est mesurée à 560 nm.

### 8.2- Coloration au May-Grünwald-Giemsa

La couche cellulaire est rincée au PBS, les cellules sont ensuite fixées au méthanol pendant 20 minutes puis rincées à l'eau distillée. Enfin, les cellules sont colorées au May-Grünwald-Giemsa (Frink 1965) pendant 20 minutes. Après coloration, l'excès de colorant est éliminé par lavages successifs à l'eau distillée. Le colorant peut être dissous par ajout d'acide acétique 10 % (v/v) et l'absorbance mesurée à 630 nm.

### 8.3- Coloration au MTT

La couche cellulaire rincée au PBS. Du milieu frais, additionné par 1/20<sup>ème</sup> du volume final d'une solution de PBS à 2,5 mg/mL de MTT (3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide) est ajouté. Le MTT, de couleur jaune, est réduit par les succinates déshydrogénases mitochondriales en cristaux pourpres de MTT-formazan solubles dans le DMSO. Après une incubation de 3 heures à 37°C le milieu est aspiré et les cristaux de formazan sont solubilisés par du DMSO. La mesure de l'absorbance est ensuite effectuée à 560 nm.

### 8.4- Coloration au WST-1

A la différence du MTT, le WST-1 est un sel de tétrazolium capable d'être clivé en formazan soluble par les cellules vivantes possédant des déshydrogénases mitochondriales. Il ne nécessite donc pas d'étape de solubilisation dans le DMSO. Comme précédemment, la couche cellulaire est rincée au PBS puis du milieu frais contenant 5 % de WST-1 (v/v) sont

ajoutés. Après une incubation de 2 heures à 37°C, l'absorbance du milieu est mesurée directement à 450 nm.

### 9- Mesure de viabilité cellulaire

A confluence, les cellules sont rincées au PBS puis la couche cellulaire est décollée par ajout de 2 mL de PBS à 0,25 % de Trypsine-EDTA. L'activité de la trypsine est neutralisée par ajout de 4 mL de DMEM à 10 % de SVF. Les cellules sont ensuite centrifugées (400g, 2 min à température ambiante). Le culot cellulaire est repris dans du DMEM à 10 % de SVF à raison de 75000 cellules/mL, 200 µL de cette suspension cellulaire sont alors déposés dans les puits d'une plaque 96 puits (soit 15000 cellules/puits). Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. La couche cellulaire est ensuite rincée au PBS puis le milieu est remplacé soit par du DMEM (contrôle), soit par du DMEM contenant différentes concentrations de lumicanne recombinant dissous dans l'urée 6 M, soit par du DMEM contenant de l'urée aux mêmes concentrations (contrôle). Les cellules sont incubées à nouveau 24 heures à 37°C. La toxicité du lumicanne est ensuite mesurée grâce à l'utilisation de MTT.

### **10- Prolifération cellulaire**

Après trypsinisation et numération des cellules avec un hémacytomètre, la suspension cellulaire est diluée de manière à obtenir 30000 cellules/ml de milieu DMEM à 10 % de SVF. Dans chaque puits d'une plaque 24 puits, 500  $\mu$ L de cette suspension cellulaire sont déposés (soit 15000 cellules/puits). Les cellules sont incubées 2 heures à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub> pour permettre leur adhésion. Le milieu de culture est ensuite éliminé et les cellules sont rincées avec 1 mL de DMEM sans SVF. Puis, la couche cellulaire est incubée dans du milieu contenant 0,2 % de SVF additionné ou non par 5  $\mu$ g/mL de lumicanne. A la fin de la période d'incubation (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 jours), les cellules sont colorées au violet cristal.

### 11- Mesure de l'effet du lumicanne sur l'apoptose

Les cellules (20000/puits en plaque 24 puits) sont déposées sur différents tapis de protéines matricielles ( $60\mu g$ /puits) en absence ou en présence de doxorubicine à 1  $\mu$ M diluée dans le milieu de culture. Après 2, 4 et 24 heures d'incubation, les cellules sont rincées deux fois avec du PBS puis sont incubées 30 minutes à 37°C en présence de 500  $\mu$ L de milieu de

culture à 1µg/mL de Hoechst-33342. La fragmentation nucléaire est ensuite visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence (Eclipse TE 300, Nikon).

### 12- Migration et invasion cellulaire

### 12.1- Préparation des membranes des Transwell®

La migration et l'invasion sont réalisées sur les membranes des Transwell<sup>®</sup>. Pour les essais d'invasion, la face supérieure de la membrane des Transwell<sup>®</sup> est tapissée par 2 fois 100  $\mu$ L d'une solution contenant du Matrigel<sup>®</sup> (50  $\mu$ g/mL) et du lumicanne recombinant (0, 5 ou 50  $\mu$ g/mL). Le Matrigel<sup>®</sup> est dilué au préalable dans du PBS froid, et le lumicanne dans de l'acide acétique 18 mM. Après chaque dépôt de 100  $\mu$ L de cette solution, les membranes sont séchées 24 heures à température ambiante en conditions stériles. Pour les essais de migration, les membranes des Transwell<sup>®</sup> sont tapissées uniquement par une solution de lumicanne dissous dans l'acide acétique 18 mM à raison de 0, 1, 5 et 10  $\mu$ g/ Transwell<sup>®</sup>. Les membranes sont ensuite réhydratées par 100  $\mu$ L de milieu de culture.

### 12.2- Préparation cellulaire

Les cellules contenues dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup> sont d'abord rincées à la PBS puis détachées par ajout de 2 mL de trypsine ou de trypsine–EDTA 0,25 % (v/v). La trypsine est ensuite diluée par ajout de 4 mL de milieu à 0,2 % de BSA (m/v). Les cellules sont centrifugées (400g, 2 min à température ambiante) et le culot cellulaire est repris dans 5 mL de milieu à 0,2 % de BSA (m/v). Les cellules sont alors comptées et la concentration cellulaire est ajustée à 50000 cellules /mL par le même milieu.

Le milieu ayant servi à réhydrater la membrane des Transwell<sup>®</sup> est aspiré puis 800  $\mu$ L de milieu à 2 % de BSA (m/v) et à 10 % de SVF sont déposés dans les compartiments inférieurs du Transwell<sup>®</sup>. 100  $\mu$ L de suspension cellulaire sont alors déposés sur la membrane, soit 50000 cellules/Transwell<sup>®</sup>.

### 12.3- Quantification

Après 24 heures de migration, à 37°C sous atmosphère contenant 5 % de C0<sub>2</sub>, les milieux contenus dans les compartiments supérieurs et inférieurs sont aspirés. Les cellules sont rincées deux fois par 1 mL de PBS (800  $\mu$ L dans le compartiment inférieur et 200  $\mu$ L dans le compartiment supérieur). Les cellules sont fixées au méthanol pendant 20 minutes et rincées à l'eau distillée. Puis, elles sont soit colorées au May-Grünwald-Giemsa (Frink 1965)

soit colorées au violet cristal. La face supérieure de la membrane est ensuite nettoyée à l'aide d'un coton tige de manière à éliminer les cellules qui n'ont pas migré, puis les cellules qui ont migré sont photographiées à l'aide d'un microscope optique Axiovert25 (Zeiss) équipé d'un appareil photo numérique et comptées manuellement. Cinq champs par membrane sont photographiés au grossissement X 81, la moyenne des cellules ayant migré sur les cinq champs est calculée. Chaque condition est réalisée en triple exemplaire.

### 13- Adhésion cellulaire

A partir d'un flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup>, les cellules arrivées à confluence, sont rincées au PBS puis la couche cellulaire est décollée par ajout de 5 mL de PBS à 5 mM EDTA pour ne pas endommager les récepteurs cellulaires. L'effet de l'EDTA est neutralisé par ajout de 5 mL de milieu de culture à 1 % de BSA. Les cellules sont ensuite centrifugées (400g, 2 min à température ambiante). Le culot cellulaire est repris dans du milieu contenant 1 % de BSA à raison de 400000 cellules/mL, 500 µL de cette suspension cellulaire sont alors déposés dans les puits d'une plaque 24 puits (soit 200000 cellules/puits) préalablement recouverts par 60 µg de lumicanne et saturés par de la BSA 1 %. Les cellules sont incubées 2 heures à 37°C pour leur permettre d'adhérer au support. Les cellules ayant adhéré sont ensuite soit quantifiées par une méthode colorimétrique soit comptées. Pour cela, les 500 µL de milieu d'incubation sont prélevés puis la couche cellulaire est lavée par 500 µL de PBS, les deux solutions sont additionnées. Le nombre de cellules n'ayant pas adhéré est déterminé par dénombrement à l'aide d'un hémacytomètre et est ensuite retranché des 200000 cellules déposées initialement.

### 13.1- Mesure de l'effet des cations divalents sur l'adhésion

Après détachement et centrifugation, le culot cellulaire est repris par 10 mL d'une solution de Dulbecco (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, HEPES 30 mM, glucose 10 mM, pH 7,5). Des volumes de suspension cellulaire équivalent à 250000 cellules sont déposés dans des tubes low binding de 2 mL préalablement saturés par du SVF une nuit à 4°C ou 2 heures à température ambiante. Les cellules sont à nouveau centrifugées (400g, 2 min à température ambiante) puis le culot cellulaire est repris par 1,250 mL de solution de Dulbecco contenant différentes concentrations de Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> ou de Ca<sup>2+</sup>. Après une préincubation de 90 minutes à 4°C sous agitation douce, 100  $\mu$ L de suspension cellulaire (20000 cellules) sont déposés en plaque 96 puits tapissés ou non par 10  $\mu$ g/puits de lumicanne. Après 2 heures d'adhésion à

37°C, le milieu est éliminé, les cellules sont rincées au PBS. Les cellules ayant adhéré sont colorées au violet cristal.

### 13.2- Inhibition de l'adhésion cellulaire

### 13.2.1- Par l'EDTA

Les cellules sont préincubées dans du milieu contenant 1 % de BSA et 10 mM d'EDTA pendant 1 heure à 4°C sous agitation douce avant d'être déposées en plaque culture.

### 13.2.2- Par les anticorps bloquants anti-intégrines

Les cellules  $(0,7.10^6$  cellules/mL) sont préincubées en présence de 10 µg/mL d'anticorps bloquant anti- $\alpha_v\beta_3$  (clone LM609), anti- $\alpha_2\beta_1$  (clone BHA2.1), anti-sous unité  $\beta_1$ (clone 6S6), anti-sous unités  $\alpha_1$  (clone FB12),  $\alpha_2$  (clone P1E6),  $\alpha_3$  (clone P1B5),  $\alpha_4$  (clone P1H4),  $\alpha_5$  (clone P1D6),  $\alpha_6$  (clone NKI-GoH3) et  $\alpha_v$  (clone P3G8) à 37°C pendant 90 minutes à température ambiante sous agitation, dans un tube low binding de 2 mL préalablement saturé par du SVF une nuit à 4°C. Les suspensions cellulaires sont ensuite amenées à 400000 cellules/mL de mileu contenant 5 % de SVF. Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits à raison de 200000 cellules/puits.

### 13.2.3.- Par la rhodocétine

L'inhibition de l'adhésion au lumicanne par la rhodocétine est réalisée suivant le protocole utilisé pour l'inhibition de l'adhésion par les anticorps bloquants. Après centrifugation (400g, 2 min à température ambiante) le culot cellulaire est repris dans du milieu contenant 1 % de BSA. Des tubes contenant des volumes de 1,2 mL de suspension cellulaire à 300000 cellules/mL en présence de 10  $\mu$ g/mL de rhodocétine sont préparés. Les cellules sont ensuite ensemencées à raison de 30000 cellules/puits en plaque 96 puits, préalablement recouverts soit par 10  $\mu$ g de lumicanne (soit 2,63.10<sup>-10</sup> mole/puits), soit par 30  $\mu$ g de collagène de type I, soit par 2,63.10<sup>-10</sup> mole de BSA.

### 14- Cytométrie en flux

A partir d'un flacon de culture de 75 cm<sup>2</sup>, à confluence, les cellules sont rincées au PBS puis la couche cellulaire est décollée par ajout de 5 mL de PBS à 5 mM d'EDTA pour ne pas endommager les récepteurs cellulaires. Après centrifugation (400g, 1 min à 4°C), le culot

cellulaire est repris dans 10 mL de PBS à 1 % de BSA. Les cellules sont comptées à l'aide d'un hémacytomètre de Neubauer et environ  $10^6$  cellules sont réparties dans différents tubes selon chaque condition. Les cellules sont de nouveau centrifugées (400g, 1 min à 4°C) puis le culot est repris par 100 µL de PBS à 1 % de BSA contenant 10 µg/mL d'anticorps antiintégrines. Après 1 heure d'incubation sur glace, les cellules sont lavées par 3 fois 1 mL de PBS, centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot cellulaire est ensuite repris par 100 µL de PBS à 1 % de BSA contenant 10 µg/mL d'anticorps secondaire anti-IgG<sub>1</sub> de souris couplé à l'Alexa Fluor<sup>®</sup> 488. Après une incubation d'1 heure sur glace et à l'obscurité, les cellules sont lavées par 3 fois 1 mL de PBS, centrifugées dans 500 µL de PBS. Le cytomètre utilisé pour l'analyse de chaque échantillon est un FACS Calibur (BD Biosciences).

### 15- Microscopie laser confocale

### 15.1- Préparation des lamelles de verre, dépôt et fixation des cellules

Des lamelles de verres stériles, déposées dans des puits d'une plaque 24 puits, sont tapissées par 10  $\mu$ g de lumicanne, de collagène de type I ou de fibronectine. Les lamelles non tapissées servent de contrôle. Les cellules sont rincées au PBS puis détachées par du PBS à 5 mM EDTA et suspendues dans du milieu de culture. Après centrifugation (400g, 2 min à température ambiante), le culot cellulaire est suspendu dans du milieu contenant 10 % de SVF à raison de 80000 cellules/mL, enfin, 500  $\mu$ L de suspension cellulaire (soit 40000 cellules/puits) sont déposés dans les puits contenant les lamelles. Les cellules sont incubées 24 heures à 37°C puis sont fixées par 200  $\mu$ L d'une solution de PBS à 4 % de paraformaldéhyde, pH 7,2, pendant 10 minutes à 4°C.

### 15.2- Immunomarquage

Après saturation par une solution de PBS à 3 % de BSA pendant 10 minutes à température ambiante, la couche cellulaire est rincée 2 fois 5 minutes au PBS. Puis, les cellules sont incubées une nuit à 4°C en présence soit de 200  $\mu$ L d'une solution de PBS à 1 % de BSA contenant 10  $\mu$ g/mL d'anticorps anti-intégrines, soit en présence d'une solution de PBS à 1 % de BSA et 0,1 % de triton X-100 (pour permettre la perméabilisation membranaire) contenant les anticorps anti-paxilline, anti-vinculine, anti-FAKpY397 ou en présence d'Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 couplé à la phalloïdine (marquage direct de l'actine). Les cellules sont ensuite rincées 2 fois 5 minutes au PBS puis incubées dans 200  $\mu$ L de PBS

contenant 10  $\mu$ g/mL d'anticorps secondaires anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin Alexa Fluor<sup>®</sup> 488. Après 1 heure d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la couche cellulaire est de nouveau rincée au PBS. La lamelle contenant les cellules marquées est ensuite montée sur lame, sur laquelle, au préalable, 10  $\mu$ L de citifluor (solution permettant de réduire la perte de fluorescence après illumination) ont été déposés. Lame et lamelle sont ensuite lutées à l'aide d'un vernis à ongle. L'observation des cellules est réalisée à l'aide d'un microscope confocal IX70 (Olympus).

### 16- Analyse statistique des résultats obtenus

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata (au minimum) et les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne des données obtenues  $\pm$  écart-type. Le test t de Student a été utilisé pour l'étude statistique des résultats obtenus. Les niveaux de probabilité sont schématisés de la manière suivante :

NS : différence non significative

\* : p < 0,05 \*\* : p < 0,01 \*\*\* : p < 0,001

# **Résultats**

## CHAPITRE I: EXPRESSION ET CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DU LUMICANNE RECOMBINANT

L'ADNc du lumicanne humain contenu dans le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO code une protéine de 338 acides aminés. L'insert du lumicanne recombinant contenu dans le plasmide d'expression pQE30-HLUM a été séquencé par la société MWG Biotech, selon le brin sens grâce à l'amorce F puis selon le brin complémentaire grâce à l'amorce R (figure 36). En superposant les séquences chevauchantes ainsi déterminées, nous avons pu établir la totalité de la séquence codant le lumicanne recombinant qui comprend 1020 paires de bases et un cadre de lecture ouvert qui code 340 acides aminés. En effet, la digestion du plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO par KpnI ôte à l'insert du lumicanne une région codant 16 acides aminés appartenant au peptide signal. L'insertion du fragment dans le cadre de lecture ouvert du plasmide pQE30 permet de greffer à l'extrémité 5' de l'ADNc du lumicanne une séquence codant 18 acides aminés dont 6 histidines (6xHis) conférant ainsi au lumicanne recombinant une séquence codant 340 acides aminés (figure 37). Les 6xHis ainsi greffées à l'extrémité N-terminale de la protéine sont utilisées lors de l'étape de purification du lumicanne recombinant.

### 1- Expression du lumicanne recombinant par les bactéries JM109(DE3)

Les bactéries JM109(DE3) sont transformées par le plasmide d'expression pQE30-HLUM. Le génome de ces bactéries code le répresseur de l'opéron lactose du plasmide d'expression pQE30-HLUM. L'inhibition due à ce répresseur est levée par l'ajout de 0,4 mM d'IPTG dans le milieu de culture bactérien. Le profil de l'expression de la protéine recombinante a été effectué en gel de polyacrylamide à 10 % en présence de SDS (figure 38) suivi d'un Western blotting réalisé en utilisant un anticorps polyclonal anti-lumicanne dirigé contre la région C-terminale de la protéine (figure 39 B). La masse théorique du lumicanne humain est de 38 kDa (http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a permis de confirmer la masse théorique de notre lumicanne recombinant qui est également de 38 kDa. La présence d'IPTG dans le milieu de culture entraîne une augmentation de l'expression du lumicanne recombinant. Nous avons testé différentes concentrations d'IPTG et l'expression optimale a été obtenue pour une concentration de 0,4 mM (résultat non montré).

Amorce F																					
							5	CGC	JATA	ACAA	[TTC]	ACAC	AG :	3' _							
+1								CG	GATA	ACAAT	TTTC	ACAC	AGAA	TTCAT	TAAZ	AGAG	GAGA	AATT	AACT		
ATG	AGA	GGA	TCG	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	GGA	TCC	GCA	TGC	GAG	CTC	GGT	ACC	AGT	GGC	60	pb
Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Glu	Ser	Ala	Cys	Glu	Leu	Gly	Thr	Ser	Gly	20	aa
CAG	TAC	TAT	GAT	TAT	GAT	TTT	CCC	CTA	TCA	ATT	TAT	GGG	CAA	TCA	TCA	CCA	AAC	TGT	GCA	120	pb
Gln	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Phé	Pro	Leu	Ser	Ile	Tyr	Gly	Gln	Ser	Ser	Pro	Asn	Cys	Ala	40	aa
CCA	GAA	TGT	AAC	TGC	CCT	GAA	AGC	TAC	CCA	AGT	GCC	ATG	TAC	TGT	GAT	GAG	CTG	AAA	TTG	180	pb
Pro	Glu	Cys	Asn	Cys	Pro	Glu	Ser	Tyr	Pro	Ser	Ala	Mét	Tyr	Cys	Asp	Glu	Leu	Lys	Leu	60	aa
AAA	AGT	GTA	CCA	ATG	GTG	CCT	CCT	GGA	ATC	AAG	TAT	CTT	TAC	CTT	AGG	AAT	AAC	CAG	ATT	240	pb
Lys	Ser	Val	Pro	Mét	Val	Pro	Pro	Gly	Ile	Lys	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Gln	Ile	80	aa
GAC	CAT	ATT	GAT	GAA	AAG	GCC	TTT	GAG	AAT	GTA	ACT	GAT	CTG	CAG	TGG	CTC	ATT	CTA	GAT	300	pb
Asp	His	Ile	Asp	Glu	Lys	Ala	Phé	Glu	Asn	Val	Thr	Asp	Leu	Gln	Trp	Leu	Ile	Leu	Asp	100	aa
CAC	AAC	CTT	CTA	GAA	AAC	TCC	AAG	ATA	AAA	GGG	AGA	GTT	TTC	TCT	AAA	TTG	AAA	CAA	CTG	360	pb
His	Asn	Leu	Leu	Glu	Asn	Ser	Lys	Ile	Lys	Gly	Arg	Val	Phé	Ser	Lys	Leu	Lys	Gln	Leu	120	aa
AAG	AAG	CTG	CAT	ATA	AAC	CAC	AAC	AAC	CTG	ACA	GAG	TCT	GTG	GGC	CCA	CTT	CCC	AAA	TCT	420	pb
Lys	Lys	Leu	His	ITe	Asn	His	Asn	Asn	Leu	Thr	GLu	Ser	Val	Gly	Pro	Leu	Pro	Lys	Ser	140	aa
CTG	GAG	GAT	CTG	CAG	CTT	ACT	CAT	AAC	AAG	ATC	ACA	AAG	CTG	GGC	TCT	TTT	GAA	GGA	TTG	480	pb
Leu	GLu	Asp	Leu	GIn	Leu	Thr	His	Asn	Lys	Ile	Thr	Lys	Leu	Gly	Ser	Phe	Glu	GIY	Leu	160	aa
GTA	AAC	CTG	ACC	TTC	ATC	CAT	CTC	CAG	CAC	AAT	CGG	CTG	AAA	GAG	GAT	GCT	GTT	TCA	GCT	540	pb
Val	Asn	Leu	Thr	Phe	TTe	His	Leu	GIN	His	Asn	Arg	Leu	Lys	GIU	Asp	Ala	Val	Ser	Ala	180	aa
GC.L.	TTTT.	AAA	GGT	C.L.L.	AAA	TCA	CTC	GAA	TAC	C.L.L.	GAC	TTG	AGC	TTC	AA.I.	CAG	A'I'A	GCC	AGA	600	pb
Ala	Pne	Lys	GIY	Leu	Lys	Ser	Leu	GLU	Tyr	Leu	Asp	Leu	Ser	Phe	Asn	GIN	TTe	Ala	Arg	200	aa
CTG	CCT	TCT	GGT	CTC	CCT	GIC	TCT	CTT	CTA	ACT	CTC	TAC	T'T'A	GAC	AAC	AAT	AAG	ATC	AGC	660	aq
Leu	Pro	Ser	GIY	Leu	Pro	vai	Ser		Leu			Tyr	Leu	Asp	ASI	ASI	цуз		Ser	220	aa
AAC	AIC	Dre	GAI	GAG	TAI	Dhá	AAG	CGI Awa	III Dhá	AAI	GCA	TIG	CAG	IAI	CIG	CGI	TIA	TCT	CAC	240	aq
ASII		OTC	asp	GIU	TAT	CCA	та Тра	ALG	CCA	ASII	ALA TOT	Ter d	GTII 9 M		Teu	TCC	dred.	Cum	CAC	240	aa Sh
AAC	GAA			GA1 Age	AGI	Clu	TIO	Dro	Clu	AAI	Sor	Dhá	AAI	Unl	Sor	Sor		Val	GAG	260	pp
	CAT	dred.	таа	мар	DET	9 J J C	UTTE UTTE	777	GT Y	ABII	GGY	NOT	ama	vai Nhm	CAA	Der			A D C	200	aa rh
	Agn	Leu	Ser	Tyre	AAC	Lare	Leu	LVC	AAC	TIA	Dro	ACI Thr	Ual Val	AAI	GAA	AAC		GAA	AAC	280	pp
TTAT	TAC	CTC	CAC	CTTC				СУС	77C	TTC	CIC	1111 አጥአ	var var	ACC	TTC	TCC	770	ATC.	CTTC	200	aa nh
	Twr	Leu	GAG	Val	AAI	CAA	Leu	Clu	LVC	Dhá	GAC ∆en	TIO	LVC	Gor	Dhá	Cvc	LVC	TIO	Leu	300	pD aa
CCC	CCA	TTT	TCC	TAC	TCC	AAG	ATC	AAG	СУД	TTC	ССТ	TTC	Сат	CCC	AAT	CCC	лтс		GAA	960	nh
GGG	Dro	Len	Ser	Tyr	Ser	Lvg		LVC	Hig	Leu	Arg	Leu	Agn	Glv	Acn	Arg		Ser	GAA	320	22
ACC	AGT	CTT	CCV	CCC	CAT	лтс	ጥለጥ	CVV	TCT	CTA	CCT	CTT	CCT	A A C	CJ A	CTC	አርሞ	OTT	7 ATT	1020	aa nh
Thr	Ser	T.en	Pro	Pro	Asp	Mét	Tvr	GLU	Cvs	T.ell	Ara	Val	Ala	Asn	GLU	Val	Thr	T.en	Asn	340	aa
The THEOREM AND THE THE ADD NOT IT OF A CID LOW MY VIE AND ADD THE ADD THE ADD											1545	ъb									
11171				•	•	•••	•	•	•	•••	•	•••	•••							_515	20
											•			3,	GGT	CATT	ACTG	GAGT	CTTG	51	
														-		A	more	ce R			

Figure 36 : Séquence de l'ADNc codant le lumicanne recombinant et séquence en acides aminés correspondante. Les régions surlignées en rose représentent les motifs riches en leucine : LxxLxLxxNxL/I et celles surlignées en bleu représentent les motifs qui s'en rapprochent (Grover et coll. 1995 ; Chakravarti et coll. 1995). Les amorces utilisées pour le séquençage sont surlignées en vert. Les 6xHis sont surlignées en jaune. La numérotation des paires de bases (pb) est arbitrairement initiée au niveau de la 1<sup>ère</sup> base du codon ATG notée (+1)».

**(A)** 

### . . . . AACCATTTGCCAAAA

+1 ATG Met	AGT Ser	CTA Leu	AGT Ser	GCA Ala	TTT Phé	ACT Thr	CTC Leu	TTC Phe	CTG Leu	GCA Ala	TTG Leu	ATT Ile	GGT Gly		42 14	pb aa
	Кр	ηI														
<u>GGT</u> Gly	ACC Thr	AGT Ser	GGC Gly	 	 	. AA . Ası	r TAX	A TA: op	FCTG:	[ATC(	CTGGA	AACAX	ATAT	1	039 338	pb aa
EcoRV																
TTTAT TGAGGCAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCA																

1465 pb

**(B)** 

#### . . . . . . . AGGAGAAATTAACT

+1 ATG Met	AGA Arg	GGA Gly	TCG Ser	CAT His	CAC His	CAT His	CAC His	CAT His	CAC His	GGA Glu	TCC Ser	GCA Ala	TGC Cys		42 14	pb aa
			Kpn	I												
GAG Glu	CTC Leu	GGT Gly	ACC Thr	AGT Ser	GGC Gly	 	AAT Asn	TAA Stor	TAT(	CTGTI	ATCC]	rggaž	ACAA	1	.042 340	pb aa
TATITIAT TOAGGCAGGGCGAATTCTGCAGATGGGTCGAC																



**Figure 37 : (A)** Séquence de la région N-terminale de l'ADNc du lumicanne humain inséré dans le plasmide pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (en rose) et sites de clivage des enzymes de restriction KpnI et EcoRV. **(B)** Séquence de la région N-terminale du lumicanne recombinant après insertion dans le cadre de lecture ouvert du plasmide pQE30 (en bleu) entre les sites de restriction KpnI et SmaI. Les 6 résidus d'histidine sont soulignés. La numérotation des paires de bases (pb) est arbitrairement initiée au niveau de la 1<sup>ère</sup> base du codon ATG notée « +1 ».

### 2- Purification du lumicanne recombinant

La majeure partie du lumicanne recombinant produit est insoluble. Pour cette raison, il a dû être extrait des corps d'inclusion par sonication dans un tampon de solubilisation contenant de l'urée 8 M et ajusté à pH 8. La purification du lumicanne recombinant a été réalisée par chromatographie d'affinité sur résine de Ni-NTA Superflow. Elle s'effectue par chélation des ions nickel par les 6xHis fixées à l'extrémité N-terminale de la protéine. Après fixation du lumicanne recombinant sur la résine, le mélange est lavé successivement par le tampon de solubilisation contenant de l'urée 8 M mais à pH décroissant, pH 6,3, pH 5,9. Enfin, le lumicanne est élué de la colonne par le même tampon ajusté à pH 4,5.

Après purification, une seule bande est observée sur gel de polyacrylamide à 10 % en présence de SDS (figure 39 A) et en Western blotting (figure 39 B). La procédure de révélation à la peroxydase du Western blotting reconnaît certaines protéines bactériennes (figure 39 B pistes 1 et 2) mais l'anticorps anti-lumicanne reconnaît fortement la protéine de 38 kDa présente uniquement dans la souche transformée par pQE30-HLUM.

### 3- Rendement de production

Chaque préparation de lumicanne recombinant a été dosée selon la méthode Bradford grâce au réactif BIO-RAD protein assay. Pour 100 mL de culture bactérienne, nous produisons entre 0,8 et 1,5 mg de protéine.

### 4- Caractéristiques biochimiques du lumicanne recombinant

### 4.1- Propriétés physico-chimiques du lumicanne recombinant

Les propriétés physico-chimiques théoriques du lumicanne humain et du lumicanne recombinant, figurant dans le tableau X, ont été obtenues en soumettant leur séquence protéique à l'adresse internet suivante : http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam. Les résultats obtenus montrent des propriétés similaires.



Piste 1 : Lysat de bactéries JM109(DE3) non transformées
Piste 2 : Lysat de bactéries JM109(DE3) transformées par pQE30 sans insert
Piste 3 : Lysat de bactéries JM109(DE3) transformées par pQE30-HLUM
Piste 4 : Standard de masse moléculaire

## **Figure 38 : Profil comparatif d'expression des protéines par les bactéries JM109(DE3).** La bande correspondant au lumicanne recombinant produit par les bactéries transformées par

le plasmide d'expression pQE30-HLUM est indiquée par une flèche. Il s'agit d'une protéine de 38 kDa.

(A)





**Piste 1 :** Après lavage de la résine par le tampon urée 8 M pH 8

**Piste 2 :** Après lavage de la résine par le tampon urée 8 M pH 6,3

**Piste 3 :** Après lavage de la résine par le tampon urée 8 M pH 5,9

**Piste 4 :** Après lavage de la résine par le tampon urée 8 M pH 4,5 :

Piste 5 : Standard de masse moléculaire

**(B)** 



Figure 39 : (A) Mise en évidence par SDS-PAGE de la purification du lumicanne recombinant par chromatographie d'affinité sur résine de Ni-NTA Superflow. Des échantillons de 10  $\mu$ L de chacune des fractions éluées sont prélevés et additionnés par 10  $\mu$ L de tampon échantillon 2X. Après réduction et dénaturation, les échantillons sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide 10 %. Les protéines sont révélées au bleu de Coommassie R250 (B) Western Blotting utilisant un anticorps anti-lumicanne. Les bactéries transformées ou non sont soumises à sonication et des fractions de 10  $\mu$ L sont analysées en Western blotting. Pistes 1 à 3 : avant purification, piste 4 : après purification sur résine Ni-NTA superflow.

	Formule chimique	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique
Lumicanne humain	$C_{1736}H_{2723}N_{449}O_{514}S_{10}$	338	38,4	6,16
Lumicanne recombinant	$C_{1739}H_{2718}N_{466}O_{517}S_{11}$	340	38,8	6,43

# Tableau X : Comparaison des propriétés physico-chimiques entre lumicanne humain et lumicanne recombinant.

### 4.2- Essai de dégradation du lumicanne recombinant par la MMP-2 et la MT1-MMP

Il a été montré par Li et collaborateurs en 2004 que le lumicanne est capable d'être dégradé par des enzymes appartenant à la famille des métalloprotéinases matricielles comme la métalloprotéinase 2 (MMP-2) ou la métalloprotéinase de type membranaire 1 (MT1-MMP ou MMP-14) après 3 heures d'incubation. Nous avons, de ce fait, incubé du lumicanne recombinant en présence de ces deux enzymes comme indiqué dans la partie matériels et méthodes, paragraphe 4.2 et, des échantillons ont été prélevés à différents temps et analysés par électrophorèse de type SDS-PAGE. Après incubation de la MMP-2 active avec le lumicanne, et ce, aussi bien sur des temps courts que sur 24 heures, aucune digestion du lumicanne n'a été observée. L'activation de la MMP-2 a été vérifiée par zymmographie en gel de gélatine. En revanche, de la digestion du lumicanne recombinant par la MT1-MMP résultent, après 24 heures d'incubation, 5 fragments peptidiques dont les tailles s'étendent de 36 kDa à environ 6 kDa (environ 36, 29, 20, et 6 kDa) (figure 40 B). Toutefois, il est possible de distinguer un début de digestion du lumicanne après 12 heures d'incubation avec la MT1-MMP (figure 40 A). La MT1-MMP est donc capable de cliver notre lumicanne recombinant contrairement à la MMP-2.





Figure 40 : Cinétique de dégradation du lumicanne recombinant par la MMP-2 et la MT1-MMP. (A) Le lumicanne recombinant à été incubé en présence de MMP-2 ou de MT1-MMP, à raison de 1µg de lumicanne/100 ng d'enzyme, à  $37^{\circ}$ C pendant 2, 4, 6, 12 et (B) 24 heures. Puis 0,5 µg de lumicanne digéré a été déposé/piste. La digestion du lumicanne est analysée par électrophorèse de type SDS-PAGE. Les gels de séparation et de concentration contiennent respectivement 12 % et 4 % (m/v) de polyacrylamide. Les fragments protéiques sont révélés grâce au kit Silver Stain Plus par réaction avec l'AgNO<sub>3</sub> (Gottlieb et Chavko 1987) et sont soit indiqués par un cadre rose soit par des flèches roses.

# CHAPITRE II : EFFETS DU LUMICANNE RECOMBINANT SUR LES CELLULES DE MELANOME ET DETERMINATION DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE ACTIVE

Après lyophilisation, le lumicanne purifié peut-être solubilisé soit dans un tampon PBS contenant 6 M d'urée soit dans une solution d'acide acétique 18 mM.

### 1- Expression de lumicanne par différents types de cellules

Afin d'étudier les effets du lumicanne recombinant sur les cellules de mélanome nous avons eu à déterminer le modèle cellulaire adéquat. Pour cette détermination, nos critères de sélection se sont portés sur des cellules de mélanome exprimant ou non du lumicanne. Pour cela, l'expression de lumicanne à été mise en évidence par Westerns blottings réalisés à partir d'échantillons de milieux de culture respectifs et à l'aide d'un anticorps polyclonal antilumicanne (figure 41). Les cellules MRC5 (fibroblastes embryonnaires de poumon) et les fibroblastes dermiques sont des cellules connues pour exprimer du lumicanne (Brézillon et coll. 2007) et nous ont servi de contrôles positifs, avec le lumicanne recombinant, pour l'expression. On notera la quantité importante de lumicanne sécrété par les cellules MRC5. Nous avons observé une expression de lumicanne par les cellules de mélanome humain M3Da. En ce qui concerne les cellules de mélanome humain UACC903, l'expression du lumicanne est difficilement interprétable. Le lumicanne sécrété par ces cellules correspond à la forme glycoprotéique du SLRP et sa taille est approximativement de 66 kDa. En revanche, aucune sécrétion de lumicanne n'a été décelée dans les milieux de culture des cellules de mélanome A375. Au cours de travaux précédents, nous avons montré par Western blotting que les cellules de mélanome B16F1 n'expriment pas de lumicanne (Vuillermoz et coll. 2004) et par RT-PCR que les cellules de mélanome HT144 sont capables d'exprimer l'ARNm du lumicanne (Brézillon et coll. 2007). Parmi l'ensemble des cellules testées, trois d'entre elles ont retenu notre attention : les cellules de mélanome humain HT144 qui expriment du lumicanne ainsi que les cellules de mélanome de souris B16F1 et humain A375 qui n'en expriment pas.

### 2- Recherche d'un effet cytotoxique du lumicanne recombinant

Avant d'étudier les effets biologiques du lumicanne sur les cellules de mélanome, nous avons, dans un premier temps, voulu savoir si celui-ci ne risquait pas de présenter d'effet toxique. Pour cela, les cellules ont été incubées en présence de différentes concentrations de lumicanne, initialement dissous dans du PBS à 6 M urée, (0, 5, 10, 20 et 40  $\mu$ g/mL) pendant 24 heures à 37°C. La viabilité cellulaire a été déterminée en utilisant du 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Seules les cellules vivantes possèdent des succinates déshydrogénases mitochondriales actives qui réduisent le MTT de couleur jaune en cristaux pourpres de MTT-formazan solubles dans le DMSO. La mesure de l'absorbance est ensuite effectuée à 560 nm. Comme le montre la figure 42, le lumicanne recombinant utilisé jusqu'à une concentration de 40  $\mu$ g/mL (concentration maximale de notre test) n'a aucun effet cytotoxique sur les cellules de mélanome A375.



Figure 41 : Analyse en Western blotting de la sécrétion de lumicanne dans le milieu de culture de plusieurs cellules. Une fois à confluence les cellules sont rincées par leur milieu de culture respectif. Puis, elles sont incubées 24 heures dans leur milieu de culture sans sérum. Les protéines totales contenues dans le milieu de culture sécrétées en 24 heures sont précipitées par ajout de 10  $\mu$ L d'acide acétique 10 % (pour 1 mL de milieu) et de 3 volumes d'éthanol 100 %. Elles sont ensuite séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % (10  $\mu$ g de protéines totales sont déposés/puits) et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Le lumicanne est révélé grâce à un anticorps polyclonal de lapin antilumicanne.



**Figure 42 : Recherche d'un effet cytotoxique du lumicanne sur les cellules de mélanome humain A375.** Les cellules (15000 cellules/puits en plaque 96 puits) sont incubées 24 heures dans du milieu de culture contenant 10 % de SVF. La couche cellulaire est ensuite rincée au PBS puis les cellules sont incubées de nouveau 24 heures dans du milieu de culture sans SVF contenant différentes concentrations de lumicanne dissous dans du PBS à 6 M urée. La toxicité du lumicanne recombinant est mesurée grâce à l'utilisation de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Après réduction du MTT par les succinates déshydrogénases mitochondriales, les cristaux de formazan produits sont solubilisés dans du DMSO. La mesure de l'absorbance est effectuée à 560 nm.

### 3- Effet du lumicanne sur la prolifération des cellules de mélanome A375

L'effet du lumicanne sur la prolifération a été déterminé par coloration des noyaux cellulaires au violet cristal (figure 43). Les cellules sont cultivées en présence de lumicanne recombinant dilué dans le milieu de culture à raison de 5  $\mu$ g/mL. La prolifération est mesurée chaque jour pendant une semaine. Après différents temps d'incubation, les courbes de prolifération des cellules en présence d'urée ou de lumicanne dans l'urée sont superposables au contrôle sans urée ni lumicanne. Le lumicanne n'entraîne donc aucune modification de la prolifération de ces cellules.



**Figure 43 : Effet du lumicanne sur la prolifération des cellules A375.** Les cellules sont cultivées en plaque 24 puits et ensemencées à raison de 15000 cellules/puits à J0. Après chaque jour d'incubation, les cellules sont colorées au violet cristal et l'absorbance est mesurée à 560 nm.

### 4- Recherche d'un effet apoptotique du lumicanne sur les cellules de mélanome A375

Des travaux préliminaires, réalisés au sein du laboratoire, ont montré que le lumicanne est capable d'induire l'apoptose des cellules de mélanome de souris B16F1 (Vuillermoz et coll. 2004). L'effet apoptotique du lumicanne a de ce fait été étudié sur les cellules de mélanome humain A375. Cette étude a été réalisée en comparaison avec un agent proapoptotique classique : la doxorubicine (1 µM, diluée dans le DMSO) (Zwelling et coll. 1991). Comparé au contrôle contenant du DMSO (figure 44 A, G et M), la morphologie nucléaire est modifiée pour les cellules incubées en présence de doxorubicine. En effet, elles présentent après 2 heures d'incubation, une condensation périnucléaire de la chromatine (figure 44 B) qui augmente avec le temps et qui est associée à une diminution du nombre de cellules adhérentes (figure 44 H et N). En ce qui concerne les cellules A375 incubées sur les lamelles de verre (figure 44 E, K et Q) comme en présence de lumicanne (figure 44 F, L et R), nous n'avons observé aucune variation de leur morphologie nucléaire au bout de 24 heures d'incubation. Le lumicanne n'induit donc pas l'apoptose des cellules de mélanome humain A375.

# 5- Effet du lumicanne recombinant sur la migration et l'invasion des cellules de mélanome

Afin de coloniser les tissus sains, les cellules cancéreuses doivent migrer au travers d'un ensemble de matrices extracellulaires et de membranes basales. Nous avons, de ce fait, étudié l'effet *in vitro* du lumicanne sur la migration et l'invasion des cellules de mélanome de souris B16F1 et de mélanome humain A375.



Figure 44 : Le lumicanne n'induit pas l'apoptose des cellules A375. Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles de verre tapissées ou non par 10  $\mu$ g de protéines matricielles (lumicanne, collagène de type I, fibronectine) ou ensemencées sur des lamelles de verres non tapissées et incubées dans du DMEM contenant soit du DMSO (à la concentration finale de 0,1 %) soit de la doxorubicine (solubilisée dans le DMSO). Les noyaux cellulaires sont colorés au Hoechst 33342 après les temps d'incubation indiqués au niveau de la marge droite. Contrairement à la doxorubicine, le lumicanne n'induit pas l'apoptose des celllules A375. Les cellules en apoptose sont indiquées par des flèches blanches.

127

### 5.1- Effet du lumicanne recombinant sur la migration des cellules de mélanome

Les cellules sont ensemencées sur les membranes de polycarbonate des Transwell<sup>®</sup> recouvertes par différentes quantités de lumicanne recombinant. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont soit colorées au May-Grünwald-Giemsa soit colorées au violet cristal. Les figures 45 et 46 correspondent aux photographies de microscopie optique des cellules B16F1 et A375 fixées sur la face inférieure de la membrane, c'est-à-dire des cellules qui ont migré au travers des divers tapis protéiques. D'après ces photographies, nous avons observé une distribution homogène des cellules ayant migré. De ce fait, les cellules ayant migré ont pu être comptées. La quantification des cellules ayant migré est représentée par les histogrammes des figures 47 et 48. Bien qu'en présence de BSA on observe une légère diminution de la migration des cellules B16F1, la figure 47 montre une diminution significative de la migration des cellules B16F1 de 50 % pour 10 µg de lumicanne déposé par Transwell<sup>®</sup> par rapport à son contrôle BSA. On observe également une diminution de la migration des cellules B16F1 de 50 % pour 10 µg de lumicanne déposés par rapport à son contrôle BSA (figure 48). *In vitro*, le lumicanne est donc capable de diminuer la migration des cellules de mélanome de souris B16F1 et de mélanome humain A375.

### 5.2- Effet du lumicanne recombinant sur l'invasion des cellules de mélanome

Les cellules sont ensemencées sur la membrane de polycarbonate des Transwell<sup>®</sup> recouverte de Matrigel<sup>®</sup> additionné de différentes quantités de lumicanne recombinant. Comme pour la mesure de la migration, après 24 heures d'incubation, les cellules sont colorées soit au May-Grünwald-Giemsa soit au violet cristal, photographiées puis comptées. La BSA n'ayant aucune influence significative sur la migration cellulaire, nous ne l'avons pas utilisée comme contrôle pour l'étude de l'invasion. Lorsque les cellules sont déposées sur 10 µg de lumicanne recombinant/Transwell<sup>®</sup>, on observe une diminution de l'invasion de la membrane basale artificielle de 80 % pour des cellules B16F1 et de 23 % pour les cellules A375 (figures 49 et 50).

## (A) Témoin



### (B) 1 µg de BSA



(D) 10 µg de BSA

(C) 1 µg de lumicanne







Figure 45 : Observation des cellules B16F1 en microscopie optique. (A) Migration en absence de tapis protéique, (B) au travers d'un filtre de Transwell® tapissé par 1  $\mu$ g de BSA, (C) par 1  $\mu$ g de lumicanne, (D) par 10  $\mu$ g de BSA et (E) par 10  $\mu$ g de lumicanne. Les cellules sont colorées au May-Grünwald-Giemsa. Les pores de la membrane des Transwell<sup>®</sup> sont visibles, leur diamètre est de 8  $\mu$ m.

## (A) Témoin



(C) 5 µg de lumicanne

### (B) 1 µg de lumicanne



(D) 10 µg de lumicanne



Figure 46 : Observation des cellules A375 en microscopie optique. (A) Migration en absence de tapis protéique, (B) au travers d'un filtre de Transwell® tapissé par 1  $\mu$ g de lumicanne, (C) par 5  $\mu$ g de lumicanne et (D) par 10  $\mu$ g de lumicanne. Les cellules sont colorées au violet cristal.



Figure 47 : Effet du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome de souris B16F1. 50000 cellules sont déposées sur la face supérieure de la membrane des Transwell<sup>®</sup> non tapissée ou tapissée par 1 ou 10  $\mu$ g de BSA ou de lumicanne recombinant. Après 24 heures de migration, les cellules sont colorées au May-Grünwald-Giemsa. Les cellules ayant migré sont comptées dans les 5 champs d'observation photographiés/membrane. Chaque condition à été réalisée en *triplicata*. L'histogramme représente la moyenne des cellules ayant migré/champs d'observation en fonction de la quantité de protéine déposée/Transwell<sup>®</sup>. (\* p<0,05).



**Figure 48 : Effet du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome humain A375.** Cette étude a été réalisée dans les mêmes conditions que pour la migration des cellules de mélanome B16F1, à la différence que les cellules de mélanome A375 ont été colorées au violet cristal. (\* p<0,05).



Figure 49 : Effet du lumicanne sur l'invasion des cellules de mélanome de souris B16F1 au travers d'une membrane basale artificielle de Matrigel<sup>®</sup>. 50000 cellules sont déposées sur la face supérieure de la membrane des Transwell<sup>®</sup> tapissée par 10  $\mu$ g de Matrigel<sup>®</sup> additionné ou non par 1 ou 10  $\mu$ g de lumicanne recombinant. La quantification des cellules ayant migré est réalisée comme lors de l'étude de la migration des cellules B16F1. (\*\* p<0,01).



**Figure 50 : Effet du lumicanne sur l'invasion des cellules de mélanome humain A375 au travers d'une membrane basale artificielle de Matrigel<sup>®</sup>.** Cette étude a été réalisée dans les mêmes conditions que pour l'invasion des cellules B16F1 à la différence que les cellules A375 ont été colorées au violet cristal. (\* p<0,05).

# 6- Effet du lumicanne recombinant sur l'expression et l'activité des métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) sont des enzymes protéolytiques impliquées dans la progression du mélanome (Stetler-Stevenson et coll. 1993). Les MMPs sont des endopeptidases zinc-dépendantes capables de dégrader un ou plusieurs composants de la matrice extracellulaire (Hornebeck et coll. 2002). Après avoir démontré que le lumicanne inhibe la migration et l'invasion des cellules de mélanome, nous avons cherché à déterminer quelle pouvait être l'action du lumicanne sur l'expression et l'activité des MMPs.

### 6.1- Etude de l'activité gélatinolytique par zymographie

L'activité gélatinolytique des cellules A375 cultivées sur lumicanne est étudiée par la technique de zymographie, dans le milieu de culture et au niveau des extraits membranaires. Les cellules sont cultivées pendant 24 et 48 heures en absence de sérum de veau fœtal. La figure 51 montre les résultats obtenus en zymogramme-gélatine à partir des milieux d'incubation des cellules A375. Dans nos conditions, les cellules A375 n'expriment que la gélatinase A (MMP-2; 72 kDa) et sa sécrétion dans les milieux de culture s'effectue uniquement sous sa forme pro-enzyme. De plus, quel que soit le substrat utilisé, BSA ou lumicanne, aucune différence significative de la sécrétion de cette gélatinase n'a été observée. Des résultats identiques ont été obtenus à partir du zymogramme d'extraits membranaires de cellules A375 (figure 52).

### 6.2- Effet du lumicanne sur l'expression de la MT1-MMP par Western blotting

La MT1-MMP est une métalloprotéinase matricielle de type membranaire qui permet d'une part l'activation de la MMP-2 latente ; elle est d'autre part capable de dégrader elle même les différents composants de la matrice extracellulaire. Nous avons donc étudié l'effet du lumicanne sur l'expression de la MT1-MMP par les cellules A375. Pour cela, comme précédemment, les cellules sont cultivées 24 et 48 heures sans sérum de veau fœtal sur lumicanne. Les échantillons de protéines membranaires extraites sont ensuite analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 10 % en présence de SDS. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et soumises à une immunorévélation à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la MT1-MMP humaine et reconnaissant les formes pro, active et dégradée de cette enzyme. Les résultats ainsi obtenus sont présentés figure 53. A 24 et 48 heures d'incubation et quelles que soient les conditions de culture, une bande d'une masse moléculaire apparente de 66 kDa est mise en évidence. La protéine de 66 kDa immuno-révélée correspond à la forme inactive de la MT1-MMP. Aucune variation significative de l'expression de cette forme zymogène en présence de lumicanne n'a été observée.



Figure 51: Zymogramme de milieu de culture de cellules A375. Les cellules sont ensemencées en plaque 24 puits (200000 cellules/puits) tapissées ou non de 60  $\mu$ g de lumicanne (Lum) ou de BSA et cultivées 24 heures dans du milieu de culture contenant 10 % de sérum. Les cellules sont ensuite incubées 24 ou 48 heures sans sérum. Les milieux d'incubation sans SVF sont prélevés et 10  $\mu$ L de chaque échantillon est déposé en zymographie en gel de gélatine. Les bandes blanches correspondent aux plages de lyse de la gélatine contenue dans le gel.



Figure 52 : Zymogramme d'extraits membranaires de cellules A375. La couche cellulaire est récupérée après ajout de 200  $\mu$ L de TBS<sup>++</sup> (voir matériels et méthodes paragraphe 5.2). Les gélatinases sont concentrées par fixation sur gel de gélatine-agarose puis éluées avec du tampon échantillon 2X et déposées en zymographie en gel de gélatine. Puis 0,2  $\mu$ g de protéines est déposé par puits.



Figure 53 : Effet du lumicanne sur l'expression de la MT1-MMP par les cellules A375. Comme précédemment, les cellules sont incubées 24 et 48 heures en présence ou en absence de lumicanne (Lum) ou de BSA dans un milieu de culture sans sérum. Les extraits membranaires (12  $\mu$ g de protéines/puits) sont analysés par Western blotting grâce aux anticorps anti-MT1-MMP.

### 7- Effet du lumicanne recombinant sur l'adhésion des cellules de mélanome

L'interaction entre cellules cancéreuses et matrice extracellulaire constitue une étape majeure de la progression tumorale. Le lumicanne n'ayant aucun effet sur l'expression et l'activation des MMPs décrites précédemment, nous avons étudié l'effet du lumicanne sur l'adhésion cellulaire afin d'expliquer l'inhibition de la migration et de l'invasion qu'il induit. Les cellules ont été ensemencées en plaques de cultures recouvertes ou non de lumicanne. Après 2 heures d'adhésion, les cellules sont soit incubées 2 heures en présence d'une solution de WST-1 soit colorées au May-Grünwald–Giemsa.

Comme le montre la figure 54, sur un tapis de lumicanne, l'adhésion des cellules de mélanome est supérieure à celle observée sur le plastique (témoin) et ce, quelles que soient les cellules de mélanome testées, A375, B16F1 et HT144.

Les cellules B16F1 et A375 ont également été déposées dans des puits recouverts par une quantité croissante de lumicanne. Les valeurs d'absorbance obtenues montrent une augmentation dose-dépendante de l'adhésion (figures 55 et 56).



**Figure 54 : Adhésion de différentes cellules de mélanome sur lumicanne.** Les cellules de mélanome (200000 cellules/puits, plaque 24 puits) sont cultivées 2 heures à 37°C en présence d'un tapis de lumicanne (60  $\mu$ g/puits), puis, sont incubées 2 heures en présence d'une solution de WST-1. La lecture de l'absorbance est réalisée à 450 nm. (\*\* p<0,01).


**Figure 55 : Mesure de l'adhésion des cellules de mélanome de souris B16F1.** Les cellules (20000/puits, plaque 96 puits) sont cultivées 2 heures à 37°C en présence d'une quantité croissante de lumicanne. Les cellules sont ensuite colorées au May-Grünwald-Giemsa puis l'absorbance est mesurée à 630 nm. (\*\* p<0,01).



**Figure 56 : Mesure de l'adhésion des cellules de mélanome humain A375.** Les cellules (20000 cellules/puits, plaque 96 puits) sont cultivées 2 heures à  $37^{\circ}$ C en présence d'une quantité croissante de lumicanne. Les cellules ayant adhéré sont révélées grâce au WST-1. L'absorbance est mesurée à 450 nm. (\* p<0,05 ; \*\* p<0,01).

#### 8- Détermination de la séquence peptidique active du lumicanne

Les régions riches en leucine LRR5 et 6 de la décorine et la LRR11 de la fibromoduline sont impliquées dans la fixation du collagène de type I (Kalamajski et coll. 2007 ; Kalamajski et Oldberg 2007). La décorine est dotée d'une activité anti-tumorale (Reed et coll. 2005 ; Tralhao et coll. 2003). Sulochana et son équipe, en 2005, ont mis en évidence que la région riche en leucine LRR5 de la décorine possède une activité anti-angiogénique (Sulochana et coll. 2005). Nous avons montré que le lumicanne est capable de diminuer la migration et d'augmenter l'adhésion cellulaire. De ce fait, des travaux concernant la détermination de la (les) séquence(s) active(s) du lumicanne ont été menés. Pour cela, des peptides correspondants à différents fragments du lumicanne ont été produits puis testés en culture cellulaire sur l'adhésion et la migration des cellules de mélanome humain A375.

#### 8.1- Production du peptide L 1-9

Après digestion enzymatique du plasmide pQE30-HLUM par HindIII, le plasmide linéarisé est relié sur lui-même de manière à former le plasmide d'expression pQE30-L 1.9 (matériels et méthodes figure 34). La digestion enzymatique a permis de créer une séquence codant un peptide de 269 acides aminés. Ce peptide, produit par l'intermédiaire des bactéries JM109(DE3), a été nommé L 1-9 car il contient les 9 premières régions riches en leucine sur les 11 que contient le lumicanne. Sa séquence protéique est présentée en figure 57.

#### 8.2- Production du peptide L 4-9

Des digestions simultanées des plasmides pQE30-HLUM et pQE31 par les enzymes de restriction HindIII et PstI ont été réalisées. Le fragment d'ADNc codant le peptide L 4-9 à ensuite été inséré dans le plasmide pQE31 linéarisé de manière à former le plasmide d'expression pQE31-L 4-9 (matériels et méthodes figure 35). Le peptide L 4-9, comme son nom l'indique, est un peptide contenant les régions riches en leucine du lumicanne allant de 4 à 9 et constitué de 148 acides aminés au total. Sa séquence protéique est également présentée en figure 57.

#### 8.3- Caractéristiques physico-chimiques des peptides issus du lumicanne produits

Les caractéristiques physico-chimiques des peptides L 1-9 et L 4-9 sont indiquées dans le tableau XI et elles ont été obtenues en soumettant leur séquence protéique à l'adresse internet suivante : http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam.

MRGSHHHHHHGSACELGTSG	MRGSHHHHHHGSACELGTSG	
QYYDYDFPLSIYGQSSPNCA	QYYDYDFPLSIYGQSSPNCA	
PECNCPESYPSAMYCDELKL	PECNCPESYPSAMYCDELKL	
KSVPMVPPGIKYLYLRNNQI	KSVPMVPPGIKYLYLRNNQI	
DHIDEKAFENVTDLQWLILD	DHIDEKAFENVTDLQWLILD	
HNLLENSKIKGRVFSKLKQL	HNLLENSKIKGRVFSKLKQL	
KKLHINHNNLTESVGPLPKS	KKLHINHNNLTESVGPLPKS	MRGSHHHHHHTDPHASSVP
LEDLQLTHNKITKLGSFEGL	LEDLQLTHNKITKLGSFEGL	RVDLQLTHNKITKLGSFEGL
VNLTFIHLQHNRLKEDAVSA	VNLTFIHLQHNRLKEDAVSA	VNLTFIHLQHNRLKEDAVSA
AFKGLKSLEYLDLSFNQIAR	AFKGLKSLEYLDLSFNQIAR	AFKGLKSLEYLDLSFNQIAR
LPSGLPVSLLTLYLDNNKIS	LPSGLPVSLLTLYLDNNKIS	LPSGLPVSLLTLYLDNNKIS
NIPDEYFKRFNALQYLRLSH	NIPDEYFKRFNALQYLRLSH	NIPDEYFKRFNALQYLRLSH
NELADSGIPGNSFNVSSLVE	NELADSGIPGNSFNVSSLVE	NELADSGIPGNSFNVSSLVE
LDLSYNKLKNIPTVNENLEN	LDLSYNKLN	LDLSYNKLN
YYLEVNQLEKFDIKSFCKIL		
GPLSYSKIKHLRLDGNRISE		<b>T</b> ( <b>A</b>
TSLPPDMYECLRVANEVTLN	L 1-9 L 4-9	

### Lumicanne recombinant

**Figure 57 : Comparaison des séquences en acides aminés du lumicanne recombinant et des peptides L 1-9 et L 4-9 produits.** Le peptide L 1-9 contient les 9 premières régions riches en leucine sur les 11 que contient le lumicanne et le peptide L 4-9 contient les régions riches en leucinne allant de LRR4 à LRR9. Le tag 6xHis est mis en valeur en vert et les motifs riches en leucine en rose.

#### Tableau XI : Caractéristiques physico-chimiques des peptides issus du lumicanne

	Formule chimique	Nombre d'acides aminés	Masse moléculaire (kDa)	Point isoélectrique
L 1-9	$C_{1370}H_{2130}N_{370}O_{406}S_8$	269	30,5	6,53
L 4-9	$C_{751}H_{1125}N_{213}O_{220}S_1$	148	16,7	8,34

#### 8.4- Effet des peptides L 1-9 et L 4-9 sur l'adhésion des cellules A375

Les cellules ont été ensemencées en plaques 24 puits dont les puits ont été recouverts ou non de BSA, de lumicanne ou de peptides L 1-9 et L 4-9. Après 2 heures d'adhésion, les cellules n'ayant pas adhéré ont été comptées de manière à déterminer le pourcentage de cellules adhérentes par rapport au nombre de cellules déposées. Comme le montre la figure 58, l'adhésion des cellules au peptide L 1-9 est similaire à celle obtenue en présence de lumicanne. En revanche, nous avons observé une légère augmentation de l'adhésion en présence du peptide L 4-9.

#### 8.5- Effet des peptides L 1-9 et L 4-9 sur la migration des cellules A375

Les cellules sont ensemencées sur les membranes de polycarbonate des Transwell<sup>®</sup> recouvertes ou non par 2,63.10<sup>-10</sup> mole/Transwell<sup>®</sup> de lumicanne (soit 10  $\mu$ g de lumicanne/Transwell<sup>®</sup>), de BSA de L 1-9 ou de L 4-9. Après 24 heures de migration, les cellules sont colorées au violet cristal puis comptées. La figure 59 présente une diminution de la migration des cellules A375 en présence du peptide L 1-9 similaire à celle obtenue en présence de lumicanne. Par contre, le peptide L 4-9 n'induit pas de diminution de la migration. L'ensemble de ces résultats suggère que la séquence active du lumicanne se situerait au niveau des 3 premières régions riches en leucine du lumicanne.



Figure 58 : Effet des peptides issus du lumicanne sur l'adhésion des cellules A375. Les cellules (200000 cellules/puits dans une plaque 24 puits) sont incubées 2 heures à 37°C sur un tapis protéique constitué de  $1,58.10^{-9}$  moles de lumicanne ou de peptides. Les cellules n'ayant pas adhéré sont comptées et le pourcentage de cellules ayant adhéré par rapport au nombre de cellules déposées est déterminé. (\* p<0.05).



Figure 59 : Effet des peptides issus du lumicanne sur la migration des cellules A375. 50000 cellules sont ensemencées sur la face supérieure de la membrane de polycarbonate des Transwell<sup>®</sup> recouverte ou non par 2,63.10<sup>-10</sup> mole/Transwell<sup>®</sup> de lumicanne (soit 10  $\mu$ g/Transwell<sup>®</sup>), de L 1-9 ou de L 4-9. Après 24 heures de migration, les cellules sont colorées au violet cristal puis comptées. (\*\* p<0,01).

#### CHAPITRE III : MISE EN EVIDENCE D'UN RECEPTEUR DU LUMICANNE A LA SURFACE DES CELLULES DE MELANOME HUMAIN A375

Dans le précédent chapitre, nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur du lumicanne sur la migration et l'invasion ainsi que l'augmentation dose-dépendante de l'adhésion des cellules de mélanome A375 et B16F1 sur ce SLRP. Les interactions cellules-matrice extracellulaire sont impliquées dans la progression et la croissance des tumeurs (Hornebeck et coll. 2002). Le rôle des intégrines dans la mobilité, l'invasion, la croissance et la survie des cellules de mélanome humain est à présent bien connu (Parise et coll. 2000 ; Tsuji et coll. 2002 et Felding-Habermann et coll. 2002). Dans ce troisième chapitre, nous avons caractérisé le récepteur du lumicanne à la surface des cellules de mélanome humain A375. Pour cela, diverses expériences d'inhibition de l'adhésion ont été réalisées.

#### 1- Effet de l'EDTA et des cations divalents sur l'adhésion

Les intégrines sont des récepteurs pour les molécules de la matrice extracellulaire qui requièrent la présence de cations divalents pour fixer leur ligand. Afin de déterminer le rôle des cations divalents dans l'adhésion, les cellules A375 ont été incubées dans une solution de Dulbecco contenant 10 mM de glucose et des concentrations croissantes de calcium, de magnésium, de manganèse ou en présence d'EDTA en solution dans le milieu de culture à 10 mM. Dans ce dernier cas, les cellules sont préincubées avec le chélateur pendant 1 heure à 4°C sous agitation modérée. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 60 et 61.

La présence de cations divalents et particulièrement de magnésium est nécessaire à l'adhésion. En effet, en présence de magnésium, l'adhésion augmente de manière dosedépendante. Le manganèse induit une augmentation de l'adhésion plus importante que celle observée en présence de magnésium, le maximum est obtenu dès la concentration de 1 mM. Le calcium a moins d'effet sur l'adhésion des cellules au lumicanne que le magnésium ou le manganèse (figure 61). L'adhésion des cellules au lumicanne est inhibée lorsque les cellules sont préincubées avec l'EDTA (figure 60).

Ces résultats indiquent que l'adhésion des cellules de mélanome A375 au lumicanne nécessite des cations divalents et qu'elle est inhibée par la présence de chélateur. Les cations divalents et notamment le manganèse et le magnésium sont impliqués dans la fixation du ligand sur les intégrines. Grzesiak et collaborateurs, en 1992, ont montré que le manganèse augmente l'adhésion des polymorphonucléaires au collagène de type I, surtout lorsqu'il s'agit

d'une adhésion médiée par des intégrines. Au vu des résultats obtenus pour les cellules de mélanome A375 sur le lumicanne, nous avons orienté notre étude sur la recherche d'un récepteur du lumicanne de type intégrine à la surface de ces cellules.



Figure 60 : Effet de l'EDTA sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne. Les cellules sont préincubées 1 heure à 4°C dans du milieu de culture contenant 10 mM d'EDTA avant d'être cultivées 2 heures sur lumicanne à 37°C. Après coloration des cellules ayant adhéré au lumicanne par le violet cristal, l'absorbance est mesurée à 560 nm. (\*\* p<0,01).



Figure 61 : Effet des cations divalents sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne. Les cellules sont préincubées 90 minutes à 4°C dans une solution de Dulbecco contenant différentes concentrations de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou de  $Ca^{2+}$ . Puis les cellules sont incubées 2 heures à 37°C dans des puits recouverts ou non par 10 µg de lumicanne. Après coloration au violet cristal, l'absorbance est mesurée à 560 nm. (\*\* p<0,01).

#### 2- Profil d'expression des intégrines à la surface des cellules A375

Le profil d'expression de différentes intégrines à la surface des cellules de mélanome humain A375 a été déterminé en utilisant les anticorps anti-intégrines humaines spécifiques, et a été réalisé par cytométrie en flux. Les différents anticorps ont été utilisés au cours de la même expérimentation, or pour plus de lisibilité, les résultats obtenus ont été présentés sur deux graphiques distincts. Comme le montre la figure 62, les cellules A375 expriment l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ainsi qu'un large panel de sous-unités d'intégrines, à savoir :  $\beta_1$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_v$ . Nous avons remarqué que bien que deux anticorps différents aient été utilisés, les intégrines  $\alpha_v$  et  $\alpha_v\beta_3$  présentent la même intensité de fluorescence.



Intensité relative de fluorescence

Figure 62 : Expression des intégrines à la surface des cellules de mélanome A375. Les cellules sont incubées avec divers anticorps dirigés contre les sous-unités d'intégrines indiquées puis avec un anticorps secondaire anti-IgG<sub>1</sub> couplé à l' Alexa fluor<sup>®</sup>488. L'analyse a été réalisée en cytométrie en flux. Les clones des anticorps utilisés sont indiqués entre parenthèses.

#### 3- Mise en évidence de l' (des) intégrine(s) impliquée(s) dans l'adhésion des cellules A375 au lumicanne

Afin de déterminer l' (les) intégrine(s) exprimée(s) à la surface des cellules A375 et impliquée(s) dans l'interaction avec le lumicanne, une série d'inhibitions d'adhésion au lumicanne à été réalisée en utilisant des anticorps bloquants dirigés contre les intégrines.

#### 3.1- Recherche de la sous-unité d'intégrine β impliquée

Les résultats obtenus en figure 63 A mettent en évidence un effet inhibiteur de l'anticorps anti- $\beta_1$  sur l'adhésion des cellules au lumicanne. En effet, on observe une inhibition de l'adhésion de l'ordre de 90 % en présence de cet anticorps, alors qu'en présence de l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ , on observe une légère diminution de l'adhésion mais qui n'est pas significative dans nos conditions. Nous nous sommes, de ce fait, focalisés sur la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$ .

Afin de confirmer l'implication de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$ , d'autres essais d'inhibition de l'adhésion ont été réalisés. Dans un premier temps, les cellules ont été préincubées en présence de l'anticorps anti- $\beta_1$  puis ensemencées non seulement sur un tapis de lumicanne mais également sur un tapis de BSA ou sur un tapis de collagène de type I (figure 64 A). Nous avons obtenu une inhibition significative de l'adhésion que ce soit sur le lumicanne ou sur le collagène de type I. Dans une seconde expérience, les cellules ont été incubées en présence d'une concentration croissante d'anticorps anti- $\beta_1$  et ensemencées sur un tapis de lumicanne (figure 64 B). Les résultats montrent une inhibition concentrationdépendante de l'adhésion des cellules A375 au lumicanne.

#### 3.2- Recherche de la sous-unité d'intégrine α associée

Comme le montre la figure 63 B, une inhibition de l'adhésion de l'ordre de 50 % en présence des anticorps anti- $\alpha_2$  et anti- $\alpha_v$  a été observée. Les autres anticorps présentent une inhibition de l'adhésion moindre mais significative, c'est le cas des anticorps anti-sous-unités  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$  ou n'ont pas d'effet sur l'adhésion, c'est le cas de l'anticorps anti-sous-unité  $\alpha_6$ .

La rhodocétine est une protéine issue du venin de serpent qui a la propriété de se lier spécifiquement à l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ , et plus particulièrement au domaine A de la sous-unité  $\alpha_2$ . La rhodocétine inhibe, de ce fait, son interaction avec le collagène de type I (Eble et coll. 2001). Afin de confirmer l'implication de la sous-unité  $\alpha_2$ , nous avons étudié l'effet de la rhodocétine sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne. Les cellules ont été incubées en présence de rhodocétine diluée dans le milieu de culture à la concentration de 10  $\mu$ g/mL. Après 2 heures d'incubation soit sur du lumicanne soit sur du collagène de type I (contrôle positif) ou de la BSA (contrôle négatif), nous avons observé une inhibition de l'adhésion en présence de rhodocétine (figure 65) sur le collagène de type I mais également sur le lumicanne, confirmant ainsi l'implication de la sous-unité d'intégrine  $\alpha$ 2 dans l'adhésion des cellules au lumicanne.

Enfin, nous avons réalisé un test d'inhibition de l'adhésion en présence de l'anticorps anti- $\alpha_2\beta_1$ . La figure 66 montre une inhibition de l'adhésion des cellules A375 sur lumicanne ou sur collagène de type I respectivement de l'ordre de 55 % et de 35 %.

L'ensemble de ces résultats confirme l'implication de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  dans l'interaction des cellules de mélanome A375 au lumicanne.



**(B)** 



Figure 63 : Effet de différents anticorps bloquants anti-intégrines sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne. Les cellules sont préincubées 90 minutes à température ambiante avec les différents anticorps (10 µg/mL) puis incubées 2 heures à 37°C sur un tapis de lumicanne. (A) Effet comparatif des anticorps anti- $\beta_1$  et anti- $\alpha_v\beta_3$  ou (B) d'un panel d'anticorps dirigés contre diverses sous-unités d'intégrines  $\alpha$ . Les cellules non adhérentes sont ensuite comptées de manière à déterminer le nombre de cellules ayant adhéré. Le contrôle sans anticorps correspond à 100 % d'adhésion au lumicanne. (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).

**(A)** 







Figure 64 : (A) Effet comparatif de l'anticorps anti-sous-unité  $\beta_1$  sur l'adhésion des cellules A375 à la BSA, au lumicanne et au collagène de type I. (B) Effet concentrationdépendant de l'anticorps anti-sous-unité  $\beta_1$  sur l'adhésion cellulaire au lumicanne. (\* p<0.05, \*\* p<0.01).



**Figure 65 : Effet de la rhodocétine sur l'adhésion cellulaire à la BSA, au lumicanne et au collagène de type I**. Le contrôle sans rhodocétine correspond à 100 % des cellules adhérentes. (\*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001).



Figure 66 : Effet de l'anticorps anti- $\alpha_2\beta_1$  sur l'adhésion des cellules A375 à la BSA, au lumicanne et au collagène de type I. Le contrôle IgG<sub>1</sub> correspond à 100 % des cellules adhérentes. (\* p<0.05, \*\* p<0.01).

## 4- Effet du lumicanne sur la distribution des sous-unités d'intégrines $\beta_1$ et $\alpha_2$ à la surface des cellules A375

Une fois l'interaction entre le lumicanne et les cellules A375 via l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ établie, nous souhaitions savoir si le lumicanne était capable de moduler la distribution de ces deux sous-unités le long de la membrane plasmique. La figure 67 présente les résultats obtenus après 24 heures d'incubation sur les lamelles de verre non tapissées ou tapissées de collagène de type I, de fibronectine ou de lumicanne. Les cellules, déposées sur des lamelles de verre non tapissées ou tapissées de collagène de type I ou de fibronectine, présentent une distribution homogène de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  le long de la membrane plasmique (figure 67 A, B et C). En revanche, pour les cellules déposées sur des lamelles de verre tapissées de lumicanne, nous avons observé une distribution de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$ qui n'est plus homogène (figure 67 D). Concernant la distribution de la sous-unité d'intégrine  $\alpha_2$ , nous avons observé, après ensemencement des cellules A375 sur lamelles de verre non tapissées ou tapissées de fibronectine, une distribution homogène de cette sous-unité le long de la membrane plasmique (figure 67 E et G). Par contre, nous avons observé une distribution de la sous-unité d'intégrine  $\alpha_2$  plus ponctiforme en présence de lumicanne (figure 67 H) et très proche de celle observée en présence de collagène de type I (figure 67 F). Aucune différence n'a pu être observée en Western blot quant au niveau d'expression protéique de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  par les cellules A375, que ce soit sur le verre, le collagène de type I, la fibronectine ou le lumicanne (insert figure 67) suggérant ainsi que la distribution hétérogène de cette sous-unité d'intégrine ne résulte pas de la variation de son expression.

#### Anticorps anti :





Figure 67 : Effet du lumicanne sur la distribution membranaire des sous-unités d'intégrine  $\beta_1$  et  $\alpha_2$ . Les cellules sont déposées sur diverses molécules de la MEC et incubées 24 heures à 37°C. Elles sont ensuite fixées et marquées par les anticorps anti-intégrines puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG<sub>1</sub> couplé à l'Alexa Fluor<sup>®</sup>488. L'observation a été réalisée en microscopie laser confocale. Une distribution hétérogène de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  est observée pour les cellules A375 cultivées sur un tapis de lumicanne (D, flèches blanches). Insert : Analyse en Western blotting de l'expression de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  par les cellules A375 après 24 heures d'incubation sur différentes molécules de la MEC et sur le lumicanne.

#### 5- Effet du lumicanne sur les fibres de stress d'actine du cytosquelette

Les intégrines interagissent *via* leurs domaines cytoplasmiques avec les composants du cytosquelette (Giancotti et Ruoslahti 1999). Nous avons, de ce fait, étudié l'effet du lumicanne sur le cytosquelette et plus précisément sur le réseau d'actine. Les cellules A375 cultivées durant 24 heures sur lamelles de verre ou sur un tapis de collagène de type I ou de fibronectine (figure 68 A, B et C) présentent de nombreux filaments fins de fibres de stress d'actine formant un réseau bien développé. En revanche, les cellules mises en culture sur un tapis de lumicanne présentent une organisation du réseau d'actine du cytosquelette différente de celle observée sur les autres molécules de la MEC. En effet, le lumicanne induit la formation de larges bandes d'actine avec une distribution sous-membranaire et non pas la formation d'un réseau d'actine bien développé (figure 68 D).



Figure 68 : Effet du lumicanne sur le cytosquelette des cellules A375. Les cellules sont déposées des lamelles de verre tapissées ou non de collagène de type I, de fibronectine ou de lumicanne et incubées 24 heures à 37°C. Après une nuit à 4°C en présence des anticorps antiintégrine, les cellules sont ensuite marquées à la fois par les anticorps secondaires anti-IgG<sub>1</sub> couplés à l'Alexa Fluor<sup>®</sup>488, pour  $\beta_1$ , et par la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup>568, pour les filaments d'actine. L'observation a été réalisée en microscopie laser confocale. Les larges bandes d'actine induites par le lumicanne sont indiquées par les flèches blanches.

#### 6- Effet du lumicanne sur la formation des adhésions focales

Lors de l'adhésion à la matrice extracellulaire, certaines intégrines s'agrègent au niveau de structures périmembranaires appelées adhésions focales. Les adhésions focales sont des complexes multi-protéiques, regroupant les intégrines, la paxilline, la vinculine, la kinase d'adhésion focale (FAK), et d'autres molécules qui servent de lien entre le cytosquelette d'actine et les composants de la matrice extracellulaire (Geiger et coll. 2001). De plus, la paxilline et la vinculine sont connues comme interagissant avec le domaine cytoplasmique de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  (Katoh et coll. 1995). Le lumicanne interagissant avec les cellules A375 *via* la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  et entraînant une désorganisation du cytosquelette d'actine, nous avons étudié l'effet du lumicanne sur la formation des complexes d'adhésion focale.

Pour cela, les cellules ont été immunomarquées par des anticorps anti-paxilline ou anti-vinculine accompagnés d'un marquage des filaments d'actine à la phalloïdine. Après 24 heures d'incubation sur le verre, le collagène de type I ou la fibronectine, nous avons observé de nombreux points correspondants aux co-immunomarquages entre la paxiline et l'actine (figure 69 A, B et C) ou entre la vinculine et l'actine (figure 69 E, F et G), soit la formation de nombreux points d'adhésion focale. Par contre, en présence de lumicanne, que ce soit en fonction du co-immunomarquage de la paxilline avec l'actine (figure 69 D) ou de la vinculine avec l'actine (figure 69 H), nous avons observé une diminution de l'immunomarquage suggérant une diminution du nombre de points focaux.

La kinase d'adhésion focale, FAK, est une kinase cruciale dans l'activation de la cascade d'évènements intracellulaires initiés par les adhésions focales et joue un rôle important dans la migration cellulaire. L'activation de FAK par les intégrines entraîne une autophosphorylation de FAK au niveau de sa tyrosine 397 (Parsons et coll. 2000). L'effet du lumicanne sur la phosphorylation de la tyrosine 397 a donc été étudié. La localisation de la tyrosine 397 phosphorylée de FAK (pY397FAK) (figure 69 I, J K et L) reflète celle des complexes d'adhésion focale. Après visualisation par immunofluorescence, nous avons observé, en présence de lumicanne, une diminution significative de l'immunomarquage et donc de la phosphorylation de FAK à la périphérie membranaire suggérant une diminution de l'activation de la protéine FAK contrairement à ce que nous avons obtenu en présence des autres substrats (figure 69 L).

L'ensemble des ces résultats indiquent que la redistribution des intégrines induite par le lumicanne peut être due à une profonde réorganisation du cytosquelette et des points focaux par les cellules de mélanome A375, le tout concourant à une diminution du phénotype migratoire de ces cellules.



**Figure 69 : Effet du lumicanne sur la formation des complexes d'adhésion focale.** Les cellules A375 sont déposées sur divers substrats de la MEC et incubées 24 heures à 37°C. Elles sont ensuite fixées et immunomarquées par les anticorps anti-paxilline, anti-vinculine ou anti-pY397FAK puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG<sub>1</sub> couplé à l'Alexa Fluor<sup>®</sup>488. Les filaments d'actine sont marqués à la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor<sup>®</sup>568. L'observation a été réalisée en microscopie laser confocale. Les points focaux sont indiqués par des flèches (A-H) et par les spots blancs (I-L).

## Discussion

Le mélanome est le cancer cutané le plus grave en raison d'un potentiel métastatique élevé et d'un pronostic sévère. Il s'agit d'une tumeur maligne qui se développe aux dépens des mélanocytes. Au cours de la progression du mélanome, les cellules tumorales doivent franchir la jonction dermo-épidermique qui sépare l'épiderme du derme, et envahir le derme, son principal site de propagation. L'envahissement de la jonction dermo-épidermique et du tissus dermique par les cellules tumorales est un processus complexe qui implique plusieurs étapes. Les cellules doivent d'abord adhérer aux constituants matriciels de la membrane basale, les dégrader en sécrétant des enzymes protéolytiques, et enfin, migrer pour envahir le derme puis métastaser (Ntayi et coll. 2004 ; Stetler-Stevenson et coll. 1993).

Les petits protéoglycannes riches en leucine (SLRPs), dont la famille comprend entre autres, la décorine, le biglycanne et le lumicanne, représentent des constituants importants de la matrice extracellulaire dermique (Iozzo 1998 ; Vuillermoz et coll. 2005). Au cours de précédents travaux, nous avons démontré que le lumicanne est impliqué dans le contrôle de la croissance et de l'invasion des cellules de mélanome de souris B16F1 et que ce SLRP peut être considéré, de manière identique à la décorine, comme un composant de la matrice extracellulaire doté de propriétés anti-tumorales (Vuillermoz et coll. 2004).

L'objectif de ce travail était d'étudier le(s) mécanisme(s) d'action anti-tumoral du lumicanne sur les cellules de mélanome.

Dans une première partie, nous avons mis au point une méthode de production de lumicanne humain recombinant.

Dans une seconde partie, nous avons étudié les effets biologiques induits par le lumicanne sur les cellules de mélanome et avons débuté des travaux concernant la détermination de la séquence peptidique active du lumicanne.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du (des) récepteur(s) du lumicanne présent(s) à la surface des cellules de mélanome.

Dans de nombreux types de cancer, le lumicanne peut-être exprimé soit par les cellules cancéreuses elles-mêmes soit au niveau du stroma péritumoral, soit par les deux. En fonction de la localisation de son expression ou en fonction du type de cancer, le lumicanne peut-être impliqué dans des phénomènes opposés.

En effet, dans le cas du cancer pancréatique, les patients, dont les cellules cancéreuses expriment du lumicanne, tendent à avoir une espérance de vie plus longue que les patients dont les cellules cancéreuses n'en expriment pas. Inversement, les patients pour lesquels le lumicanne est exprimé au niveau du stroma péritumoral, ont une durée de vie plus courte que les patients pour lesquels le lumicanne n'est pas exprimé au niveau du stroma (Ishiwata et coll. 2007).

Dans le cas du carcinome mammaire, il a été montré que l'expression de lumicanne au niveau du stroma péritumoral est associée à un grade tumoral avancé (Leygue et coll. 1998 et 2000) et qu'une diminution de l'expression de lumicanne est associée à une rapide progression ainsi qu'à un faible taux de survie du patient (Troup et coll. 2003).

En ce qui concerne le mélanome, des études ont montré que le lumicanne pouvait être exprimé au niveau du stroma péritumoral ainsi que par certains types de cellules de mélanome (Brézillon et coll. 2007 ; Sifaki et coll. 2006). Lors d'une étude antérieure, des cellules de mélanome de souris B16F1 ont été transfectées de manière à exprimer du lumicanne. Nous avons observé pour ces cellules, *in vitro*, une inhibition de la croissance tumorale et *in vivo*, une inhibition du potentiel métastatique (Vuillermoz et coll. 2004) or le mécanisme d'action anti-tumorale du lumicanne restait à élucider.

Afin de produire le lumicanne recombinant nécessaire à notre étude, nous avons sous cloné l'ADNc du lumicanne humain dans le plasmide pQE30. Les 16 premiers acides aminés du peptide signal supposé ont été substitués, lors de l'insertion de l'ADNc du lumicanne humain entre les sites KpnI et SmaI du plasmide pQE30, par 18 acides aminés appartenant à ce dernier et comprenant une séquence codant 6 résidus histidine. Le plasmide d'expression résultant a été désigné sous le nom de pQE30-HLUM.

Les bactéries JM109(DE3) ont été transformées par le plasmide d'expression pQE30-HLUM. Les bactéries transformées ont été cultivées en présence d'IPTG. Bien que l'expression du lumicanne recombinant soit détectée à la fois dans les cultures bactériennes induites et non induites par l'IPTG, nous avons remarqué qu'en présence d'IPTG la quantité de lumicanne produite était doublée.

La protéine recombinante flanquée des 6xHis à son extrémité N-terminale a été purifiée, après solubilisation des corps d'inclusion par de l'urée 8 M, par chromatographie

d'affinité sur une colonne de Ni-NTA. Les 6xHis permettent, par chélation des ions Ni<sup>2+</sup>, la rétention de la protéine recombinante dans la colonne. L'analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS de la fraction éluée a révélé une bande unique de 38 kDa correspondant à la taille théorique de la protéine cœur du lumicanne. L'authenticité de la protéine purifiée a été confirmée par Western blotting utilisant un anticorps polyclonal anti-lumicanne, ceci pour une culture bactérienne de départ de 100 mL et de 1 L. Lorsque nous sommes passés à une culture de 2 L, l'analyse de la fraction éluée a mis en évidence une bande de 38 kDa de faible intensité suggérant soit que la totalité du lumicanne recombinant ne s'était pas entièrement fixée à la résine de Ni-NTA soit que les volumes des divers solutions et tampons utilisés n'était pas adaptés à l'extraction de la totalité du lumicanne recombinant produit. Sachant que la résine Ni-NTA peut fixer de 5 à 10 mg de protéine/mL, une optimisation des volumes des solutions et tampons à utiliser reste à déterminer pour permettre de traiter de plus grands volumes de culture bactérienne et donc de produire de plus importantes quantités de lumicanne recombinant. Pour 100 mL de culture bactérienne, nous avons pu obtenir entre 0,8 et 1,5 mg de protéine recombinante dont la masse moléculaire (38,8 kDa) et le point isoélectrique (6,43) sont similaires à ceux de la protéine cœur humaine native (38,4 kDa et pHi 6,16).

Une étude réalisée par Li et collaborateurs (2004) a montré que la MT1-MMP est capable de cliver du lumicanne extrait de cornée de bœuf (forme protéoglycannique) et du lumicanne produit dans un système procaryote (forme protéique). Nous avons réussi à reproduire cette digestion avec notre lumicanne recombinant, lui-même produit dans un système procaryote.

Une fois, le lumicanne recombinant produit en quantité suffisante, nous avons débuté l'étude du mécanisme d'action anti-tumoral induit par ce dernier.

Dans un premier temps, afin de déterminer le modèle de mélanome adéquat, plusieurs cellules ont été testées. Notre critère de sélection s'est basé sur l'expression ou non de lumicanne. Nous avons montré par Western blotting que les cellules de mélanome humain M3Da expriment du lumicanne. Nous avons également montré, par RT-PCR, l'expression d'ARNm du lumicanne par les cellules de mélanome HT144 (Brézillon et coll. 2007). Au contraire, certaines cellules de mélanome n'en expriment pas, c'est le cas des cellules de mélanome humain A375 et de souris B16F1 (Vuillermoz et coll. 2004). Pour étudier les effets du lumicanne sur l'invasion tumorale, nous avons utilisé comme modèle d'étude les cellules de mélanome de souris B16F1 et les cellules de mélanome humain A375 et HT144.

Avant d'entreprendre toutes études, nous voulions savoir si le lumicanne recombinant produit pouvait être toxique. Un test au MTT pratiqué n'a révélé aucune toxicité vis-à-vis des cellules A375 et a donc permis la suite de l'étude.

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par leur prolifération rapide. Dans notre étude, nous avons observé que le lumicanne ne modifie pas la prolifération des cellules A375. Nous avons obtenu des résultats similaires avec des cellules B16F1 exprimant du lumicanne après transfection (Vuillermoz et coll. 2004). Cependant, pour d'autres types cellulaires, le lumicanne peut jouer un rôle anti-prolifératif. En effet, il a été montré que le lumicanne est capable d'inhiber la prolifération de cellules comme les cellules HEK 293 (cellules embryonnaires de rein humain) ou les kératocytes de souris (Ishiwata et coll. 2004; Vij et coll. 2004).

Certaines études ont révélé l'effet pro-apoptotique du lumicanne sur les cellules de mélanome de souris B16F1 (Vuillermoz et coll. 2004) ainsi qu'au niveau de la cornée de souris sur des fibroblastes embryonnaires et des kératocytes (Vij et coll. 2004). Cependant, lors de notre étude de l'apoptose, nous avons observé que l'intégrité du noyau cellulaire n'était pas perturbée lorsque les cellules A375 étaient cultivées sur des tapis protéiques réalisés à l'aide de molécules issues de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, le collagène de type I ou même le lumicanne, contrairement à ce qui a été obtenu en présence de doxorubicine, un agent classique inducteur d'apoptose (Zwelling et coll. 1991) avec laquelle, après 2 heures d'incubation, on distingue une condensation périnucléaire de la chromatine.

De nombreuses études ont montré l'importance de l'interaction cellules-matrice extracellulaire dans l'invasion tumorale. Les chambres de Boyden modifiées type Transwell<sup>®</sup> fournissent un modèle d'évaluation rapide de la migration et de l'invasion cellulaire *in vitro*. Les membranes des Transwell<sup>®</sup> ont été tapissées soit par du lumicanne seul soit par un mélange de lumicanne et d'une membrane basale artificielle de Matrigel<sup>®</sup>. Nos résultats acquis avec ce modèle mettent en évidence une diminution significative de la migration et de l'invasion des cellules de mélanome B16F1 et A375 lorsque les membranes sont recouvertes de lumicanne. Bien que la souche B16F1 soit réputée peu invasive, nos études en Matrigel<sup>®</sup> montrent que ces cellules sont tout à fait capables de traverser une membrane basale reconstituée *in vitro*. Cette inhibition des capacités migratoires et invasives des cellules tumorales pourrait expliquer, au moins partiellement, l'effet anti-tumoral de la surexpression de lumicanne que nous avons précédemment observé *in vivo* (Vuillermoz et coll. 2004).

La migration des cellules tumorales nécessite la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. Cette dégradation fait intervenir de nombreuses protéinases sécrétées, soit par la cellule tumorale elle-même, soit par les cellules environnantes. Dans nos études in vitro, nous avons constaté que le lumicanne ne modifie pas la sécrétion de la pro-MMP-2 ni n'a d'influence sur son activation. Une autre MMP, la MMP-9, susceptible d'être impliquée dans l'invasion tumorale, n'est pas exprimée, dans nos conditions de culture, par les cellules A375. Nous avons poursuivi nos travaux par l'étude de l'expression de la MT1-MMP. La MT1-MMP a été identifiée comme activateur de la pro-MMP-2 (Sato et coll. 1994). De plus, la MT1-MMP exprimée à la surface des cellules cancéreuses est capable de dégrader la décorine et le lumicanne, permettant ainsi le rétablissement de la tumorogénicité (Li et coll. 2004). Elle est également capable de dégrader d'autres constituants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes de types I, II et III, la fibronectine, la laminine et d'autres protéoglycannes (Sato et coll. 2005). Cette fonction de dégradation matricielle en fait une enzyme clé dans le processus d'invasion tumorale (Sato et coll. 2005 ; Hotary et coll. 2003). Nous avons mis en évidence que la MT1-MMP est exprimée sous sa forme inactive par les cellules A375 et que l'interaction avec le lumicanne n'a aucune influence sur son activation. Au total, l'inhibition de migration in vitro des cellules A375 observée sous l'effet du lumicanne ne paraît donc pas dépendre d'un effet inhibiteur sur l'expression ou l'activation des MMP 2 et 9 ni de la MT1-MMP.

L'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire représente une étape importante du processus migratoire. De ce fait, l'ensemble de nos études *in vitro* nous a permis d'émettre l'hypothèse que l'inhibition de la migration des cellules A375 et B16F1 pourrait passer par une augmentation de l'adhésion cellulaire induite par le lumicanne. Cette hypothèse a été confirmée pour un certain nombre de cellules de mélanome, non seulement pour les cellules A375 et B16F1, mais également pour les cellules HT144, pour lesquelles l'adhésion sur plastique est inférieure à celle observée en présence de lumicanne. De plus, après avoir déposé les cellules sur une quantité croissante de lumicanne, nous avons observé une augmentation dose-dépendante de l'adhésion des cellules A375 et B16F1.

Certaines régions riches en leucine, LRR, des SLRPs possèdent des activités biologiques. C'est notamment le cas des LRR5 et 6 de la décorine et de la LRR11 de la fibromoduline qui sont impliquées dans la fixation du collagène de type I (Kalamajski et coll. 2007 ; Kalamajski et Oldberg 2007). De plus, la LRR5 de la décorine possède une activité anti-angiogénique (Sulochana et coll. 2005). Afin de déterminer la ou les LRR du lumicanne impliquées dans l'inhibition du pouvoir migratoire des cellules de mélanome, deux peptides

issus du lumicanne ont été produits, les peptides L 1-9 et L 4-9. Ces peptides ont été nommés ainsi car ils contiennent soit les régions riches en leucine allant de la première à la neuvième soit de la quatrième à la neuvième sur les onze que contient le lumicanne. D'autres constructions plasmidiques ont été réalisées et la production des peptides correspondants est encore en cours de mise au point (Zeltz C., doctorat en cours). Le peptide L 1-9 reproduit les effets du lumicanne. Il est capable d'augmenter l'adhésion et de diminuer significativement la migration des cellules A375. En ce qui concerne le peptide L 4-9, il est capable d'augmenter l'adhésion et ce, de manière légèrement plus importante que le lumicanne entier. Par contre, il n'entraîne aucune inhibition de la migration, contrairement à ce que nous avons obtenu en présence de lumicanne. L'ensemble de ces résultats suggère que le domaine actif du lumicanne se situerait au niveau de la partie N-terminale du lumicanne et plus précisément au niveau des trois premières régions riches en leucine.

Au vu des résultats obtenus en migration et en adhésion, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre les cellules de mélanome et le lumicanne. Funderburgh et collaborateurs (1997) ont montré l'existence d'un récepteur du lumicanne à la surface des macrophages, sans pour autant en déterminer la nature, mais qui serait incapable de reconnaître le lumicanne sous forme protéoglycannique. Dans la dernière partie de nos travaux, nous nous sommes, de ce fait, attachés à caractériser le récepteur du lumicanne à la surface des cellules de mélanome A375 grâce au lumicanne recombinant produit initialement. Il est à noter cependant que celuici est totalement dépourvu de chaînes glycanniques car produit dans un système procaryote.

L'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire représente une étape importante des processus migratoires et invasifs. Les intégrines, une famille de protéines transmembranaires hétérodimériques, apparaissent comme étant les récepteurs majeurs par lesquels les cellules adhèrent à la MEC et sont donc, de ce fait, impliquées dans la migration cellulaire. Les intégrines jouent également un rôle dans les interactions entre la MEC et le cytosquelette (Hynes 1992). Au regard de ces données, nous avons examiné le mécanisme par lequel le lumicanne recombinant est capable d'augmenter l'adhésion et d'inhiber la migration des cellules de mélanome humain A375. Nous avons montré l'implication des sous-unités d'intégrines  $\beta_1$  et  $\alpha_2$  dans l'adhésion de ces cellules au lumicanne, sans exclure la sous-unité d'intégrine  $\alpha_v$ .

L'inhibition de l'adhésion par l'EDTA, un agent chélateur, indique que l'adhésion des cellules A375 au lumicanne nécessite la présence de cations divalents. Dans notre étude, le magnésium et le manganèse sont requis alors que le calcium n'a pas d'effet. Les cations divalents et notamment le magnésium sont impliqués dans la fixation du ligand sur les

intégrines (Grzesiak et coll. 1992). Le manganèse augmente l'adhésion des cellules A375 au lumicanne. Le manganèse est un puissant activateur des intégrines et le magnésium confère une adhésion cellulaire similaire (Knorr et Dustin 1997; Shimaoka et coll. 2002). En comparaison, le calcium, à forte concentration, est connu comme ayant un effet inhibiteur sur de nombreuses intégrines contenant un domaine I (Shimaoka et coll. 2002). Altieri et collaborateurs (1991) ont montré que le manganèse augmente l'adhésion des polymorphonucléaires au collagène de type I, surtout lorsqu'il s'agit d'une adhésion médiée par des intégrines. Au vu des résultats similaires obtenus pour les cellules de mélanome A375 sur le lumicanne nous avons orienté notre étude sur la recherche d'un récepteur du lumicanne de type intégrine à la surface de ces cellules.

Nous avons étudié l'effet d'un panel d'anticorps monoclonaux bloquants antiintégrines humaines sur l'adhésion des cellules A375 au lumicanne.

Dans un premier temps, nous avons observé une légère inhibition de l'adhésion, bien que non significative, en présence de l'anticorps anti-intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , ne permettant pas d'exclure totalement cette intégrine. En revanche, nous avons identifié la sous-unité d'intégrine fixant le lumicanne à la surface des cellules A375 comme étant la sous-unité  $\beta_1$ . En effet, l'adhésion des cellules au lumicanne est fortement inhibée (de 60 à 90 %) en présence de l'anticorps anti-sous-unité  $\beta_1$ . L'effet bloquant de cet anticorps anti- $\beta_1$  sur l'adhésion cellulaire indique clairement que le domaine extracellulaire de la sous-unité  $\beta_1$  est impliqué dans l'interaction avec le lumicanne.

Nous avons ensuite déterminé les sous-unités d'intégrines  $\alpha$  pouvant se lier à  $\beta_1$  et capable de se fixer au lumicanne. Comme précédemment, l'utilisation d'anticorps anti-sousunité d'intégrines  $\alpha$  nous a permis de mettre en évidence une inhibition significative de l'adhésion au lumicanne par les anticorps anti-sous-unités  $\alpha_2$  et  $\alpha_v$  de l'ordre de 50 %. Les autres anticorps (anti- $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$ ) inhibent également significativement cette adhésion, mais de manière moins importante. En revanche, les anticorps anti-sous-unités  $\alpha_1$  et  $\alpha_6$  n'ont aucun effet. Le rôle de la sous-unité d'intégrine  $\alpha_2$  dans l'adhésion au lumicanne a été démontré grâce à l'anticorps correspondant et à la rhodocétine, un inhibiteur spécifique de cette sous-unité (Eble et Tucwell 2003).

Nos résultats ont clairement démontré que le lumicanne augmente l'adhésion des cellules de mélanome humain *via* une (des) intégrines contenant la sous-unité  $\beta_1$ . Nous avons mis en évidence l'implication de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  grâce à l'anticorps correspondant.

L'augmentation de l'adhésion au lumicanne *via* l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  pourrait expliquer, au moins pour une part, l'effet anti-invasif de ce SLRP.

Les sous-unités d'intégrine  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_E$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$  et  $\alpha_D$  contiennent un domaine I, or seules les sous-unités  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_{11}$  peuvent être liées à la sous-unité  $\beta_1$ . Les domaines I représentent les sites de liaison majeurs des ligands pour plusieurs intégrines (Shimaoka et coll. 2002 ; Diamond et coll. 1993 ; Mischishita et coll. 1993). Le domaine I-like contenu par certaines sous-unités  $\beta$  est capable de lier directement le ligand lorsque les intégrines ne contiennent pas de domaine I et régule de manière indirecte la fixation des ligands par les intégrines qui contiennent un domaine I.

Toutes les intégrines contenant la sous-unité  $\beta_1$  se lient aux molécules de la MEC :  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$  et  $\alpha_7\beta_1$  lient la laminine,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_1$  lient la fibronectine,  $\alpha_9\beta_1$  la ténascine C et  $\alpha_v\beta_1$  la vitronectine. Quatre intégrines,  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_{10}\beta_1$ ,  $\alpha_{11}\beta_1$  lient les collagènes (Kramer et Marks 1989 ; Camper et coll. 1998 ; Velling et coll. 1999 ; Kim et coll ; 2005). La fixation des collagènes par ces quatre intégrines s'effectue *via* le domaine I de la sous-unité  $\alpha$ . Quelques intégrines contenant la sous-unité  $\beta_1$  peuvent également interagir avec des récepteurs cellulaires :  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_9\beta_1$  se lient au VCAM-1 et  $\alpha_4\beta_1$  à MadCAM-1 (Brakebusch et Fassler 2005).

Le domaine I des sous-unités d'intégrine  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$  et  $\alpha_{11}$  contient un site d'adhésion dépendant des ions métalliques (MIDAS) essentiel à la fixation du collagène (Kim et coll. 2005). Comme la décorine, le lumicanne interagit avec le collagène, modulant ainsi l'assemblage des fibrilles. L'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  est connue comme étant le récepteur à la fois du collagène de type I et de la décorine à la surface cellulaire (Santoro 1986 ; Guidetti et coll. 2002). Dans les conditions physiologiques, la surface cellulaire est mise en contact avec le collagène de type I et la décorine qui sont retrouvés aussi bien sous forme de complexes macromoléculaires que sous forme de molécules individualisées. Dans ces conditions, l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  contribuerait à l'adhésion cellulaire en reconnaissant simultanément les deux composants du complexe collagène-décorine (Guidetti et coll. 2002). Nous avons, de ce fait, émis la même hypothèse concernant le lien existant entre le lumicanne et le collagène au niveau de la peau ou de la cornée où le lumicanne interagit avec les fibrilles de collagène, à savoir que l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  pourrait reconnaître les deux composants du complexe collagènelumicanne.

Les interactions matrice extracellulaire-intégrine se répercutent au niveau du cytosquelette *via* les complexes d'adhésion focale.

En présence des composés de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I ou la fibronectine, la distribution de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  s'est révélée homogène le long de la membrane plasmique. Or, nous avons observé une distribution hétérogène de cette dernière induite par le lumicanne. Nous avons donc émis l'hypothèse que le mécanisme antitumoral du lumicanne pouvait résulter d'un phénotype migratoire cellulaire perturbé. En effet, nous avons observé une désorganisation du réseau d'actine après 24 heures de contact entre les cellules et le lumicanne, se traduisant par l'apparition de larges bandes d'actine à localisation sous-membranaire, au détriment d'un réseau fin et bien développé observé en présence d'un tapis de collagène de type I ou de fibronectine.

Le lumicanne est également capable d'induire une diminution de l'immunomarquage de la paxilline et de la vinculine au niveau des contacts focaux. Or, l'expression de la vinculine ainsi que celle de la paxilline ne sont pas modifiées après 24 heures de contact entre les cellules A375 et le lumicanne recombinant (Brézillon et coll. en cours de soumission) suggérant de ce fait soit une déstabilisation des points focaux soit un recrutement moindre de ces deux protéines au niveau des points focaux et pourrait mener à une inhibition de la mobilité cellulaire. La kinase d'adhésion focale, FAK, est co-localisée avec les intégrines au niveau des contacts focaux et est un important régulateur de l'attachement et de l'étalement cellulaires (Parsons et coll. 2000; Juliano et Haskill 1993). Il a été montré que la phosphorylation de FAK au niveau des tyrosines 397 et 576 est corrélée, dans le cas du mélanome, à un phénotype agressif (Hess et coll. 2005 ; Hess et Hendrix 2006). L'adhésion aux composés de la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des intégrines induit une autophosphorylation de FAK au niveau de la tyrosine 397. Les interactions entre intégrines et MEC induisent un regroupement des intégrines. Ce regroupement mène à un recrutement rapide de FAK au niveau des complexes d'adhésion focale et à la phosphorylation de la tyrosine 397 (Frisch et coll. 1996 ; Schlaepfer et coll. 1998 ; Fu et coll. 2004 ; Hanks et coll. 1992; Lyman et coll. 1997; Burgaya et coll. 1997). Après 24 heures d'incubation en présence de lumicanne recombinant, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de la protéine FAK au niveau de sa tyrosine 397 et donc de son activation suggérant de ce fait une perte du phénotype agressif des cellules de mélanome A375 comparé à ce que nous avons observé en présence de collagène de type I ou de fibronectine.

Bien qu'après 2 heures de contact entre les cellules A375 et le lumicanne recombinant nous ayons observé une augmentation de l'adhésion qui pourrait s'expliquer par une affinité élevée entre les intégrines contenant la sous-unité  $\beta_1$ , telles que  $\alpha_2\beta_1$  ou  $\alpha_v\beta_1$ , et le lumicanne recombinant, nous avons observé, après 24 heures d'incubation, une redistribution en amas des intégrines  $\beta_1$  au niveau de la membrane plasmique induite par le lumicanne qui pourrait être causée par le remodelage des filaments d'actine, qui mènerait à une diminution de la force des complexes d'adhésion focale et de ce fait à une inhibition de la migration et de l'invasion cellulaire (Yamaguchi et Condeelis 2007 ; Dang et coll. 2006 ; Wiesner et coll. 2006 ; Hegerfeldt et coll. 2002 ; Tufvesson et Westergren-Thorsson 2003).

L'ensemble de ces résultats suggère que le lumicanne recombinant serait capable d'immobiliser les cellules de mélanome humain A375 qui de ce fait acquerraient un phénotype statique typique des cellules adhérentes, alors qu'un phénotype dynamique et migratoire (Hegerfeldt et coll. 2002) avec de nombreux complexes d'adhésion focale au niveau des protrusions est observé sur un tapis de collagène de type I ou de fibronectine.

Les divers phénomènes que nous avons mis en évidence : l'inhibition de la migration et de l'invasion, l'augmentation de l'adhésion, le remodelage du cytosquelette ainsi que l'acquisition du phénotype statique en présence de lumicanne contribuent à l'inhibition de la progression tumorale.

De nombreuses études suggèrent que les protéines SLRPs peuvent jouer un rôle dans l'inhibition de la croissance tumorale et le développement des métastases, c'est le cas notamment de la décorine, (Reed et coll. 2005 ; Tralhao et coll. 2003; Santra et coll. 2000) ou du biglycanne (Weber et coll. 2001). Nos travaux ont ajouté à cette liste un autre SLRP, le lumicanne, et permettent d'envisager des perspectives thérapeutiques supplémentaires dans la lutte contre les tumeurs en général et contre le mélanome en particulier.

## Conclusions

&

## Perspectives

La matrice extracellulaire, longtemps considérée comme un simple support architectural, apparaît aujourd'hui comme un élément majeur de la régulation de l'activité cellulaire. Au cours du processus d'invasion tumorale, les cellules adhèrent à la matrice extracellulaire, prolifèrent, migrent à travers le tissu environnant, traversent les membranes basales des vaisseaux sanguins et forment des métastases. Le lumicanne est une protéine appartenant à la famille des SLRPs présents dans la matrice extracellulaire dermique dotée de propriétés anti-tumorales (Vuillermoz et coll. 2004 ; Brézillon et coll. 2007).

Afin d'étudier l'interaction des cellules de mélanome avec le lumicanne, dans la première partie de notre étude, nous avons mis au point une méthode de production et de purification de la protéine cœur du lumicanne, avec un rendement de production compris entre 0,8 et 1,5 mg de lumicanne produit pour 100 mL de culture bactérienne.

Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes anti-tumoraux induits par le lumicanne recombinant. Nous avons utilisé comme modèles d'étude, des cellules de mélanome de souris B16F1 et des cellules de mélanome humain A375 et HT144. Nos résultats ont montré que le lumicanne diminue, in vitro, le pouvoir migratoire et invasif des cellules A375 et B16F1 et que cette diminution, pour les cellules A375, n'est ni due à une inhibition de la prolifération, ni à l'induction de l'apoptose, ni à une inhibition de l'activation des MMPs mais est imputable à une augmentation de l'adhésion cellulaire au lumicanne. Cette augmentation de l'adhésion est un phénomène que nous avons retrouvé, en plus des cellules A375, pour les cellules B16F1 et HT144. Nous projetons de ce fait, d'étudier les forces de détachements existant entre l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  et le lumicanne recombinant. Une étude similaire a été réalisée par l'équipe du Dr. FRANZ Clemens (Dresde, Allemagne) entre l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  exprimées par les cellules CHO et le collagène de type I grâce à une technique utilisant un microscope à force atomique (Taubenberger et coll. 2007). Les métalloprotéinases et le système plasminogène/plasmine sont tous les deux impliqués dans la migration des cellules cancéreuses. Il serait intéressant d'étudier l'effet du lumicanne sur ce second système. En effet, si lors de l'analyse par zymographie en gel de gélatine-plasminogène, nous montrons une inhibition de la sécrétion des activateurs du plasminogène en plasmine, u-PA et t-PA (activateurs du plasminogène de type urinaire ou tissulaire), nous pourrons affirmer que l'inhibition de la migration et de l'invasion des cellules A375, en plus d'être due à une augmentation de l'adhésion, passerait par ce système. Si tel est le cas, nous pourrons compléter cette étude en réalisant, par Westen blotting, la mise en évidence de l'expression de PAI-1, un inhibiteur puissant et spécifique de l'u-PA et du t-PA. Nos objectifs futurs sont également de poursuivre la caractérisation de la

séquence peptidique minimale active du lumicanne. En effet, des essais de production de peptides du lumicanne dépourvus des premières régions riches en leucine sont actuellement en cours d'élaboration. Ces peptides, une fois produits, seront testés sur l'adhésion et la migration des cellules A375 et d'autres cellules de mélanome afin de généraliser le phénomène. Des essais de production et de purification de lumicanne natif, à partir de cellules eucaryotes, et donc sous forme glycosylée ou sous forme protéoglycannique, sont envisagés. Celui-ci devrait nous permettre de déterminer si la conformation native et si la présence des chaînes glycanniques sur la protéine cœur sont capables de reproduire, et ce, de manière plus importante, les effets observés jusqu'à présent. Nous souhaitons également étudier les effets potentiels du lumicanne sur l'angiogenèse en utilisant des modèles *in vitro* en gel de Matrigel<sup>®</sup> ainsi qu'*in vivo* en utilisant le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de l'œuf de poulet.

Au cours de la dernière partie de notre étude, nous avons identifié l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ comme récepteur potentiel du lumicanne à la surface des cellules de mélanome humain A375. Or, d'autres combinaisons avec la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  ne sont pas à exclure, c'est le cas notamment avec la sous-unité d'intégrine  $\alpha_v$ . Une étude complémentaire concernant la confirmation de l'implication de l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  dans la fixation du lumicanne reste à effectuer. Pour cela, nous envisageons d'étudier cette interaction par résonance plasmonique de surface sur appareil Biacore<sup>®</sup>, de manière à en déterminer la constante d'affinité. L'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  n'étant, actuellement, pas encore commercialisée, nous souhaitons établir une collaboration avec un laboratoire susceptible de produire l'intégrine recombinante ou de nous fournir le plasmide contenant son ADNc. Si la conformation du lumicanne dans cette interaction est importante, la production du lumicanne natif sera d'autant plus intéressante. L'autre possibilité envisagée serait de réaliser une chromatographie d'affinité en couplant du lumicanne à une résine CNBr-Sépharose 4B et en déposant sur la colonne un extrait membranaire de cellules A375. Une immunorévélation à l'aide d'un anticorps anti- $\alpha_2\beta_1$ pourrait être réalisée sur les éluats obtenus. Enfin, nous avons montré que la fixation du lumicanne à l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  entraîne une redistribution de la sous-unités d'intégrine  $\beta_1$ témoignant des prémices d'un signal outside-in. Cette redistribution est suivie par une diminution de la phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK ainsi que par une déstabilisation des points focaux et par la formation de larges bandes de fibres de stress d'actine, le tout menant à une diminution du phénotype migratoire des cellules de mélanome A375. Il sera important de préciser l'existence, au niveau des complexes d'adhérences focales, d'autres protéines de jonction telle la taline ou d'autres tyrosines kinases comme Src. De plus, les GTPases de la famille Rho interviennent dans le remodelage de l'actine et donc dans la migration cellulaire. Il serait donc intéressant d'étudier l'ensemble de ces protéines de la signalisation intracellulaire.

L'ensemble de nos résultats suggère un nouveau mécanisme anti-tumoral capable de contribuer à la perte du phénotype migratoire : l'immobilisation des cellules de mélanome par le lumicanne recombinant. Nous avons utilisé le mélanome comme modèle d'étude car son incidence a très fortement augmenté ces dernières années. Dans le cas du mélanome au stade précoce, l'exérèse chirurgicale donne d'excellents résultats alors que dans le cas de formes métastasées, les traitements actuels restent, dans l'ensemble, très décevants. Le but ultime de notre projet est l'utilisation de la séquence active du lumicanne comme agent anti-cancéreux appliqué aussi bien au mélanome qu'étendu à d'autres types de cancer.

# Références

# Bibliographiques
ACHTEN G, LEDOUX-CORBUSIER M. Naevus mélanocytaires et mélanomes malins. <u>In</u> : Précis de dermatologie et vénérélogie. Dir. Saurat J-H, Grosshans E, Laugier P, Lachapelle J-M. Paris : Masson ; 1986 : 441-453.

ALBIG AR, ROY TG, BECENTI DJ, SCHIEMANN WP.

Transcriptome analysis of endothéliale cell gene expression induced by growth on matrigel matrices : identification and characterization of MAGP-2 and lumican as novel regulators of angiogenesis.

Angiogenesis 2007; 10(3): 197-216.

ALTIERI DC. Occupancy of CD11b/CD18 (Mac-1) divalent ion binding site(s) induces leukocyte adhesion. J Immunol 1991; 147(6): 1891-1898.

AUTIER P, DORE JF, LEJEUNE F, KOELMEL KF, GEFFELER O, HILLE P *et al.* Cutaneous maligant melanoma and exposure to sunlamps or sunbed : an EORT multicenter case-control study in Belgium, France and Germany. EORTC Melanoma cooperative Group. Int J Cancer 1994; 58(6): 809-813.

BALE SJ, DRACOPOLI NC, TUCKER MA, CLARK WH, FRASER MC, STANGER BZ et al.

Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p.

N Engl Med 1989; 320(21): 1367-1372.

BAME KJ, LIDHOLT K, LINDAHL U, ESKO JD. Biosynthesis of heparan sulfate. J Biol Chem 1991; 266(16): 10287-10293.

BERTHEIM U, HELLSTROM S.

The distribution of hyaluronan in human skin and mature hypertrophic and keloid scars. Br J Plast Surg 1994; 47(7): 483-489.

BLOCHBERGER TC, VERGNES JP, HEMPEL J, HASSELL JR. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. J Biol Chem 1992; 267: 347-352.

BORDIER C. Phase separation of integral membrane proteins in triton X-114 solution. J Biol Chem 1981, 256(4): 1604-1607.

BOSMAN FT, STAMENKOVIC I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol 2003; 200: 423-428.

BOYLE P, MAISONNEUVE P, DORE JF. Epidemiology of malignant melanoma. Br Med Bull 1995; 51(3): 523-547. BRADFORD MM.

A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976, 72 (1-2): 248-254.

BRAKEBUSCH C, FÄSSLER R. Beta 1 integrin function in vivo: adhesion, migration and more. Cancer Metastasis Rev 2005; 24(3): 403-411.

# BRESLOW A.

Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in prognosis of cutaneous melanoma. Ann Surg 1970; 172(5): 902-908.

BREZILLON S, VENTEO L, RAMONT L, D'ONOFRIO MF, PERREAU C, PLUOT M et al.

Expression of lumican, a small leucine-rich proteoglycan with antitumour activity, in human malignant melanoma.

Clin Exp Dermatol 2007; 32(4): 405-416.

BROWN DC, VOGEL KG. Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen. Matrix 1989; 9(6): 468-478.

BURGAYA F, TOUTANT M, STUDLER JM, COSTA A, LE BERT M, GELMAN M *et al.* Alternatively spliced focal adhesion kinase in rat brain with increased autophosphorylation activity.

J Biol Chem 1997; 272(45): 28720-28725.

BURGESON RE. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol 1993; 101(3): 252-255.

CALALB MB, POLTE TR, HANKS SK.

Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src familly kinases. Mol Cell biol 1995; 15(2): 954-963.

# CAMPER L, HELLMAN U, LUNDGREN-AKERLUND E.

Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes. J Biol Chem 1998; 273(32): 20383-20389.

CANNON-ALBRIGHT LA, GOLDGAR DE, MEYER LJ, LEWIS CM, ANDERSON DE, FOUNTAIN JW *et al.* 

Assignment of locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. Science 1992; 258 (5085): 1148-1152.

CARLSON EC, MAMIYA K, LIU CY, GENDRON RL, BIRK DE, FUNDERBURGH JL et al.

Role of Cys41 in the N-terminal domain of lumican in ex vivo collagen fibrillogenesis by cultured corneal stromal cells.

Biochem J 2003; 369(Pt 3): 461-468.

CHAKRAVARTI S, MAGNUSON T, LASS JH, JEPSEN KJ, LAMANTIA C, CARROLL H.

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

J Cell Biol 1998; 141(5): 1277-1286.

CHAKRAVARTI S, PETROLL WM, HASSELL JR, JESTER JV, LASS JH, PAUL J *et al.* Corneal opacity in lumican-null mice: Defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41(11): 3365-3373.

CHAKRAVARTI S, STALLINGS RL, SUNDARRAJ N, CORNUET PK, HASSELL JR. Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22. Genomics 1995; 27(3): 481-488.

CLARK WH Jr, FROM L, BERNARDINO EA, MIHM MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of skin. Cancer Res 1969; 29(3): 705-727.

CORNILLON J, CAMPOS L, GUYOTAT D. Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. Med Sci 2003; 19(6-7) : 743-752.

CORPUZ LM, DUNLEVY JR, HASSELL JR, CONRAD AH, CONRAD GW. Molecular cloning and relative tissue expression of decorin and lumican in embryonic quail cornea.

Matrix Biol 2000; 19(7): 699-704.

CORPUZ LM, FUNDERBURGH JL, FUNDERBURGH ML, BOTTOMLEY GS, PRAKASH S, CONRAD GW.

Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A.

J Biol Chem 1996; 271(16): 9759-9763.

CRITCHLEY DR. Focal adhesions – the cytoskeletal connection. Curr Opin Cell biol 2000; 12(1): 133-139.

CZARNECKI D, MEEHAN CJ. Is the incidence of malignant melanoma decreasing in young Australians? J Am Acad Dermatol 2000; 42(4): 672-674.

DANG D, BAMBURG JR, RAMOS DM. Alphavbeta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. Exp Cell Res 2006; 312(4): 468-477. DANIELSON KG, BARIBAULT H, HOLMES DF, GRAHAM H, KADLER KE, IOZZO RV.

Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility.

J Cell Biol 1997; 136(3): 729-743.

DAVIS GE, BAYLESS KJ, DAVIS MJ, MEININGER GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. Am J Pathol 2000; 156(5): 1489-1498.

DELEHEDDE M, ALLAIN F, PAYNE SJ, BORGO R, VANPOUILLE C., FERNIG DG *et al.* Proteoglycans in inflammation. Curr Med Chem 2002; 1(2): 89-102.

DE LUCA A, SANTRA M, BALDI A, GIORDANO A, IOZZO RV. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinase. J Biol Chem 1996; 271(31): 18961-18965.

DENNIS LK, WHITE E, LEE JA. Recent cohort trends in malignant melanoma by anatomic site in the United States. Cancer Causes Control 1993; 4(2): 93-100.

DIAMOND MS, GARCIA-AGUILAR J, BICKFORD JK, CORBI AL, SPRINGER TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. J Cell Biol 1993; 120(4): 1031-1043.

DOLHNIKOFF M, MORIN J, ROUGHLEY PJ, LUDWIG MS. Expression of lumican in human lungs. Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19(4): 582-587.

DONAWHO CK, WOLF P, KRIPKE ML. Enhanced development of murine melanoma in UV-irradiated skin: UV dose response, waveband dependence, and relation to inflammation. Melanoma Res 1994; 4(2): 93-100.

DORE JF, MUIR CS, CLERC F. Soleil et mélanome. Analyses des risques de cancers cutanés. Moyens de prévention. Paris : INSERM; 1990.

DUCA L, FLOQUET N, ALIX AJP, HAYE B, DEBELLE L. Elastin as a matrikine. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 49(3): 235-244.

DUNLEVY JR, BEALES MP, BERRYHILL BL, CORNUET PK, HASSELL JR. Expression of the keratan sulfate proteoglycans lumican, keratocan and osteoglycin/mimecan during chick corneal development. Exp Eye Res 2000; 70(3): 349-362. DUNLEVY JR, NEAME PJ, VERGNES JP, HASSELL JR. Identification of the *N*-linked oligosaccharide sites in chick corneal lumican and keratocan that receive keratan sulfate. J biol Chem 1998; 273(16): 9615-9621.

EBLE JA, BEERMANN B, HINZ HJ, SCHMIDT-HEDERICH A.

Alpha2beta1 integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. J Biol Chem 2001; 276(15): 12274-12284.

EBLE JA, TUCKWELL DS.

The alpha2beta1 integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin alpha2 subunit proximal to the collagen-binding site. Biochem J 2003; 376(Pt 1): 77-85.

ELICES MJ, OSBORN L, TAKADA Y, CROUSE C, LUHOWSKI S, HEMLER ME *et al.* VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. Cell 1990; 60(4): 577-584.

ELWOOD JM, GALLAGHER RP. Sun exposure and the epidemiololy of melanoma. Boston: Epidemiological aspect of cutaneous malignant melanoma; 1994: 15-66.

FEDARKO NS, VETTER UK, WEISTEIN H, ROBEY PG. Age-related changes in hyaluronan, proteoglycan, collagen, and osteonectin synthesis by human bone cells. J Cell Physiol 1992; 151(2): 215-227.

FELDING-HABERMANN B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. Clin Exp Metastasis 2003; 20(3): 203-213.

FELDING-HABERMANN B, FRANSVEA E, O'TOOLE TE, MANZUK L, FAHA B, HENSLER M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. Clin Exp Metastasis 2002; 19(5): 427-436.

FFRENCH-CONSTANT C, COLOGNATO H. Integrins: versatile integrators of extracellular signals. Trends Cell Biol 2004; 14(12): 678-686.

FRASER JR, LAURENT TC, LAURENT UB. Hyaluronan : its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med 1997; 242(1): 27-33.

FRINK RS. Staining cells on a membrane filter with Giemsa stock and tap water. Stain Technol 1965; 40(6):367-369. FRISCH SM, VUORI K, RUOSLAHTI E, CHAN-HUI PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. J Cell Biol 1996; 134(3): 793-799.

FU YM, ZHANG H, DING M, LI YQ, FU X, YU ZX et al.

Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling. Clin Exp Metastasis 2004; 21(7): 587-598.

FUNDERBURGH JL. Keratan sulfate: structure, biosynthesis and function. Glycobiology 2000; 10(10): 951-958.

FUNDERBURGH JL, FUNDERBURGH ML, BROWN SJ, VERGNES JP, HASSELL JR, MANN MM et al.

Sequence and structural implications of bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein. Protein 37B represents bovine lumican and proteins 37A and 25 are unique. J biol Chem 1993; 268(16): 11874-11880.

FUNDERBURGH JL, FUNDERBURGH ML, HEVELONE ND, STECH ME, JUSTICE MJ, LIU CY et al.

Sequence, molecular properties, and chromosomal mapping of mouse lumican. Invest Ophthalmol Vis Sci 1995; 36(11): 2296-2303.

FUNDERBURGH JL, FUNDERBURGH ML, MANN MM, CONRAD GW. Arterial lumican. Properties of corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta. J biol Chem 1991; 266(36): 24773-24777.

FUNDERBURGH JL, FUNDERBURGH ML, MANN MM, CORPUZ L, ROTH MR. Proteoglycan expression during transforming growth factor beta-induced keratocytemyofibroblast transdifferentiation.

J Biol Chem 2001; 276(47): 44173-44178.

FUNDERBURGH JL, MITSCHLER RR, FUNDERBURGH ML, ROTH MR, CHAPES SK, CONRAD GW.

Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan. Invest ophthalmol Vis Sci 1997; 38(6): 1159-1167.

GEIGER B, BERSHADSKY A, PANKOV R, YAMADA KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2(11): 793-805.

GENG Y, MCOUILLAN D, ROUGHLEY PJ. SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. Matrix Biol 2006; 25(8): 484-491.

GIANCOTTI FG, RUOSLAHTI E Integrin signaling. Science. 1999; 285(5430): 1028-1032. GINSBERG MH, LOFTUS JC, PLOW EF. Cytoadhesins, integrins and platelets. Thromb Haemost 1988; 59(1): 1-6.

GOTTLIEB M, CHAVKO M. Silver staining of native and denaturated eucaryotic DNA in agarose gels. Anal Biochem 1987, 165(1): 33-37.

GRANGE F. Epidemiology of cutaneous melanoma: descriptive data in France and Europe. Ann Dermatol Venereol 2005; 132(12 Pt 1): 975-982.

GROVER J, CHEN XN, KORENBERG JR, ROUGHLEY PJ. The human lumican gene. Organization, chromosomal location and expression in articular cartilage. J Biol Chem 1995; 270(37): 21942-21949.

GROVER J, LIU CY, KAO WW, ROUGHLEY PJ. Analysis of the human lumican gene promoter. J Biol Chem 2000; 275(52): 40967-40973.

GRZESIAK JJ, DAVIS GE, KIRCHHOFER D, PIERSCHBACHER MD. Regulation of  $\alpha 2\beta$ 1-mediated fibroblast migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. J Cell Biol 1992; 117(5): 1109-1117.

GUAN JL, HYNES RO. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor  $\alpha 4\beta 1$ . Cell 1990; 60(1): 53-61.

GUIDETTI G, BERTONI A, VIOLA M, TIRA E, BALDUINI C, TORTI M. The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets. Blood 2002; 100(5): 1707-1714.

HALL HI, MILLER DR, ROGERS JD, BEWERSE B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. J Am Acad Dermatol 1999; 40(1): 35-42.

HANKS SK, CALALB MB, HARPER MC, PATEL SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89(18): 8487-8491.

HASSELL JR, NEWSOME DA, KRACHMER JH, RODRIGUES MM. Macular corneal dystrophy: failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77(6): 3705-3709.

# HAUK CR, SIEG DJ, HSIA DA, LOFTUS JC, GAARDE WA, MONIA BP et al.

Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupt epidermal growth factorstimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. Cancer Res 2001; 61(19): 7079-7090.

HEDBOM E, HEINEGARD D. Interaction of a 59-kDa connective tissue matrix protein with collagen I and II. J Biol Chem 1989; 264(12): 6898-6905.

# HEGERFELDT Y, TUSCH M, BRÖCKER EB, FRIEDL P.

Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. Cancer Res 2002; 62(7): 2125-2130.

HERBAGE D, WEGROWSKI Y. Collagènes et protéoglycannes du derme : données actuelles. <u>In</u> : Biologie de la peau humaine. Dir. D. Schmitt. Paris : INSERM; 1997 : 1-20.

HESS AR, HENDRIX MJ.

Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. Cell Cycle 2006; 5(5): 478-480.

# HESS AR, POSTOVIT LM, MARGARYAN NV, SEFTOR EA, SCHNEIDER GB, SEFTOR RE *et al.*

Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. Cancer Res 2005; 65(21): 9851-9860.

HILDEBRAND A, ROMARIS M, RASMUSSEN LM, HEINEGARD D, TWARDZIK DR, BORDER WA *et al.* Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. Biochem J 1994; 302(Pt 2): 527-534.

HOCKING AM, SHINOMURA T, McQUILLAN DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. Matrix Biol 1998; 17(1): 1-19.

HOHLBAUM AM, GREGORY MS, JU ST, MARSHAK-ROTHSTEIN A. Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages in vivo induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. J Immunol 2001; 167(11): 6217-6224.

HOLMAN CD, ARMSTRONG BK, HEENAN PJ. Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits. J Natl Cancer Inst 1986; 76(3): 403-414.

HORNEBECK W, EMONARD H, MONBOISSE JC, BELLON G. Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression. Semin Cancer Biol 2002; 12(3): 231-241. HOTARY KB, ALLEN ED, BROOKS PC, DATTA NS, LONG MW, WEISS SJ. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the threedimensional extracellular matrix. Cell 2003; 114(1): 33–45.

HUMPHRIES JD, BYRON A, HUMPHRIES M. Integrin ligands at a glance. J Cell Sci 2006; 119(Pt 19): 3901-3903.

HYNES RO. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 1987; 48(4): 549-554.

HYNES RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 1992; 69(1): 11-25.

HYNES RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 2002; 110(6): 673-687.

IOZZO RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Annu Rev Biochem 1998; 67: 609-652.

IOZZO RV.

The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins.

J Biol Chem 1999; 274(27): 18843-18846.

IOZZO RV, MURDOCH AD.

Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. Faseb J 1996; 10(5): 598-614.

ISHIWATA T, CHO K, KAWAHARA K, YAMAMOTO T, FUJIWARA Y, UCHIDA E, TAJIRI T, NAITO Z. Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. Oncol Rep 2007; 18(3):537-43.

ISHIWATA T, FUJII T, ISHIWATA S, IKEGAWA S, NAITO Z. Effect of morpholino antisense oligonucleotide against lumican mRNA in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. Pathol Int 2004; 54(2): 77-81.

JEPSEN KJ, WU F, PERAGALLO JH, PAUL J, ROBERTS L, EZURA Y et al. A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulindeficient mice. J Biol Chem 2002; 277(38): 35532-35540.

JOHANSSON S. Non-collagenous matrix proteins. <u>In</u>: Extracellular matrix, molecular components and interactions. Dir. Comper W. Amsterdam: Harwood; 1996: 68-94.

JOHNSON JM, YOUNG TL, RADA JA. Small leucine rich repeat proteoglycans (SLRPs) in the human sclera: identification of abundant levels of PRELP. Mol Vis 2006; 12: 1057-1066.

JULIANO RL, HASKILL S. Signal transduction from the extracellular matrix. J Cell Biol 1993; 120(3): 577-585.

KANITAKIS J. Structure histologique de la peau humaine. <u>In</u> : Biologie de la peau humaine. Dir. D. Schmitt. Paris : INSERM; 1997: 1-20.

KALAMAJSKI S, ASPBERG A, OLDBERG A. The decorin sequence SYIRIADTNIT binds collagen type I. J Biol Chem 2007; 282(22): 16062-16067.

KALAMAJSKI S, OLDBERG A. Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. J Biol Chem 2007; 282(37): 26740-26745.

KAO WW, LIU CY. Roles of lumican and keratocan on corneal transparency. Glycoconj J 2002; 19(4-5): 275-285.

KAO WW, FUNDERBURGH JL, XIA Y, LIU CY, CONRAD GW. Focus on molecules: lumican. Exp Eye Res 2006; 82(1): 3-4.

KATOH K, MASUDA M, KANO Y, JINGUJI Y, FUJIWARA K. Focal adhesion proteins associated with apical stress fibers of human fibroblasts. Cell Motil Cytoskeleton 1995; 31(3): 177-195.

KELLY JW, RIVERS JK, MACLENNAN R, HARRISON S, LEWIS AE, TATE BJ. Sunlight: a major factor associated with the development of melanocytic nevi in Australian Schoolchildren. J Am Acad Dermatol 1994; 30(1): 40-4.

KIELTY CM, SHERRATT MJ, SHUTTLEWORTH CA. Elastic fibers. J Cell Sci 2002; 115(Pt 14): 2817-2828. KIM JK, XU Y, XU X, KEENE DR, GURUSIDDAPPA S, LIANG X *et al.* A novel binding site in collagen type III for integrins alpha1beta1 and alpha2beta1. J Biol Chem 2005; 280(37): 32512-32520.

KNORR R, DUSTIN ML.

The lymphocyte function-associated antigen 1 I domain is a transient binding module for intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and ICAM-3 in hydrodynamic flow. J Exp Med 1997; 186(5): 719-730.

KOBE B, DEISENHOFER J. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. Nature 1993; 366(6457): 751-756.

KRAMER RH, MARKS N. Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. J Biol Chem 1989; 264(8): 4684-4688.

KRANTZ DD, ZIDOVETZKI R, KAGAN BL, ZIPURSKY SL. Amphipathic beta structure of a leucine-rich repeat peptide. J Biol Chem 1991; 266(25): 16801-16807.

KREIS T, VALE R. Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. New-York: Oxford Univ Press; 1993: 176.

KRESSE H, HAUSSER H, SCHONHERR E. Small proteoglycans. EXS 1994; 70: 73-100.

KRUSIUS T, FINNE J, MARGOLIS RK, MARGOLIS RU. Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain. J Biol Chem 1986; 261(18):8237-8242.

KUENG W, SILBER E, EPPENBERGER U. Quantification of cells cultured on 96 wells plates. Anal Biochem 1989, 182(1): 16-19.

KUPHAL S, BAUER R, BOSSERHOFF AK. Integrin signaling in malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev 2005; 24(2): 195-222.

LAEMMLI UK.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head protein of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.

LEYGUE E, SNELL L, DOTZLAW H, TROUP S, HILLER-HITCHCOCK T, MURPHY LC et al.

Lumican and decorine are differentially expressed in human breast carcinoma. J Pathol 2000; 192(3): 313-320.

LEYGUE E, SNELL L, DOTZLAW H, HOLE K, HILLER-HITCHCOCK T, ROUGHLEY PJ *et al.* Expression of lumican in human breast carcinoma. Cancer Res 1998; 58(7): 1348–1352.

LI X, CHEN B, BLYSTONE SD, MC HUGH KP, ROSS FP, RAMOS DM. Differential expression of alphav integrins in K1735 melanoma cells. Invasion Metastasis 1998; 18(1): 1-14.

LI Y, AOKI T, MORI Y, AHMAD M, MIYAMORI H, TAKINO T *et al.* Cleavage of lumican by Membrane-type Matrix Metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar. Cancer Res 2004; 64(19): 7058-7064.

LINDAHL U, KUSCHE-GULLBERG M, KJELLEN L. Regulated diversity of heparan sulfate. J Biol Chem 1998; 273(39): 24979-24982.

LIU S, CALDERWOOD DA, GINSBERG MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. J Cell Sci 2000; 113(Pt 20): 3563-3571.

LORENZO P, ASPBERG A, ÖNNERFJORD P, BAYLISS MT, NEAME PJ. Identification and characterization of Asporine. A novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin. J Biol Chem 2001; 276(15): 12201-12211.

LU YP, ISHIWATA T, ASANO G. Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells. J pathol 2002 (a); 196(3): 324-330.

LU YP, ISHIWATA T, KAWAHARA K, WATANABE M, NAITO Z, MORIYAMA Y et al.

Expression of lumican in human colorectal cancer cells. Pathol Int 2002 (b); 52(8): 519-526.

LUO BH, CARMAN CV, SPRINGER TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. Annu Rev Immunol 2007; 25: 619-647.

LYMAN S, GILMORE A, BURRIDGE K, GIDWITZ S, WHITE GC 2ND. Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is independent of focal adhesion formation or integrin activation. Studies with activated and inhibitory beta3 cytoplasmic domain mutants. J Biol Chem 1997; 272(36): 22538-22547.

MAQUART FX, BELLON G, PASCO S, MONBOISSE JC. Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. Biochimie 2005; 87(3-4): 353-360. MARGHOOB AA, KOPF AW, RIGEL DS, BART RS, FRIEDMAN RJ, YADAV S et al. Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with "classic" atypical-mole syndrome. A case-control study. Arch Dermatol 1994; 130(8): 993-998.

McEWAN PA, SCOTT PG, BISHOP PN, BELLA J. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. Journal of Structural Biology 2006; 155(2): 294-305.

MELCHING LI, ROUGHLEY PJ. Modulation of keratan sulfate synthesis on lumican by the action of cytokines on human articular chondrocytes. Matrix Biol 1999; 18(4): 381-390.

MELISSOPOULOS A, LEVACHER C. La peau, structure et physiologie. Cachan : Ed. médicales internationnales ; 1998.

MENEGOZ F, BLACK RJ, ARVEUX P, MAGNE V, FERLAY J, BUEMI A et al. Cancer incidence and mortality in France in 1975-1995. Eur J Canc Prev 1997; 6(5): 442-466.

MICHISHITA M, VIDEM V, ARNAOUT MA.

A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. Cell 1993; 72(6): 857-867.

MONTGOMERY AM, REISFELD RA, CHERESH DA. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen.

Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(19): 8856-8860.

MONSKY WL, KELLY T, LIN CY, HEH Y, STETLER-STEVENSON WG, MUELLER SC et al.

Binding and localization of M(r) 72,000 matrix metalloproteinase at cell surface invadopodia. Cancer Res 1993, 53(13): 3159-3164.

NAITO Z.

The role of small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth.

J Nippon Med Sch 2005; 72(3): 137-145.

NELIMARKKA L, SALMINEN H, KUOPIO T, NIKKARI S, EKFORS T, LAINE J et al. Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis. Am J Pathol 2001; 158(2): 345-353.

NISHIU J, TANAKA T, NAKAMURA Y.

Identification of a novel gene (ECM2) encoding a putative extracellular matrix protein expressed predominantly in adipose and female-specifique tissues and its chromosomal localization to 9q22.3.

Genomics 1998; 52(3): 378-381.

NTAYI C, HORNEBECK W, BERNARD P.

Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in cutaneous melanoma progression Pathol Biol 2004 ; 52(3): 154-159.

OLDBERG A, ANTONSSON P, LINDBLOM K, HEINEGARD D. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). EMBO J 1989; 8(9): 2601-2604.

OLDBERG A, ANTONSSON P, MOSES J, FRANSSON LA. Amino-terminal deletions in the decorin core protein leads to the biosynthesis of proteoglycans with shorter glycosaminoglycan chains. FEBS Lett 1996; 386(1): 29-32.

O'TOOLE TE, MANDELMAN D, FORSYTH J, SHATTIL SJ, PLOW EF, GINSBERG MH. Modulation of the affinity of integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of alpha IIb. Science 1991; 254(5033): 845-847.

PARISE LV, LEE J, JULIANO RL. New aspects of integrin signaling in cancer. Semin Cancer Biol 2000; 10(6): 407-414.

PARSONS JT, MARTIN KH, SLACK JK, TAYLOR JM, WEED SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. Oncogene 2000; 19(49): 5606-5613.

PETITCLERC E, STROMBLAD S, VON SCHALSCHA TL, MITJANS F, PIULATS J, MONTGOMERY AM et al.

Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival.

Cancer res 1999; 59(11):2724-2730.

PEYREFITTE G. Biologie de la peau. Paris: SIMEP; 1997.

POIRIER J, RIBADEAU DUMAS JL, CATALA M, ANDRE JM, GHERARDI RK, BERNAUDIN JF. Les systèmes de cellules pigmentées <u>In</u>: Histologie moléculaire. Paris: Masson;1999: 183-189.

PRAILLET C, GRIMAUD JA, LORTAT-JACOB H. Les protéoglycanes : molécules aux multiples fonctions...futures molécules thérapeutiques? Médecine/Sciences 1998 ; 14(4): 412-420.

PUSCH CM, ZEITZ C, BRANDAU O, PESCH K, ACHATZ H, FEIL S *et al.* The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in gene encoding a leucine-rich repeat protein. Nat Genet 2000; 26(3): 324-327. RAUCHER D. SHEETZ MP.

Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. J Cell Biol 2000; 148(1): 127-136.

REED CC, WATERHOUSE A, KIRBY S, KAY P, OWENS RT, MCQUILLAN DJ, IOZZO RV.

Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. Oncogene 2005; 24(6): 1104-1110.

RICARD-BLUM S, RUGGIERO F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. Pathol Biol 2005; 53(7): 430-442.

ROBINET A, FAHEM A, CAUCHARD JH, HUET E, VINCENT L, LORIMIER S et al. Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. J Cell Sci 2005; 118(Pt 2): 343-356.

ROSENBLOOM J, ABRAMS WR, MECHAM R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. FASEB J 1993; 7(13): 1208-1218.

ROSS MD, BRUGGEMAN LA, HANSS B, SUNAMOTO M, MARRAS D, KLOTMAN ME *et al*.

Podocan, a novel small leucine-rich repeat protein expressed in the sclerotic glomerular lesion of experimental HIV-associated nephropathy. J Biol Chem 2003; 278(35): 33248-33255.

ROUGHLEY PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. Eur Cell Mater 2006; 12: 92-101.

RUOSLAHTI E. Integrins as receptor extracellular matrix. In: Cell Biology of Extracellular Matrix. New York: Plenum Press;1991: 343-363.

RUOSLAHTI E, PIERSCHBACHER MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 1987; 238(4826): 491-497.

SAAS P, BOUCRAUT J, QUIQUEREZ AL, SCHNURIGER V, PERRIN G, DESPLAT-JEGO S et al. CD95 (Fas/Apo-1) as a receptor governing astrocyte apoptotic or inflammatory responses: a key role in brain inflammation?

J Immunol 1999; 162(4): 2326-2333.

SAIKA S, MIYAMOTO T, TANAKA S, TANAKA T, ISHIDA I, OHNISHI Y et al. Response of lens epithelial cells to injury: role of lumican in epithelial-mesenchymal transition.

Invest Ophthalmol Vis Sci 2003; 44(5): 2094-2102.

SAIKA S, SHIRAISHI A, SAIKA S, LIU CY, FUNDERBURGH JL, KAO CW. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. J Biol Chem 2000; 275(4): 2607-2612.

SAN MARTIN S, SOTO-SUAZO M, FERREIRA DE OLIVEIRA S, APLIN JD, ABRAHAMSOHN P, ZORN TM.

Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. Reproduction 2003; 125(4): 585-595.

SANTORO SA.

Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. Cell 1986; 46(6): 913-920.

SANTRA M, EICHSTETTER I, IOZZO RV. An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. J Biol Chem 2000; 275(45): 35153-35161.

SANTRA M, MANN DM, MERCER EW, SKORSKI T, CALABRETTA B, IOZZO RV. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. J Clin Invest 1997; 100(1): 149-157.

SATO H, TAKINO T, MIYAMORI H.

Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. Cancer Sci 2005; 96(4): 212-217.

SATO H, TAKINO T, OKADA Y, CAO J, SHINAGAWA A, YAMAMOTO E *et al.* A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. Nature 1994 ; 370 (6484) : 61-65.

SCHLAEPFER DD, JONES KC, HUNTER T.

Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events.

Mol Cell Biol 1998; 18(5): 2571-2585.

SCHONHERR E, BEAVAN LA, HAUSSER H, KRESSE H, CULP LA. Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro. Biochem J 1993; 290 (Pt 3): 893-399.

SCHONHERR E, WITSCH-PREHM P, HARRACH B, ROBENEK H, RAUTERBERG J, KRESSE H.

Interaction of biglycan with type I collagen. J Biol Chem 1995; 270(6): 2776-2783.

SELTOW RB, GRIST E, THOMPSON K, WOODHEAD AD. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(14): 6666-6670. SHIMAOKA M, TAKAGI J, SPRINGER TA. Conformational regulation of integrin structure and function. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2002; 31: 485-516.

SIFAKI M, ASSOUTI M, NIKITOVIC D, KRASAGAKIS K, KARAMANOS NK, TZANAKAKIS GN.

Lumican, a small leucine-rich proteoglycan substituted with keratan sulfate chains is expressed and secreted by human melanoma cells and not normal melanocytes. IUBMB Life 2006; 58(10): 606-610.

SILBERT JEJ, BERNFIELD M, KOKENYESI R. Proteoglycans: a special class of glycoproteins. <u>In</u>: Glycoproteins II Dir. J Montreuil, JFG Vliegenthart, H Schachter Amsterdam: Elsevier; 1997: 1-31.

SPRINGER TA. Adhesion receptors of the immune system. Nature 1990; 346(6283): 425-434.

STETLER-STEVENSON WG, LIOTTA LA, KLEINER DE JR. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. FASEB J 1993; 7(15): 1434-1441.

SULOCHANA KN, FAN H, JOIS S, SUBRAMANIAN V, SUN F, KINI RM *et al.* Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. J Biol Chem 2005; 280(30):27935-27948.

SUZUKI M. Prosthetic group of cornea mucoid. J Biochem 1939; 30: 185-191.

SVENSSON L, HEINEGARD D, OLDBERG A. Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. J Biol Chem 1995; 270(35): 20712-20716.

TAI GH, NIEDUSZYNSKI IA, FULLWOOD NJ, HUCKERBY TN. Human corneal keratan sulfates. J Biol Chem 1997; 272(45):28227-28231.

TASHEVA ES, KE A, CONRAD GW. Analysis of the expression of chondroadherin in mouse ocular and non-ocular tissues. Mol Vis 2004; 10: 544-554.

TAUBENBERGER A, CISNEROS DA, FRIEDRICHS J, PUECH PH, MULLER DJ, FRANZ CM.

Revealing early steps of alpha2beta1 integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy.

Mol Biol Cell. 2007 May;18(5):1634-44.

THOMAS L. Epithelial and melanic skin tumors. Rev Prat 2002; 52(7): 797-806.

TRALHÃO JG, SCHAEFER L, MICEGOVA M, EVARISTO C, SCHÖNHERR E, KAYAL S *et al.* 

In vivo selective and distant killing of cancer cells using adenovirus-mediated decorin gene transfer.

FASEB J 2003; 17(3): 464-466.

TRENT JM, STANBRIDGE EJ, MCBRIDE HL, MESS EU, CASEY G, ARAUJO DE *et al.* Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. Science 1990; 247(4942): 568-571.

TRIKHA M, TIMAR J, LUNDY SK, SZEKERES K, CAI Y, PORTER AT *et al.* The high affinity alphaIIb beta3 integrin is involved in invasion of human melanoma cells. Cancer Res 1997; 57(12): 2522-2528.

TROUP S, NJUE C, KLIEWER EV, PARISIEN M, ROSKELLEY C, CHAKRAVARTI S et al.

Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. Clin Cancer Res 2003; 9(1): 207-214.

TSUJI T, KAWADA Y, KAI-MUROZONO M, KOMATSU S, HAN SA, TAKEUCHI K et al.

Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3).

Clin Exp Metastasis 2002; 19(2): 127-134.

TUFVESSON E, WESTERGREN-THORSSON G.

Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. J Cell Sci 2003; 116(Pt 23): 4857-4864.

VAN DER FLIER A, SONNENBERG A. Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res 2001; 305(3):285-298.

VAN DER REST M, GARRONE R. Collagen family of proteins. FASEB J 1991; 5(13):2814-2823.

VEIT G, KOBBE B, KEENE DR, PAULSSON M, KOCH M, WAGENER R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. J Biol Chem 2006; 281(6):3494-3504. VELLING T, KUSCHE-GULLBERG M, SEJERSEN T, GULLBERG D.

cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagenbinding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues.

J Biol Chem 1999; 274(36): 25735-25742.

VIJ N, ROBERTS L, JOYCE S, CHAKRAVARTI S.

Lumican suppresses cell proliferation and aids Fas-Fas ligand mediated apoptosis: implications in the cornea.

Exp Eye Res 2004; 78(5): 957-971.

# VIJ N, ROBERTS L, JOYCE S, CHAKRAVARTI S.

Lumican regulates corneal inflammatory response by modulating Fas-Fas ligand signaling. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46(1): 88-95.

VOET D, VOET JG. Les polysaccharides. <u>In</u> : Biochimie. Paris: DeBoeck Université; 1998: 258-65.

VUILLERMOZ B.

Rôle du lumicanne dans le vieillissement cutané et le contrôle de l'invasion du mélanome. Thèse de Doctorat : Médecine : Biochimie : Reims : 2004 ; n°202.

VUILLERMOZ B, KHORUZHENKO A, D'ONOFRIO MF, RAMONT L, VENTEO L, PERREAU C *et al.* The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. Exp Cell Res 2004; 296(2): 294-306.

VUILLERMOZ B, WEGROWSKI Y, CONTET-AUDONNEAU JL, DANOUX L, PAULY G, MAQUART FX. Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts. Mol Cell Biochem 2005; 277(1-2): 63-72.

WAJANT H, PFIZENMAIER K, SCHEURICH P. Non-apoptotic Fas signaling. Cytokine Growth Factor Rev 2003; 14(1): 53-66.

WALTER SD, MARRETT LD, FROM L, HERTZMAN C, SHANNON HS, ROY P. The association of cutaneous malignant melanoma with use of sunbed and sunlamps. Am J Epidemiol 1990; 131(2): 232-243.

WEBER CK, SOMMER G, MICHL P, FENSTERER H, WEIMER M, GANSAUGE F *et al.* Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines.

Gastroenterology 2001; 121(3): 657-667.

WEIGEL PH, HASCALL VC, TAMMI M. Hyaluronan synthases. J Biol Chem 1997; 272(22): 13997-14000.

WIESNER S, LANGE A, FÄSSLER R. Local call: from integrins to actin assembly. Trends Cell Biol 2006; 16(7): 327-329.

WINNEMOLLER M, SCHON P, VISCHER P, KRESSE H. Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment. Eur J Cell Biol 1992; 59(1): 47-55.

WU F, VIJ N, ROBERTS L, LOPEZ-BRIONES S, JOYCE S, CHAKRAVARTI S. A novel role of the lumican core protein in bacterial lipopolysaccharide-induced innate immune response. J Biol Chem 2007; 282(36): 26409-26417.

YAMAGUCHI H, CONDEELIS J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. Biochim Biophys Acta 2007; 1773(5): 642-652.

YAMAGUCHI Y, MANN DM, RUOSLAHTI E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. Nature 1990; 346(6281): 281-284.

YAMAMOTO M, YAMAMOTO K, NOUMURA T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. Exp Cell Res 1993; 204(1): 121-129.

YING S, SHIRAISHI A, KAO CW, CONVERSE RL, FUNDERBURGH JL, SWIERGIEL J *et al.* 

Characterization and expression of the mouse lumican gene. J Biol Chem 1997; 272(48): 30306-30313.

ZWELLING LA, ALTSCHULER E, CHERIF A, FARQUHAR D.

N-(5,5-diacetoxypentyl)doxorubicin: a novel anthracycline producing DNA interstrand crosslinking and rapid endonucleolytic cleavage in human leukaemia cells. Cancer Res 1991; 51(24): 6704-6707.

# Annexes

Brezillon et al.

1

LUMICAN CORE PROTEIN CAUSES DISASSEMBLY OF ACTIN CYTOSKELETON AND FOCAL ADHESIONS IN MELANOMA CELLS

Stéphane Brézillon<sup>1</sup>, Marie-France D'Onofrio<sup>1</sup>, Agata Radwanska<sup>2</sup>, Corinne Perreau<sup>1</sup>, Maria Malicka-Blaszkiewicz<sup>2</sup>, François-Xavier Maquart<sup>1</sup> and Yanusz Wegrowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6198, Faculté de

Médecine, Université de Reims-Champagne-Ardenne, 51095 Reims, France.

<sup>2</sup>Department of Cell Pathology, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, University of Wroclaw, Poland.

<sup>3</sup>Centre Hospitalier et Universitaire de Reims, 51092 Reims Cedex, France.

Running title: Lumican effect on melanoma cell cytoskeleton

Address correspondence to: Stéphane Brézillon, Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, F51095 Reims cedex, France; Tel. +33-326-913734; Fax. +33-326-918055; E-Mail: <u>stephane.brezillon@univ-reims.fr</u>

# Abstract

Lumican is a small leucine-rich proteoglycan (SLRP) of the extracellular matrix (ECM), with anti-tumour properties. We recently demonstrated that lumican inhibits the migration of melanoma cells by increasing their adhesion to the ECM and identified  $\beta 1$ integrin as mediator of this effect (D'Onofrio et al, 2008). The aim of this study was to analyse lumican effects on cell actin cytoskeleton network, focal adhesions and  $\beta$ 1 integrin distribution in A375 human melanoma cells. The interaction of melanoma cells with the lumican substratum resulted in a heterogeneous distribution of  $\beta$ 1 integrin. In parallel, a disassembly of cell actin stress fibres and a significant decrease in vinculin, paxillin immunostaining at focal adhesions were observed. The immunostainings of total phosphotyrosine-containing proteins and the focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosine-397 (FAK-pY397) were decreased significantly. Time-course analysis of the FAKpY397 demonstrated a significant decrease of the number of positive spots in focal adhesions when A375 cells were in contact with lumican substratum and not with collagen or fibronectin. These results suggest that lumican induces an alteration of the link between actin filaments and  $\beta$ 1 integrin, which could lead to a destabilization of focal adhesion complexes and an inhibition of cell migration. The cytoskeleton remodeling induced by lumican substratum in melanoma cells might explain, at least in part, the anti-invasive effect of this SLRP.

Keywords: actin; ECM; focal adhesion; integrin; lumican; melanoma; proteoglycan

# Introduction

Dermis extracellular matrix (ECM) is composed of different types of collagens, connective tissue glycoproteins (including fibronectin, tenascin, thrombospondin), elastic fibers, hyaluronan and proteoglycans. The small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family, which includes decorin, lumican, biglycan and others, constitutes an abundant component of skin extracellular matrix [1-4]. Generation of knock-out mice has proven the role of lumican in the regulation of the formation of collagen fibrillar networks in skin [5].

In addition to the control of collagen fibril assembly, SRLPs seem to have other important functions. Particularly, lumican and decorin possess anti-tumour activity. We previously demonstrated that lumican inhibits melanoma progression in a mouse experimental model, mainly by inhibiting cell migration and identified  $\beta$ 1 integrin as mediator of this effect [1-4].

Integrins interact, *via* their cytoplasmic domains, with components of the actin cytoskeleton and signaling molecules within the cell [6-9]. Paxillin and vinculin interact with the cytoplasmic domain of  $\beta$ 1 integrin [10-12]. Paxillin is a cytoskeletal component that localizes to the focal adhesions at the ends of actin stress fibres [10,11]. It binds to the rod domain of vinculin, another focal adhesion protein. Vinculin is a possible link between ends of the bundles of actin filaments and the plasma membrane during cell spreading [12]. During cell adhesion and spreading on ECM, the remodelling of the actin cytoskeleton is a highly dynamic process which mediates cell motility and cell shape changes [13].

Focal adhesion kinase (FAK) plays a central role in cell spreading, differentiation, migration, cell death and cell cycle [14]. Activation of FAK by integrin clustering leads to phosphorylation of FAK, which creates a binding site for the SRC kinases family, and activates cell migration and invasion [14].

The aim of this study was to analyse the effect of lumican on melanoma cell migratory phenotype. Previous work from our laboratory showed that A375 human melanoma cells were the best model for our study because they do not secrete ECM macromolecules susceptible to interfere in adhesion experiments [1]. Here, we provide evidence that A375 cells, when in contact with lumican core protein substratum, exhibit a disassembly of actin stress fibres and focal adhesions, in parallel with an abnormal distribution of the  $\beta$ 1 integrin subunit. These lumican-induced cytoskeleton alterations within melanoma cells might explain, at least in part, the inhibition of tumour cell migration, responsible for the lumican anti-tumour effects.

## Materials and methods

#### **Reagents and Antibodies**

Recombinant human lumican core protein was produced as previously described [4]. Type I collagen was prepared from rat tail tendon by extraction with 0.1 M acetic acid [15]. Mouse monoclonal anti human  $\alpha 2$  (P1E6) and  $\beta 1$  (6S6) subunits of integrins were purchased from Chemicon (Souffelweyersheim, France). Non immune mouse IgG (MOPC-21) was purchased from Sigma® (Saint-Quentin Fallavier, France). The antibodies: anti-FAK, anti-SRC and anti-SRC-pY416, rabbit polyclonal were obtained from Cell Signaling Technology<sup>®</sup> (Danvers, MA, USA). Rabbit polyclonal anti-FAK-pY397 and mouse monoclonal antiphosphotyrosine-containing proteins (MAB PY20) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Le Perray en Yvelines, France). Mouse anti human vinculin monoclonal antibody was obtained from Serotec (Oxford, United Kingdom). Rabbit anti human paxillin polyclonal antibody was obtained from Biolegend (San Diego, CA, USA). Rabbit anti Ki-67 (clone Mib1) was provided by Dako (Carpinteria, USA). Alexa Fluor<sup>®</sup>488-conjugated goat anti-mouse IgG<sub>1</sub> ( $\gamma$ 1) and Alexa Fluor<sup>®</sup>488-conjugated goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibodies were obtained from Invitrogen (Cergy-pontoise, France). To visualize total actin, Alexa Fluor<sup>®</sup>568-conjugated phalloidin (Invitrogen) was used. Nuclei of apoptotic cells were visualized with Hoechst 33342 (Invitrogen). Propidium iodide was obtained from AbCys (Paris, France). Doxorubicin was obtained from Pharmacia and UpJohn (St Quentin en Yvelines, France).

#### **Cell Culture**

A375 human melanoma cell line (CRL-1619) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured as recommended by supplier.

#### Scanning Laser Confocal Microscopy

Sterile glass coverslips were coated with 10 µg of lumican, type I collagen, or fibronectin in a 24-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark). Non-coated coverslips were used as controls. A375 cells were grown to 80 % confluence on coverslips for 24 h. Cells were fixed in icecold 4% paraformaldehyde. Integrins were immunodetected using the primary antibodies (1:100 dilution) after overnight incubation at 4°C. Focal adhesions were immunodetected as follows [10-12,14]. Briefly, after fixation, cells were permeabilized in 0.1 % Triton X-100 and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-FAK, anti-FAKpY397, anti-vinculin, anti-paxillin, anti-SRC, anti-SRC-pY416, anti-phosphotyrosinecontaining proteins, and anti-Ki-67. Negative controls were performed using non immune IgG or by omission of the primary antibody. Alexa Fluor<sup>®</sup>488-conjugated goat anti-mouse IgG<sub>1</sub> or Alexa Fluor<sup>®</sup>488-conjugated goat anti-rabbit IgG were used at a dilution of 1:200. In addition, a time-course analysis of the distribution of  $\beta 1$  and  $\alpha 2$  integrins subunits along with the distribution of FAK-pY397 in focal adhesion complexes was followed at different times of cell adhesion (30 min, 2, 4, 24 and 48 h). The number of positive spots in focal adhesions was counted per A375 cell on each substratum in five randomly selected 40x microscopy fields from three independent experiments [16]. For short times of cell plating (30 min, 2, 4 h), pre-coated coverslips were saturated with heated 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h before cell seeding.

For double immunolabelling, A375 cells grown for 24 h on coverslips were fixed and then permeabilized as above. Cells were incubated with  $\beta$ 1 integrin, or vinculin, or paxillin antibodies overnight at 4°C and with Alexa Fluor<sup>®</sup>488-conjugated goat anti-mouse IgG. Alexa Fluor<sup>®</sup>568-conjugated phalloidin was used to stain actin cytoskeleton [17]. Slides were observed under confocal microscope (Olympus IX70).

#### Western Blotting

After 24 h of incubation in a 6-well plate coated with collagen, fibronectin or lumican (60  $\mu$ g/well), A375 cells were lysed in cell lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin and aprotinin]. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid protein assay (Uptima, Montluçon, France). Total proteins (10 $\mu$ g) resolved in a 7.5% polyacrylamide SDS-PAGE were transferred to Immobilon-P (Millipore Corp., Bedford, MA) and subjected to immunoblot analysis with rabbit anti-actin antibody (A5060, 1:250 dilution, Sigma). Alternatively, the blots were probed with different primary antibodies and horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies. The products were visualized by enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The following primary antibodies were used for immunoblot analysis: anti-FAK (1:1000 dilution), anti-FAK-pY397 (1:200), anti-SRC (1:5000), anti-SRC-pY416 (1:200), anti-phosphotyrosine-containing proteins (1:200), anti-β1 integrin subunit (1:1000), anti-vinculin (1:1000) and anti-paxillin (1:1500) antibodies.

#### **Apoptosis and Proliferation Assays**

To compare to lumican the effect of an apoptosis-inducing agent, doxorubicin (1  $\mu$ M in dimethyl sulfoxide (DMSO)) [18], Hoechst 33342 was applied on cells at 1 $\mu$ g/ml final dilution in medium, for 30 min at 37°C. This procedure stained nuclei of both apoptotic and necrotic cells. Then, cells were labelled with propidium iodide for 30 min at 37°C to distinguish necrotic cells [19]. Slides were observed under a UV microscope (Eclipse TE 300, Nikon). The percentage of nuclei positive for Ki-67, which reflects the proliferation of the cells, was calculated on a total number of 200 cells after 24h of seeding.

8

# **Statistical Analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical significance between groups was assessed by unpaired Student's *t*-test. Differences with p < 0.01 were considered significant.

# Results

#### Lumican induces the formation of abnormal $\beta$ 1 integrin distribution

Previous works from our laboratory suggested that  $\alpha 2\beta 1$  integrin may be a mediator of A375 cells adhesion to lumican [1]. Therefore, we focused on the distribution of  $\alpha 2$  and  $\beta 1$  integrin subunits in these cells. The effect of lumican on  $\beta 1$  and  $\alpha 2$  integrin subunits distribution in A375 cells are shown in Figure 1. Lumican strongly altered the homogeneous distribution of  $\beta$ 1 integrin along the plasma membrane (Fig. 1a, arrows) in comparison to type I collagen (Fig. 1b), fibronectin (Fig. 1c) and the control non-coated coverslips (Fig. 1d). It also slightly altered the distribution of  $\alpha 2$  integrin with a punctuate labelling (Fig. 1e) similar to the one observed on type I collagen coating (Fig. 1f). In contrast, the distribution of  $\alpha^2$  integrin was homogeneous along the membrane of A375 cells grown on fibronectin coating (Fig. 1g) or non coated coverslips (Fig. 1h). No difference was observed by Western-blotting in the protein level of  $\beta$ 1 integrin subunit in A375 cells on lumican, type I collagen or fibronectin (Insert Fig. 1) suggesting that abnormal distribution did not result from the changes of integrin synthesis. Time-course analysis of the distribution of  $\beta 1$  and  $\alpha 2$  integrin subunits showed that heterogeneous distribution could not be observed before 24 h of cell adhesion on lumican (data not shown). Lumican coating induced no change in the distribution of  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ v integrins (data not shown). A375 cells did not express  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6 and  $\beta$ 2 integrin subunits.

#### Lumican inhibits A375 cells actin stress fibres and focal adhesions

A375 cells grown on lumican exhibited an actin organization different from that observed in cells grown on other ECM substrata. Lumican induced an impaired actin organization whith thick bundles observed throughout the cytoplasm (Fig. 2a, arrows). In contrast, A375 cells grown on type I collagen (Fig. 2b), fibronectin (Fig. 2c), and glass (Fig. 2d) exhibited

numerous thin filaments of F-actin stress fibres. Vinculin and paxillin are proteins involved in the link between actin filaments and the  $\beta$ 1 integrin subunit [10, 12]. As already described [16], the vinculin and paxillin stainings were observed in focal adhesions at an optical Z plan corresponding to the cell attachment to the coverslips (Fig. 2e-l). After 24h of adhesion, the number of positive spots for vinculin and paxillin per A375 adherent cell was counted [16]. A significant (*P*<0.01) decrease of the number of vinculin and paxillin spots was observed in cells grown on lumican coating (Fig. 2e, i) while numerous spots of vinculin and paxillin were observed on type I collagen (Fig. 2f, j; arrows), fibronectin (Fig. 2g, k; arrows) and glass (Fig. 2h, l; arrows). The quantitative data are summarized in **Table 1**.

As for the  $\beta$ 1 integrin subunit, no difference was observed by Western blotting in the level of vinculin and paxillin proteins expression in A375 cells after 24 h of seeding on lumican, type I collagen or fibronectin (Insert Fig. 2). Taken together, these results suggest that the lumican-induced redistribution of the integrins might be due to profound reorganization of actin cytoskeleton and focal adhesions in melanoma cells.

#### Lumican inhibits the migratory phenotype of A375 cells

FAK is a crucial kinase in intracellular cascade activation events initiated by focal adhesions [14]. Activation of FAK by integrin clustering leads to autophosphorylation at tyrosine-397 (FAK-pY397) followed by SRC binding and phosphorylation [14]. Localization of total phosphotyrosine-containing proteins (Fig. 3a-d), FAK-pY397 (Fig. 3e-h) and SRC-pY416 (Fig. 3i-l) by immunofluorescence confirmed that these proteins were primarily found in focal adhesions [16,21,31,32]. Similar results were obtained with anti-FAK and anti-SRC (data not shown). Lumican significantly inhibited the immunolabelling of total phosphotyrosine-containing proteins (Fig. 3a), FAK-pY397 (Fig. 3e), SRC-pY416 in focal adhesions (Fig. 3i), which suggested that it did not stimulate the cell migratory phenotype. In

10

11

comparison to lumican coating, the number of positive spots of focal adhesions in A375 cells was significantly increased (P<0.01) in cells grown on type I collagen (Fig. 3b, f and j), or fibronectin, (Fig. 3c, g and k), or glass (Fig. 3d, h and l). The quantitative data are summarized in **Table 2**.

The kinetic of formation of focal adhesions was studied with the anti-FAK-pY397 antibody. A comparative immunocytochemical time-course analysis of FAK-pY397 after 30 min, 2, 4 and 24h of cell growth on lumican (Fig. 4a, e, i and m), type I collagen (Fig. 4b, f, j and n), fibronectin (Fig. 4c, g, k and o) and glass (Fig. 4d, h, l and p) was performed. No significant focal adhesions were detectable after 30 min. After 2h, the presence of a small amount of FAK-pY397 was observed in A375 cells grown on lumican and other substrata (Fig. 4e, f, g and h, arrows). After 4h, more FAK-pY397 spots were observed on type I collagen (Fig. 4j), fibronectin (Fig. 4k), and glass (Fig. 4l) than on lumican coating (Fig. 4i). After 24h, a significant (P<0.01) increase of FAK-pY397 was observed on type I collagen (Fig. 4n), fibronectin (Fig. 4o), and glass (Fig. 4p), in comparison to lumican coating (Fig. 4m). The quantitative data are summarized in **Table 3**. These data indicate that the FAK-pY397 positive focal adhesions are decreased in A375 cells by recombinant lumican.

#### Lumican coating does not induce A375 cells apoptosis

Lumican may induce apoptosis in mouse melanoma B16F1 cells [4]. To determine whether the lumican-induced adhesion events are not the effect of cell apoptosis, we compared the apoptotic nuclei fragmentation of the A375 cells seeded on lumican with a well known proapoptotic drug: doxorubicin [18]. Compared to DMSO negative control, the integrity of nuclei was disturbed in the cells grown in presence of doxorubicin, where some perinuclear chromatin condensation could be observed already after 2 h of incubation and increased with the time of incubation (data not shown), in parallel to a decreased number of attached cells. In contrast, no sign of apoptosis or necrosis was observed in the cells grown on lumican, type I collagen, fibronectin, or glass (data not shown). These results suggest that the inhibition of phosphorylation of kinases and the cytoskeleton reorganization are not due to apoptosis.

Moreover, similar percentage of positive A375 cells for Ki67 ( $0.54 \pm 0.14$ ) on lumican, ( $0.58 \pm 0.10$ ) on type I collagen, ( $0.57 \pm 0.03$ ) on fibronectin substrata and ( $0.69 \pm 0.13$ ) on glass, respectively (Fig. 5a-d), indicated that the proliferation of A375 cells was not altered by lumican compared to type I collagen or fibronectin after 24 h of seeding. The percentage of positive A375 cells for Ki67 did not change after 48h of seeding (data not shown).

12

#### Discussion

Our previous studies showed that lumican is involved in the control of melanoma progression and that this SLRP, similarly to decorin, may be considered as an anti-tumour component from the ECM [4]. Moreover, we recently identified  $\beta$ 1 integrin as mediator of A375 melanoma cell adhesion on lumican [1]. A375 human melanoma cells were chosen for our studies because they do not express endogenous ECM proteins such as lumican, collagen or fibronectin, which might interfere in the experiments.

Integrins have been described to modulate melanoma cell invasion [1,6]. We observed a lumican-induced heterogeneous distribution of  $\beta$ 1 integrin subunit. There was no change of the distribution of  $\alpha v$  and  $\alpha v\beta$ 3 integrins along the plasma membrane, showing that the alteration of integrins distribution was not a general phenomenon.

We investigated whether the anti-tumour mechanism of action of lumican might result from an altered migratory cell phenotype. Indeed, we observed that the actin network was disassembled in the presence of lumican with a disappearance of the developed stress fibres and reorganization in large bundles of actin filaments.

Interactions between integrins and ECM components involve focal adhesion contacts connecting the cytoskeleton [20,21]. Focal adhesions were observed at a different optical Z level corresponding to the contact between cells and coverslips. Lumican induced a significant decrease in vinculin and paxillin in focal adhesions. The disruption of vinculin and paxillin links between actin filaments and  $\beta$ 1 integrin could lead to a destabilization of focal adhesion complexes and an inhibition of cell motility. The lumican-induced redistribution of  $\beta$ 1 integrin subunits might be caused by collapsed cell actin stress fibres, which may lead to a decrease in the strength of the focal adhesion complexes and to an inhibition of cell migration and invasion [22-27].

Localization of FAK by immunofluorescence confirmed that it was primarily found in cellular focal adhesions. The phosphorylation of FAK has been described to promote aggressive melanoma phenotype [27]. FAK co-localizes with integrins in focal adhesions and is an important regulator of cell attachment and spreading [14,21,25]. Integrin-mediated cell attachment to ECM induces FAK phosphorylation at tyrosine-397, binding of the SH<sub>2</sub> domains of SRC kinases family and of other kinases. SRC then phosphorylates at least five Tyr residues on FAK, and this triggers a series of downstream events [21,27-32]. Time-course analysis of the distribution of FAK-pY397 positive focal adhesions showed that these complexes accumulated along the surrounding and leading edges of the cell protrusions in melanoma cells. After 24 h of seeding, the number of focal adhesions was significantly increased in cells seeded on collagen or fibronectin-coated coverslips, compared with lumican-coated coverslips. Taken together, these results suggest that A375 cells, when seeded on lumican, rapidly acquired a static phenotype typical of adherent cells, whereas a dynamic and migratory phenotype [25] with numerous focal adhesions at the protusion edge, was observed in cells grown on collagen or fibronectin-coated coverslips.

These results are in good agreement with those of Fu *et al.* [31], who reported phosphorylation of FAK-pY397 when A375 cells were plated on fibronectin-coated dishes and a loss of phosphorylation of FAK-pY397 when A375 cells were in suspension. The absence of lumican-induced changes in the expression of  $\beta$ 1 integrin and of vinculin and paxillin suggest that cytoskeleton remodelling is more important than protein synthesis in the regulation of the migratory phenotype.

The integrity of nuclei was not disturbed in the cells grown on lumican, compared to the cells grown in the presence of doxorubicin, where some perinuclear chromatin condensation could be observed after 2 h of incubation. These results show that the inhibition of melanoma cells migration by lumican is not due to an apoptosis-inducing effect.

14

Moreover, the Ki-67 staining demonstrated that the cell proliferation rate was similar from one ECM substratum to another. These data demonstrate that A375 cells viability and proliferation were not altered on the lumican substratum.

In conclusion, we showed that lumican induces collapsed actin and reduced focal adhesions, in parallel to  $\beta 1$  integrin heterogeneous distribution, in melanoma cells. The cytoskeleton changes induced by lumican substratum might inhibit the migratory phenotype of A375 melanoma cells and explain, at least in part, the anti-invasive effect of this SLRP. Further work will be necessary to better understand the downstream transduction pathways which regulate the lumican-induced adhesion and inhibition of the migration.
16

### Acknowledgments

The financial support of Cancéropôle Grand Est and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité de la Marne) is gratefully acknowledged. We thank Dr. H. Kaplan for assistance in confocal microscopy.

### References

- D'Onofrio MF, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Roughley PJ, Maquart FX, et al. Identification of β1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican. Biochem Biophys Res Communic 2008, 365: 266-272.
- Iozzo, RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Annu Rev Biochem 1998; 67: 609-652.
- Schonherr E, Sunderkotter C, Schaefer L, Thanos S, Grässel S, Oldberg A, et al. Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea. Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea. J Vasc Res 2004; 41: 499-508.
- Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'Onofrio MF, Ramont L, Venteo L, Perreau C, et al. The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. Exp Cell Res 2004; 296: 294-306.
- Chakravarti S, Petroll WM, Hassell JR, Jester JV, Lass JH, Paul J, et al. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. J Cell Biol 1998; 141: 1277-1286.
- Ramos DM, Berston ED, Kramer RH. Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells. Cancer Research 1990; 50: 728-734.
- Hart IR, Birch M, Marshall JF. Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. Cancer Metastasis Rev 1991; 10: 115-128.
- 8. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. Science 1999; 285: 1028-1032.

- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. Pharmacol Rev 1998; 50: 197-263.
- Lamorte L, Rodrigues S, Sangwan V, Turner CE, Park M. Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/beta-PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts. Mol Biol Cell 2003; 14: 2818-2831.
- Vallés AM, Beuvin M, Boyer B. Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells. J Biol Chem 2004; 279: 44490-44496.
- Ezzell RM, Goldmann WH, Wang N, Parasharama N, Ingber DE. Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. Exp Cell Res 1997; 231: 14-26.
- Schmidt A, Hall MN. Signaling to the actin cytoskeleton. Annu Rev Cell Dev Biol 1998; 14: 305-338.
- Parsons JT, Martin KH, Slack JK, Taylor JM, Weed SA. Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. Oncogene. 2000; 19: 5606-5613.
- 15. Piez KA, Eigner EA, Lewis MS. Biochemistry. 1963; 2: 58-66.
- Jiang X, Jacamo R, Zhukova E, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. RNA interference reveals a differential role of FAK and Pyk2 in cell migration, leading edge formation and increase in focal adhesions induced by LPA in intestinal epithelial cells. J Cell Physiol. 2006; 207: 816-828.

- Sulochana KN, Fan H, Jois S, Subramanian V, Sun F, Kini RM, et al. Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. J Biol Chem 2005; 280: 27935-27948.
- Fourre N, Millot JM, Garnotel R, Jeannesson P. In situ analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells. Anticancer Res 2006; 26: 4623-4626.
- McKeague AL, Wilson DJ, Nelson J. Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines. Br J Cancer 2003; 88: 125-131.
- Hynes, RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 1992;
   69: 11-25.
- .Hamadi A, Bouali M, Dontenwill M, Stoeckel H, Takeda K, Rondé P. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. J Cell Sci 2005; 118: 4415-4425.
- Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. Biochim Biophys Acta 2007; 1773: 642-652.
- Dang D, Bamburg JR, Ramos DM. Alphavbeta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion. Exp Cell Res 2006; 31: 468-477.
- Wiesner S, Lang A, Fässler R. Local call: from integrins to actin assembly. Trends in Cell Biology 2006; 16: 327-329.

20

- Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, Friedl P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. Cancer Res 2002; 62: 2125-2130.
- 26. Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. J Cell Sci 2003; 116: 4857-4864.
- 27. Hess AR, Hendrix MJ. Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype. Cell Cycle. 2006; **5**: 478-480.
- Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. J Cell Biol 1993; 120: 577-585.
- Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, Chan-Huy PY. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. J Cell Biol 1996; 134: 793-799.
- Schlaepfer DD, Jones KC, Hunter T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. Mol Cell Biol 1998; 18: 2571-2585.
- 31. Fu YM, Zhang H, Ding M, Li YQ, Fu X, Yu ZX, et al. Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodeling. Clin Exp Metastasis 2004; 21: 587-598.

 Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89: 8487-8491.

### Legends to figures

Fig. 1 Lumican causes heterogeneous  $\beta 1$  integrin distribution at the surface of A375 cells after 24 h of seeding. Heterogeneous distribution of  $\beta 1$  integrin along the plasma membrane was observed in A375 cells grown on lumican-coated coverslips (a, arrows). In contrast,  $\beta 1$ integrin was homogeneously distributed along the plasma membrane of the A375 cells grown onto type I collagen, fibronectin, and non-coated coverslips (b-d). A punctuate  $\alpha 2$  integrin labelling was observed in A375 cells grown on lumican and type I collagen (e and f) while the distribution of  $\alpha 2$  integrin was homogeneous along the membrane of the A375 cells grown on fibronectin and non-coated coverslips (g and h). Scale bar, 10  $\mu$ m. Insert: Western blot analysis of the expression of  $\beta 1$  integrin in A375 cells after 24 h of seeding on lumican, type I collagen and fibronectin substrata showed no difference.

Fig. 2 Lumican causes disassembly of A375 cells actin stress fibers and focal adhesions after 24 h of seeding. Total actin microfilaments were visualized with Alexa Fluor<sup>®</sup>568-conjugated phalloidin (a-l). Lumican induced the formation of large bundles of actin filaments (a, arrows) together with a heterogeneous distribution of the  $\beta$ 1 integrin subunit. In contrast, a fully developed network of F-actin stress fibres was observed in cells grown on type I collagen and fibronectin substrata or glass coverslips (b-d). Focal adhesions were observed at a different optical Z level corresponding to the contact between cells and coverslips. Lumican induced a significant alteration in the number of spots of vinculin immunolabelling (e, arrows) while strong vinculin immunostaining was observed in focal adhesions in cells grown on type I collagen and fibronectin substrata or glass coverslips (j-l, arrows). Scale bar, 10  $\mu$ m. Insert: Western blot

23

analysis of the expression of vinculin and paxillin in A375 cells on lumican, type I collagen and fibronectin substrata showed no differences.

**Fig. 3** Lumican altered the distribution of phosphotyrosine-containing proteins in focal adhesions of A375 cells after 24 h of seeding. Phosphotyrosine-containing proteins (a-d), FAK-pY397 (e-h) and SRC-pY416 (i-l), were detected in focal adhesions. Lumican (a, e, and i) significantly inhibited the labelling of total phosphotyrosine-containing proteins, FAK-pY397 and SRC-pY416, which suggests that lumican inhibits the cell migratory phenotype. Indeed, the number of focal adhesions was higher in cells grown on collagen (b, f, and j) or fibronectin (c, g, and k) or glass (d, h, and l) compared to lumican. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Fig. 4** Time-course analysis of FAK-pY397 labelling in A375 cells. Cells were plated onto 10  $\mu$ g of different protein-coated coverslips, lumican (a, e, i, and m), collagen (b, f, j, and n), fibronectin (c, g, k, and o) or glass (d, h, l, and p) in 24-well plates and incubated at 37°C for 30 min (a-d), 2 h (e-h), 4 h (i-l), or 24h (m-p) and processed with antibody directed to FAK-pY397 (a-p). The time-course analysis of the formation of the focal adhesion complexes showed that, after 30 min of cell adhesion (a-d), no significant focal adhesion complexes were formed on any ECM subtstrata. After 2 h of cell adhesion (e-h), focal adhesions were observed in flat adherent cells grown on lumican and other substrata (e-h, arrows). After 4 h of adhesion (i-l) and 24 h of adhesion (m-p), the number of focal adhesion complexes increased significantly on type I collagen (j and n), fibronectin (k and o), and glass (l and p) while no significant changes were observed on lumican (i and m), suggesting that lumican did not trigger intracellular signalling events which may promote tumour cell invasion. Scale bar, 10  $\mu$ m.

**Fig. 5** Lumican does not inhibit proliferation of A375 cells. After 24h of seeding on lumican (a), type I collagen (b), fibronectin (c), and glass (d). A375 cells were stained with anti-Ki-67 antibody. Nuclei of proliferative cells were labeled with Ki-67. Proliferative cells were observed on each ECM substratum (a-d). The percentage of proliferative cells was  $0.54 \pm 0.14$  (mean  $\pm$  SD) on lumican,  $0.58 \pm 0.10$  on type I collagen,  $0.57 \pm 0.03$  on fibronectin, and  $0.69 \pm 0.13$  on glass, respectively. These data demonstrate that A375 cells proliferation is not altered on lumican substratum. Scale bar, 50  $\mu$ m.

Coating	Vinculin	Paxillin
Type I collagen	7.64 ± 2.55	5.52 ± 1.00
Fibronectin	$7.12 \pm 1.64$	5.16 ± 1.52
Glass (no coating)	$6.48 \pm 1.42$	$4.84\pm0.85$
Lumican	$4.04 \pm 0.98*$	$4.00 \pm 0.71*$

### Table 1. Number of positive spots of vinculin and paxillin per A375 cell.

The number of positive spots of vinculin and paxillin in focal adhesions was counted per A375 cell after 24h of seeding on each substratum as described under Materials and Methods [16]. A significant decrease of the number of vinculin and paxillin spots was observed in cells grown on lumican coating compared with each ECM substratum. Data were expressed as mean  $\pm$  SD. An asterisk indicates *P*<0.01.

Table 2. Number of positive spots of phosphotyrosine-containing proteins, FAK-pY397,and SRC-pY416 per A375 cell.

Coating	Phosphotyrosine-containing proteins	FAK-pY397	SRC-pY416
Type I collagen	$13.36 \pm 4.59$	$16.24 \pm 5.06$	11.68 ± 4.34
Fibronectin	$10.32 \pm 3.65$	$18.56 \pm 6.04$	$11.60 \pm 3.34$
Glass (no coating)	$11.44 \pm 3.95$	17.2 ± 4.97	$12.32 \pm 3.25$
Lumican	$4.24 \pm 1.98*$	5.64 ± 1.91*	4.40 ± 2.0.2*

The number of positive spots of phosphotyrosine-containing proteins, FAK-pY397, and SRCpY416 in focal adhesions was counted per A375 cell after 24h of seeding on each substratum [16]. Lumican, compared to other substrata, inhibited significantly the number of total phosphotyrosine-containing proteins, FAK-pY397, and SRC-pY416 positives spots in focal adhesions. Data were expressed as mean  $\pm$  SD. An asterisk indicates *P*<0.01.

Coating	2h	4h	24h
Type I collagen	2.56 ± 0.87	4.00 ± 1.3	16.24 ± 5.06*
Fibronectin	$2.00 \pm 0.82$	5.04 ± 1.21	$18.56 \pm 6.04*$
Glass (no coating)	$2.52 \pm 0.87$	4.84 ± 1.4	17.2 ± 4.97*
Lumican	$3.28 \pm 0.94$	$2.92 \pm 0.70$	5.64 ± 1.91

### Table 3. Time-course analysis of FAK-pY397 labeling in A375 cells.

The number of positive spots of FAK-pY397 in focal adhesions was counted per A375 cell on each substratum after 0.5h, 2, 4 and 24h of cell growth [16]. A significant increase of FAK-pY397 was observed on type I collagen, fibronectin, and glass, in comparison with lumican substratum after 24h of seeding. Data were expressed as mean  $\pm$  SD. An asterisk indicates *P*<0.01.

# Fig. 1







## Fig. 3







Lumican

Collagen

Fibronectin

Glass



Available online at www.sciencedirect.com



**BBRC** 

Biochemical and Biophysical Research Communications 365 (2008) 266-272

www.elsevier.com/locate/ybbrc

# Identification of β1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican

Marie-France D'Onofrio<sup>a,1</sup>, Stéphane Brézillon<sup>a,1</sup>, Thomas Baranek<sup>b</sup>, Corinne Perreau<sup>a</sup>, Peter J. Roughley<sup>c</sup>, François-Xavier Maquart<sup>a</sup>, Yanusz Wegrowski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6198, Faculté de Médecine, IFR 53,

Université de Reims-Champagne-Ardenne, 51095 Reims cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'Immunologie, Virologie et Bactériologie, IPCM, EA 3796, Faculté de Pharmacie, IFR 53, Université de Reims-Champagne-Ardenne, 51095 Reims cedex, France <sup>c</sup> Shriners Hospital for Children, Genetics Unit, Montreal, QC, Canada

> Received 23 October 2007 Available online 5 November 2007

#### Abstract

Lumican is a small leucine-rich proteoglycan (SLRP) present in the dermal extracellular matrix. Previous data from our laboratory demonstrated that lumican decreases melanoma progression *in vivo*. Here, we show that melanoma cell migration is decreased by lumican and that this effect is due to an enhanced cell adhesion. The adhesion of A375 human melanoma cells on lumican was dose-dependent and required  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  divalent cations. Using a panel of monoclonal antibodies directed against integrin subunits, we showed that A375 cells can bind to recombinant lumican through  $\beta 1$  type integrins. Moreover, the use of rhodocetin, an inhibitor of  $\alpha 2$  integrin, suggested that this particular subunit might also be involved in the interaction with lumican. The increased  $\beta 1$  integrin-mediated adhesion of melanoma cells to lumican might explain, at least in part, the anti-invasive effect of this SLRP.

Keywords: Adhesion; Integrin; Lumican; Melanoma; Migration; Rhodocetin; Proteoglycans

Lumican belongs to the small leucine-rich proteoglycan familly (SLRP) [1]. It is present in normal adult human skin as a glycoprotein with a 37 kDa core protein. Generation of knock-out mice has proven the role of lumican in the regulation of the formation of collagen fibrillar networks [2]. Lumican-lacking mice have a fragile dermis due to irregular fibrillogenesis, which might facilitate melanoma progression in the extracellular matrix (ECM). In dermal fibroblasts, *in vitro*, lumican mRNA expression decreases during aging suggesting that the impairment of SLRP synthesis might be involved in the functional alterations of aged skin [3]. In addition to the control of collagen fibril assembly, SRLPs, particularly lumican and decorin, possess antitumor activity. We previously demonstrated that lumican inhibits melanoma progression in a mouse experimental model [4]. In tumor tissues, such as breast cancer [5], lumican mRNA is detected in fibroblasts adjacent to cancer cells. Low expression levels of lumican are associated with poor outcome of invasive breast carcinoma [6].

Many cell-matrix and cell-cell interactions are implicated in the progression and growth of the tumors [7]. The roles of integrins in cell motility, invasiveness, growth, and survival of human melanoma are well established [8–10]. Murine melanoma cells express different integrins, including vitronectin and fibronectin receptors, which are involved in cell migration [11]. The expression of these integrins and their interaction with ECM macromolecules are necessary for proliferation and invasion of solid tumors [12].

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +33 326918055.

E-mail address: yanusz.wegrowski@univ-reims.fr (Y. Wegrowski).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>0006-291</sup>X/\$ - see front matter @ 2007 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.155

Receptors able to bind lumican on cancer cells are still not known. Here, we showed that human recombinant lumican core protein can inhibit migration of A375 human melanoma cells by increasing their adhesion. Moreover, we provide evidence that A375 human melanoma cells can directly interact with recombinant human lumican core protein *via*  $\beta$ 1 integrins subunits.

#### Materials and methods

*Reagents and cells.* Recombinant human lumican core protein was produced as previously described [4]. Type I collagen was prepared from rat tendon by extraction with 0.1 M acetic acid [13]. Mouse monoclonal anti-human  $\alpha 1$  (FB12),  $\alpha 2$  (P1E6),  $\alpha 3$  (P1B5),  $\alpha 4$  (P1H4),  $\alpha 5$  (P1D6),  $\alpha v$  (P3G8),  $\alpha v\beta 3$  (LM609),  $\beta 1$  (6S6), and rat monoclonal anti-human  $\alpha 6$  (GoH3) integrins were purchased from Chemicon (Souffelweyersheim,



Fig. 1. Recombinant human lumican decreases A375 melanoma cell migration and increases cell adhesion. (A) For migration,  $5 \times 10^4$  cells were seeded on Transwell<sup>®</sup> membranes previously coated with 0, 1, 5 or 10 µg of lumican. After 24 h of incubation at 37 °C, cells were stained with crystal violet. The migrated cells were counted in five random fields. (B) Adhesion of different melanoma cell lines to lumican. Cells were seeded in 24-well plates with (black bars) or without (open bars) lumican (60 µg/well). (C) Dose-dependent effect of lumican on adhesion. Cells were seeded in 96-well plates coated with increasing amounts of lumican. They were incubated for 2 h at 37 °C then gently washed with PBS and stained with WST-1 solution as described in Materials and methods. The OD was measured at 450 nm. The data are expressed as the means  $\pm$  SD from three replicates and are representative of three independent experiments. \*Significantly different from the control without lumican (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001; NS, not significant).

France). Mouse monoclonal anti-human  $\beta$ 2 integrin was purchased from Monosan (Le Perray en Yvelines, France). Isotype control IgG1 (MOPC-21) was purchased from Sigma<sup>®</sup> (Saint-Quentin Fallavier, France). Rhodocetin was purchased from The Institute of Physiological Chemistry and Pathobiochemistry, University of Münster, Germany. Human melanoma cell lines A375 (CRL-1619), HT144 (HTB-63), and murine melanoma B16F1 (CRL-6323) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured as recommanded by supplier; UACC903 were a gift from Dr. J.M. Trent (University of Michigan, Cancer Center, Ann Arbor, MI, USA) and were cultured in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS).

Cell migration. For migration assays [4], Transwell<sup>®</sup> polycarbonate membranes (8 µm pore size, 6.5 mm diameter) (Costar, Fisher Scientifique Labosi, Elancourt, France) were coated with recombinant human lumican solubilized in 18 mM acetic acid, applied to the upper surface of the membrane ( $2 \times 100 \mu$ l) and dried at room temperature. A375 cells,  $5 \times 10^4$ in 100 µl of DMEM containing 0.2% bovine serum albumin (BSA), were added to the upper chamber. The lower chamber contained 800 µl of medium with 2% BSA and 10% FBS. After incubation for 24 h at 37 °C, cells were fixed with methanol for 20 min and stained with 0.1% crystal violet for 20 min. Cells in the upper chamber were removed by cotton swab. Migrated cells were counted in five random fields at 81× magnification for every filter [14]. Each assay was performed in triplicate.

*Cell adhesion.* The 96-well plates (Dutscher, Brumath, France) were coated with lumican as above. After drying, the non-specific binding sites were blocked with 1% BSA in PBS, for 60 min at room temperature. Cells were released with 5 mM EDTA in PBS, washed once with adhesion medium (DMEM, 1% BSA), then resuspended in adhesion medium. One hundred microliters of cell suspension  $(2 \times 10^5 \text{ cells/ml})$  were plated into

96-well plates and allowed to adhere. After 2 h, cells were gently washed with PBS then covered with 10 µl of WST-1 solution (Cell Proliferation Reagent WST-1. Roche Diagnostics, Mevlan, France) in 190 ul of fresh medium and incubated for 90 min at 37 °C. The optical density (OD) of media was measured at 450 nm. To investigate the effect of EDTA and cations on adhesion, cells were preincubated for 1 h at 4 °C in culture medium containing 1% BSA with or without 10 mM EDTA or, with Dulbecco's solution containing different concentrations of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> [15,16]. Cells were then seeded in 96-well plates and incubated for 2 h at 37 °C. The unattached cells were gently removed and attached cells were washed with PBS before fixing in 1.1% glutaraldehyde in PBS for 30 min. The cells were then stained with 0.1% crystal violet for 20 min. The plates were gently washed with running distilled water and air-dried. The dye was then eluted in 200 µl of 10% acetic acid and absorbance at 560 nm was measured [17]. For adhesion blocking assay, cells  $(7 \times 10^5/\text{ml})$ were preincubated with integrin monoclonal antibodies diluted to 10 µg/ ml in PBS for 90 min at room temperature [18]. The cell suspension was adjusted to  $4 \times 10^5$  cells/ml with culture medium containing 1% BSA and 5% of FBS. Five hundred microliters of cell suspension were plated into 24-well plates previously coated with 60 µg of lumican and incubated for 2 h at 37 °C and treated with WST-1 solution as above. Results were expressed in percentage of adherent cells. Inhibition of a2 binding to lumican by rhodocetin was performed similarly to cell adhesion blocking assay. One hundred microliters of cell suspension  $(3 \times 10^5 \text{ cells})$  were plated into 96-well plates previously coated with 10 µg of lumican or BSA or 30 µg of type I collagen. Cells were incubated with or without rhodocetin (10 µg/ml) for 2 h at 37 °C. Non-bound cells were counted to determine the number of bound cells. The control without rhodocetin represented 100% of adhesion.



Fig. 2. Effect of divalent cations on A375 cells adhesion. Cells were preincubated for 1 h at 4 °C in Dulbecco's solution containing various concentrations of  $Mg^{2+}$  (A) or  $Mn^{2+}$  (B). Cells were then incubated for 2 h at 37 °C in wells coated with 10 µg/well of lumican (black bars) or on uncoated wells (open bars). Insert: effect of EDTA on cell adhesion. Cells were preincubated for 1 h with 10 mM EDTA in DMEM with 1% BSA at 4 °C then plated on lumican-coated dishes and incubated for 2 h at 37 °C. After gentle washing, adherent cells were stained with crystal violet and quantified. The values are the means of five replicates ± SD. \*Significantly different from the control (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01).

Statistical analysis. Results were expressed as means  $\pm$  standard deviation. Statistical significance between groups was assessed by unpaired Student's t test.

#### Results

### Lumican significantly decreases A375 human melanoma cells migration and promotes melanoma cell adhesion

We studied the effect of lumican on A375 cells migration by Transwell<sup>®</sup> assay. When the membrane was coated with recombinant human lumican (0, 1, 5 or 10  $\mu$ g), a significant dose–response inhibition of cell migration was observed (Fig. 1A). The cell migration was decreased by approximately 30% and 65%, compared to the control, for 5 and 10  $\mu$ g lumican, respectively.

To study the mechanism of the inhibition of melanoma migration by lumican, we performed cell adhesion assays. Lumican increased up to several fold the adhesion of different human and mouse melanoma cell lines (Fig. 1B). The adhesion increased in a dose-dependent manner (Fig. 1C). In contrast to dermal fibroblast, A375 cells did not accumulate lumican, fibronectin, and collagen I proteins in the cell layer (data not shown). Therefore, no interference could occur with these proteins in our experimental conditions. For this reason, we decided to perform further studies with this cell line.

### Effect of divalent cations and EDTA on cell adhesion to humican

Integrins are the common receptors for extracellular matrix proteins. Since integrins require divalent cations to bind ligands, we examined whether EDTA was able to inhibit cell adhesion to lumican. Adhesion of A375 cells was decreased by 76% in the presence of 10 mM EDTA (Fig. 2, insert). When A375 melanoma cells were suspended in Dulbecco's solution without Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, few cells attached on lumican-coated dishes (Fig. 2A and B). The number of attached cells increased with increasing Mg<sup>2+</sup> concentrations (Fig. 2A). Similar results were obtained with Mn<sup>2+</sup> but maximal attachment was observed with 1 mM Mn<sup>2+</sup> (Fig. 2B). Ca<sup>2+</sup> alone had no effect on cell adhesion (data not shown).

## Effect of anti-integrin antibodies on A375 human melanoma cell adhesion to lumican

A panel of monoclonal antibodies directed against human integrins was used to study cell–lumican interaction. The expression level of the integrins on A375 cells was determined using fluorescence-activated cell sorting. A375 cells expressed  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,



Fig. 3. Effect of different antibodies on A375 cells adhesion. Cells were preincubated for 90 min at room temperature with different antibodies, as indicated (A and B), then incubated for 2 h at 37 °C on lumican-coated dishes. Comparative effect of the anti- $\beta$ 1 and anti- $\alpha\nu\beta3$  antibodies (A) or of the panel of anti- $\alpha$  subunit antibodies (B) are shown. The values are the means  $\pm$  SD of three replicates. \*Significantly different from the control IgG (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).



Fig. 4. (A) Comparative effect of the anti-β1 subunit antibody on A375 cells adhesion on different substrata. (B) Concentration-dependent effect of anti-β1 subunit antibody on cell adhesion. (C) Effect of rhodocetin on cell adhesion on different substrata. Statistical analysis was the same as in Fig. 3.

 $\alpha_{v}$ ,  $\alpha_{v}\beta_{3}$ , and  $\beta_{1}$  integrins. In contrast, the  $\beta_{2}$  integrin subunit was not expressed (data not shown). As shown in Figs. 3A and 4A, A375 cell adhesion to lumican was inhibited by approximately 60–90% by the addition of anti- $\beta_{1}$  antibody. The addition of anti- $\alpha v\beta_{3}$  antibody had no significant effect. Antibodies directed to the  $\alpha_{2}$  and  $\alpha v$  subunits inhibited cell adhesion by 50%. Antibodies directed to  $\alpha_{3}$ ,  $\alpha_{4}$ , and  $\alpha_{5}$ exhibited less effect. Anti- $\alpha_{1}$  and anti- $\alpha_{6}$  antibodies were not efficient at all (Fig. 3B). The inhibition of adhesion by anti- $\beta_{1}$  antibody was more important on lumican than on classic a  $\alpha_{2}\beta_{1}$  ligand, the type I collagen (Fig. 4A). Moreover, the decrease of the adhesion on lumican was shown to be dose-dependent (Fig. 4B).

#### Rhodocetin inhibits cell adhesion to lumican

To confirm the involvement of the  $\alpha 2$  integrin subunit in the adhesion, A375 cells were incubated in the presence or absence of rhodocetin. Rhodocetin is a snake venom protein that binds specifically to  $\alpha 2\beta 1$  integrin, particularly to the A-domain of the integrin  $\alpha 2$  subunit [19], and inhibits cell adhesion to collagen [20]. As shown in Fig. 4C, rhodocetin inhibited significantly A375 cell adhesion to lumican as well as to the type I collagen.

#### Discussion

Our previous studies showed that lumican is involved in the control of melanoma progression and that this SLRP may be considered, similarly to decorin, as an anti-tumor component from the ECM [4]. In the present study, we found that lumican inhibits migration of melanoma cells through an increase of cell adhesion.

Tumor cell adhesion on ECM represents an important step in the control of the migratory process. Integrins, a family of heterodimeric transmembrane proteins, appear to be the major receptors by which cells attach to ECM and are involved in cell adhesion and migration. Our results suggest the involvement of integrin  $\beta 1$  and  $\alpha 2$  subunits in the melanoma cell adhesion to lumican.

Lumican induced the adhesion of A375 human melanoma cells in a dose-dependent manner. Using a panel of monoclonal antibodies to human integrins, we identified the integrin that binds to the lumican core protein on A375 cells as the  $\beta$ 1 integrin subunit. The blocking effect of a monoclonal antibody directed against the ß1 subunit on cell adhesion clearly indicates that the extracellular domain of the  $\beta$ 1 subunit is involved in the interaction with lumican. The role of  $\alpha 2$  integrin subunit in cell adhesion to lumican was demonstrated by specific antibodies and by rhodocetin, a specific inhibitor of the  $\alpha 2$  subunit [19]. Inhibition of the adhesion by EDTA indicated that divalent cations, especially  $Mg^{2+}$  or  $Mn^{2+}$ , were required, whereas  $Ca^{2+}$  had no effect.  $Mn^{2+}$  is a strong activator of integrins and Mg<sup>2+</sup> confers equivalent adhesiveness [21,22]. In contrast,  $Ca^{2+}$  is known to be inhibitory against many inserted (I) domain-containing integrins [22]. The I domains of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$ , and  $\alpha 11$  integrins contain a metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) that is required for coordinating the divalent cation and is essential for collagen binding [23]. As with decorin, lumican interacts with collagen, modulating the assembly of its fibrils. Since  $\alpha 2\beta 1$  is known as a collagen and decorin receptor on cell surface [24,25], we suggest that this integrin may also contribute to cell adhesion on lumican.

Our results clearly demonstrate that lumican increases the adhesion of human melanoma cells through  $\beta$ 1-containing integrin(s). Different  $\alpha$  subunits, particularly  $\alpha$ 2, could bind to  $\beta$ 1 to interact with lumican. Taken together, the increased  $\beta$ 1 integrin-mediated adhesion of melanoma cells to lumican might explain, at least in part, the antiinvasive effect of this SLRP.

#### Acknowledgments

We thank the Cancéropôle Grand Est and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité de la Marne) for their financial support. We thank Dr. R. Le Naour for flow cytometry facilities.

#### References

- R.V. Iozzo, Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function, Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 609–652.
- [2] S. Chakravarti, T. Magnuson, J.H. Lass, K.J. Jepsen, C. LaMantia, H. Carroll, Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility

and corneal opacity in the absence of lumican, J. Cell Biol. 141 (1998) 1277–1286.

- [3] B. Vuillermoz, Y. Wegrowski, J. L Contet-Audonneau, L. Danoux, G. Pauly, F.X. Maquart, Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts, Mol. Cell Biochem. 277 (2005) 63–72.
- [4] B. Vuillermoz, A. Khoruzhenko, M.F. D'Onofrio, L. Ramont, L. Venteo, C. Perreau, F. Antonicelli, F.X. Maquart, Y. Wegrowski, The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression, Exp. Cell Res. 296 (2004) 294–306.
- [5] E. Leygue, L. Snell, H. Dotzlaw, S. Troup, T. Hiller-Hitchcock, L.C. Murphy, P.J. Roughley, P.H. Watson, Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma, J. Pathol. 192 (2000) 313–320.
- [6] S. Troup, C. Njue, E.V. Kliewer, M. Parisien, C. Roskelley, S. Chakravarti, P.J. Roughley, L.C. Murphy, P.H. Watson, Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 207–214.
- [7] W. Hornebeck, H. Emonard, J.C. Monboisse, G. Bellon, Matrixdirected regulation of pericellular proteolysis and tumor progression, Semin. Cancer Biol. 12 (2002) 231–241.
- [8] L.V. Parise, J. Lee, R.L. Juliano, New aspects of integrin signaling in cancer, Semin. Cancer Biol. 10 (2000) 407–414.
- [9] T. Tsuji, Y. Kawada, M. Kai-Murozono, S. Komatsu, S.A. Han, K. Takeuchi, H. Mizushima, K. Miyazaki, T. Irimura, Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3), Clin. Exp. Metastasis 19 (2002) 127–134.
- [10] B. Felding-Habermann, E. Fransvea, T.E. O'Toole, L. Manzuk, B. Faha, M. Hensler, Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells, Clin. Exp. Metastasis 19 (2002) 427–436.
- [11] D.M. Ramos, E.D. Berston, R.H. Kramer, Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells, Cancer Res. 50 (1990) 728–734.
- [12] I.R. Hart, M. Birch, J.F. Marshall, Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis, Cancer Metastasis 10 (1991) 115–128.
- [13] K.A. Piez, E.A. Eigner, M.S. Lewis, The chromatographic separation and amino acid composition of the subunits of several Collagens, Biochemistry 2 (1963) 58–66.
- [14] W. Zhao, H. Liu, S. Xu, F. Entschladen, B. Niggemann, K.S. Zanker, R. Han, Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase, Cancer Lett. 162 (2001) S49–S55.
- [15] S. Makihira, W. Yan, S. Ohno, T. Kawamoto, K. Fujimoto, A. Okimura, E. Yoshida, M. Noshiro, T. Hamada, Y. Kato, Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin alpha1beta1, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11417–11423.
- [16] R. Garnotel, L. Rittie, S. Poitevin, J.C. Monboisse, P. Nguyen, G. Potron, F.X. Maquart, A. Randoux, P. Gillery, Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95), J. Immunol. 164 (2000) 5928–5934.
- [17] H. Wang, T.B. Ng, V.E. Ooi, W.K. Liu, Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines, Int. J. Biochem. Cell Biol. 32 (2000) 365–372.
- [18] J.O. Humtsoe, S. Feng, G.D. Thakker, J. Yang, J. Hong, K.K. Wary, Regulation of cell-cell interactions by phosphatidic acid phosphatase 2b/VCIP, EMBO J. 22 (2003) 1539–1554.
- [19] J.A. Eble, D.S. Tuckwell, The alpha2beta1 integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin alpha2 subunit proximal to the collagen-binding site, Biochem. J. 376 (2003) 77–85.
- [20] J.A. Eble, B. Beermann, H.J. Hinz, A. Schmidt-Hederich, alpha2betal integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and

potent inhibitor of cell adhesion to collagen, J. Biol. Chem. 276 (2001) 12274–12284.

- [21] R. Knorr, M.L. Dustin, The lymphocyte function-associated antigen 1 I domain is a transient binding module for intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and ICAM-3 in hydrodynamic flow, J. Exp. Med. 186 (1997) 719–730.
- [22] M. Shimaoka, J. Takagi, T.A. Springer, Conformational regulation of integrin structure and function, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 31 (2002) 485–516.
- [23] J.K. Kim, Y. Xu, X. Xu, D.R. Keene, S. Gurusiddappa, X. Liang, K.K. Wary, M. Hook, A novel binding site in collagen type III for integrins alpha1beta1 and alpha2beta1, J. Biol. Chem. 280 (2005) 32512–32520.
- [24] S.A. Santoro, Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen, Cell 46 (1986) 913–920.
- [25] G. Guidetti, A. Bertoni, M. Viola, E. Tira, C. Balduini, M. Torti, The small proteoglycan decorin supports adhesion and activation of human platelets, Blood 100 (2002) 1707–1714.

# Expression of lumican, a small leucine-rich proteoglycan with antitumour activity, in human malignant melanoma

# S. Brézillon, L. Venteo,\* L. Ramont, M.-F. D'Onofrio, C. Perreau, M. Pluot,\* F.-X. Maquart, and Y. Wegrowski

Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology and \*Laboratory of Anatomy and Histopathology, Faculty of Medicine, University of Reims, Reims cedex, France

#### **Summary**

**Background.** The family of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs), which includes decorin, lumican, biglycan and fibromodulin, constitutes an abundant component of the skin extracellular matrix. We previously demonstrated that human lumican inhibits melanoma growth and progression in a mouse experimental model, by regulating cell migration, proliferation and apoptosis.

**Aim.** The aim of this study was to investigate the expression of lumican and decorin in human malignant melanoma and adjacent peritumoral tissue, to understand better their role in the control of growth and invasion of human melanoma.

**Methods.** Expression of both proteoglycans was studied by immunohistochemistry using specific antibodies in 34 malignant melanomas, 12 Hutchinson's melanotic freckles and 4 cutaneous metastatic melanomas.

**Results.** We showed that lumican and decorin are located in the dermis and in the peritumoral stroma of malignant melanoma, but are not found in melanoma cells or dense tumour tissue. In the healthy dermis, distant from the tumour, the increasing ratio of lumican to decorin was inversely correlated with the proliferation of the tumour cells (P = 0.035). The comparison of the level of expression of lumican protein in superficial vs. nodular subtypes of malignant melanomas showed a decrease of lumican but not decorin in the peritumoral stroma of nodular subtypes. In the peritumoral stroma, the level of expression of lumican but not decorin decreased significantly (P = 0.016) with increasing Clark levels. In addition, immunocytochemical and reverse transcription PCR analyses of malignant melanoma cell lines (A-375, HT-144) and of MRC-5 and dermal fibroblasts from healthy donors *in vitro* confirmed that dermal fibroblasts are responsible for lumican and decorin synthesis in skin.

**Conclusions.** Lumican may regulate vertical progression of human malignant melanoma, but further study is necessary to clarify the antitumour mechanism and the downstream signal transduction pathways involved.

#### Introduction

Correspondence: Dr Stéphane Brézillon, PhD, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6198, Faculté de Médecine, 51 rue Cognacq Jay, 51 095 Reims cedex, France. E-mail: stephane.brezillon@univ-reims.fr

Conflict of interest: none declared

Accepted for publication 10 February 2007

In the vertical phase of malignant melanoma growth, the cells acquire the capacity to penetrate the papillary dermis, forming expansive, aggressive nodules. In the dermis, melanoma cells contact the extracellular matrix (ECM) and induce a stromal reaction. The quality and integrity of the ECM can influence tumour growth and progression and its capacity for metastasis.<sup>1</sup>

The dermal ECM is composed of several types of collagen, connective tissue glycoproteins (including fibronectin, tenascin and thrombospondin), hyaluronan and proteoglycans. The family of small leucin-rich proteoglycans (SLRPs), which includes decorin, lumican, biglycan and fibromodulin, constitutes an abundant component of skin ECM.<sup>2–6</sup>

Lumican contains four major domains: (i) a signal peptide of 16 residues; (ii) a negatively charged *N*-terminal domain containing sulphated tyrosine and disulphide bond(s); (iii) a signature characteristic for the SLRP family, the leucine-rich repeats domain (LXXLXLXXNXLSLXL)<sub>10</sub>, mediating the binding of lumican to other components such as collagen; and (iv) a C-terminal domain of 50 amino acids containing two conserved cysteines.<sup>7</sup> The core protein adopts a unique horseshoe or arch conformation, which favours protein–protein interaction.<sup>2,8</sup> Lumican has been shown to carry attached keratan sulphate in corneal stroma or with nonsulphated polylactosamine chain in tumour stroma.<sup>9</sup>

Lumican is present in normal adult human skin in the form of a glycoprotein with a 38-kDa core protein.<sup>9</sup> Generation of knockout mice has proven the role of lumican in the regulation of the formation of the collagen fibrillar network.<sup>8</sup> Mice lacking in lumican show fragile dermis due to irregular fibrillogenesis, which can facilitate melanoma progression in the ECM. In dermal fibroblasts *in vitro*, lumican mRNA expression decreases during ageing, thus impairment of SLRP synthesis may be involved in the functional alterations of aged skin.<sup>6</sup>

Decorin expression has been widely described in several tissues. It has been shown in normal adult human skin, where it is the most abundant SLRP.<sup>4,6</sup> Decorin shares similar functions to lumican. Analogous to lumican-null mice, decorin-null mice also exhibit skin fragility and impaired collagen fibrillogenesis.<sup>10</sup>

In addition to the control of collagen fibril assembly, SLRPs seem to have other important functions in the skin. In particular, lumican and decorin possess antitumour activity. We previously demonstrated that human lumican inhibits melanoma growth and progression in a mouse experimental model by regulating cell migration, proliferation and apoptosis.<sup>5</sup> Decorin is able to decrease cell proliferation directly by reducing cyclin-dependent kinase activity, thus blocking cell division.<sup>11</sup> Decorin is also able to bind transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , modulating TGF- $\beta$  activity in skin.<sup>9</sup>

Although the presence of lumican and decorin in skin and their influence on dermal integrity is well established, there are no data on the presence of lumican and decorin in benign lesions of the skin, such as Hutchinson's melanotic freckles (HMF), and in malignant pathologies such as human malignant melanoma.

The aim of this study was to analyse the immunohistochemical distribution of human lumican and decorin, two SLRPs of the ECM with antitumour activity, in human malignant melanomas and in benign lesions of the skin, to understand better their role in the control of growth and invasion of human melanoma cells.

We found that lumican and decorin are located in the dermis and in the peritumoral stroma of malignant melanomas but not in melanoma cells. In the healthy dermis, distant from the tumour, the increasing ratio of lumican to decorin was inversely correlated with proliferation of the tumour cells (P = 0.035). Interestingly, comparison of the level of expression of lumican protein in superficial vs. nodular subtypes of malignant melanomas showed a decrease in levels of lumican but not decorin in the peritumoral stroma of nodular subtypes, suggesting that lumican may regulate melanoma vertical progression.

In the peritumoral stroma, the level of expression of the two SLRPs was variable and was not correlated with the BI; however, expression of lumican but not decorin decreased significantly (P = 0.016) with increasing Clark levels.

In addition, immunocytochemical and RT-PCR analyses *in vitro* confirmed that dermal fibroblasts, not melanoma cells, are responsible for synthesis of lumican and decorin in skin.

### Materials and methods

#### Source and histology of tissues

Control skin was obtained from seven healthy patients undergoing surgery for dermolipectomy. Pathological tissues, used for routine diagnosis, were obtained from 34 patients undergoing surgery for primary malignant melanoma, 12 patients with HMF, and 4 patients with cutaneous metastatic melanoma. Of the malignant melanomas, 16 were classified as superficial spreading melanomas (SSM), 10 as nodular melanomas (NM), 7 as lentigo malignal melanomas (LMM), and as acral lentiginous melanoma (ALM). Serial sections of paraffin wax-embedded tissues were stained with haematoxylin and eosin. Melanomas were characterized by the thickness (Breslow Index; BI) and depth of tumour invasion (Clark level). Table 1 lists the characteristics of the specimens, the location and subtype of melanoma, age

Table 1 Sources, histology of the skin and prote	ein expression of lumican and decorin.
--	--

			Age		BI	Clark		Lumican		Decorin		Lumica Decori	an/ n ratio
Specimen	Subtype	Location	(years)	Gender	(mm)	level	PR	E/D	T/periT	E/D	T∕periT	D	PeriT
Normal skir	ı												
Case 1	_	Abdomen	45	F	—	—	0.215	-/+	—	-/+	—	1	_
Case 2	_	Abdomen	38	F	—	—	0.165	-/+	—	-/+	—	1	_
Case 3		Abdomen	32	F		—	0.095	-/+	_	-/+		1	_
Case 4		Abdomen	57	F		—	0.165	-/+	_	-/++		0.5	_
Case 5	_	Abdomen	51	F	—	—	0.145	-/+	_	-/++	_	0.5	—
Case 6		Abdomen	50	F		—	0.085	-/+	_	-/+		1	_
Case 7	_	Abdomen	38	F	_	—	0.065	-/+	_	-/+++	_	0.3	—
Malignant r	melanoma												
Case 1	SSM	Back	41	F	0.42	II	0.338	-/+++	-/++	-/+	-/+	3	2
Case 2	SSM	Leg	50	F	0.50	II	0.015	-/+	-/+	-/+++	-/+++	0.33	0.33
Case 3	SSM	Leg	63	F	1.15		0.025	-/++	-/++	-/++	-/++	1	1
Case 4	SSM	Back	34	F	1.60		0.125	-/+	-/+	-/+	-/+	1	1
Case 5	SSM	Leg	30	F	0.75	III	0.392	-/+++	-/+	-/+	-/+	3	1
Case 6	SSM	Abdomen	52	M	0.85		0.095	-/+	-/+	-/+	-/+	1	1
Case 7	SSM	Leg	51	F	0.90	III	0.020	-/+	-/+	-/++	-/++	0.5	0.5
Case 8	SSM	Back	32	M	1.00	III 	0.045	-/+	-/+	-/++	-/++	0.5	0.5
Case 9	SSM	Back	59	F	1.45	III 	0.185	-/+	-/+	-/+	-/+	1	1
Case 10	SSM	Shoulder	33	F	1.60	III 	0.294	-/+	-/+	-/+	-/+	1	1
Case 11	SSM	Leg	/2	F	1.68		0.080	-/++	-/++	-/+++	-/+++	0.75	0.66
Case 12	SSM	Leg	46	F	2.20		0.384	-/++	-/++	-/+	-/+	2	2
Case 13	SSM	Back	69	+	3.80	III	0.212	-/+++	-/+	-/++	-/++	1.5	0.5
Case 14	SSIVI	Abdomen	/2	M	1.80	IV	0.110	-/+	-/+	-/++	-/++	0.5	0.5
Case 15	SSIVI	Leg	69	IVI F	3.28	IV	0.155	-/+	-/+	-/+	-/+	1	1
Case 16	SSIVI	Leg	81	F	4.20	IV	0.210	-/+	-/+	-/+	-/+	1	1
Case 17	NM	Arm	65	F	1.78		0.155	-/++	-/++	-/++	-/++	1	1
Case 18	NM	Cheek	82	F	4.00	III N/	0.480	-/++	-/++	-/++	-/++	1	1
Case 19		Leg	61	F	1.30	IV	0.236	-/+	-/+	-/++	-/+	0.5	1
Case 20		Arm	97 72	F	3.20	IV N/	0.538	-/+	-/+	-/+	-/+		1
		Cheek	73	r r	3.08	IV NZ	0.330	-/++	-/+	-/+++	-/+++	0.75	0.55
		BULLOCK	30 66		5.50	IV N/	0.268	-/++	-/+	-/+	-/+		
Case 25		Arm	00		14.0		0.205	-/+	-/+	-/++	-/++	0.5	0.5
		Ann	04 70		14.0		0.550	-/+	-/+	-/++	-/++	0.5	0.5
Case 25		Chook	79 05		12.0	V	0.195	-/++	-/+	-/+	-/+	۲ 1	
Case 20		Log	<u>80</u>	г с	0.05	v	0.233	-/++	-/+	-/++	-/++	1	1
Case 27		Leg	00 87	Г Г	1 00		0.150	-/++	-/++	-/++	-/++	1	1
		Eoot	80	л М	0.00		0.115	-/ + +	-/ ++	-/ + +	-/ ++	1	1
		Back	79	M	0.90		0.095	-/++ _/+	-/++ -/+	-/++ _/++	-/++ -/++	0.5	0.5
		Cheek	75	F	1.00		0.174	_/+	_/+ _/++	_/++ _/++	_/++ _/++	1	1
		Cheek	88	F	2 20	III I\/	0.015	_/ + +	_/++ _/+	_/ ++ _/+	_/++ _/+	1	1
Case 33		Far	61	F	2.20	V	0.005	-/+	_/+ _/+	_/+ _/+++	_/+	033	033
Case 34		Foot	87	F	5.00	Ŵ	0.105	-/++	-/++	_/+	-/+	2	2
Hutchinson	's melanotic	r freckle	07		5.00		0.502	/ 11	/ 11	7.1	/ 1	2	2
Case 1		Cheek	72	F			_	_	0 194	-/+	-/+	1	
Case 2		Chin	73	F		_	_	_	0.134	_/+	_/++	05	
Case 3	_	Nose	56	F	_	_	_	_	0.268	-/++	-/++	1	_
Case 4	_	Face	85	F	_	_	_	_	0 344	-/+	-/++	0.5	_
Case 5	_	Cheek	61	F	_	_	_	_	0.070	-/+	-/+	1	_
Case 6	_	Cheek	74	F	_	_	_	_	0.080	-/+	-/+++	0.33	_
Case 7	_	Noose	82	F	_	_	_	_	0.155	-/++	-/++	1	_
Case 8	_	Head	52	F	_	_	_	_	nd	-/+	-/++	0.5	_
Case 9	_	Face	78	М	_	_	_	_	0.090	-/+	-/+++	0.33	_
Case 10	_	Cheek	68	F	_	_	_	_	0.035	-/++	-/+++	0.66	—

			٨٩٥		DI	Clark		Lumica	an	Decorin		Lumicar Decorin	n/ ratio
Specimen	Subtype	Location	(years)	Gender	(mm)	level	PR	E/D	T/periT	E/D	T∕periT	D	PeriT
Case 11	_	Cheek	42	М	_	_		_	ND	-/+	-/++	0.5	_
Case 12	_	Cheek	85	F	_	_	_	_	0.04	-/++	-/+++	0.66	_
Cutaneous	metastatic n	nelanoma											
Case 1	_	Heel	64	F	_	_	_	_	0.398	-/-	-/-	_	_
Case 2	_	Armpit	77	F	_	_	_	_	0.325	-/-	-/-	_	_
Case 3	_	Leg	73	F	_	_	_	_	0.240	-/-	-/-	_	_
Case 4	_	Leg	76	Μ	—	—			0.350	-/-	-/-	—	—

BI, Breslow index; PR, proliferation rate; SSM, superficial spreading melanoma; NM, nodular melanoma; LMM, lentigo malignant melanoma; ALM, acral lentiginous melanoma; ND: not done; E/D, epidermis/dermis; T/periT, tumour/peritumoral stroma. Patterns: - = no positivity (score 0); + = presence (score 1); ++ = moderate labelling (score 2); +++ = extensive labelling (score 3).

and gender of the patients, BI and Clark level of the cases. The percentage of cells positive for Ki-67, which reflects the proliferation rate of the cells (Table 1), was calculated on a total number of 200 cells within (i) the epidermis of normal skin, (ii) the junctional region of HMF and (iii) the most positive areas of the malignant melanomas.

Tissue collection was performed according to the rules prescribed by the ethics committee of the Centre National de la Recherche Scientifique.

#### Immunohistochemistry

Tissue samples were fixed in buffered formaldehyde at pH 7.0, embedded in paraffin wax and cut into at 3-µm sections. After dewaxing, the sections were treated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 minutes at room temperature to block endogenous peroxidase. The slides were heated in a pressure cooker in 10 mmol/L sodium citrate buffer (pH 6.0) for 1.5 min, then washed in phosphate-buffered saline (PBS). Several primary antibodies raised against lumican, decorin, HMB45 and protein S-100 (melanoma cell markers), CD68 (macrophage marker), Ki-67 (cellcycle marker) and cytokeratins were used. Immunohistochemistry for lumican was performed using an antibody dilution of 1 : 200. This antibody is a rabbit polyclonal antibody raised against a synthetic human lumican peptide (17 amino acids: YLDNNKISNIPDEYFKR). The specificity of this antibody was checked by Western blotting on total protein extracts from human dermal fibroblasts in comparison with a reference lumican polyclonal antibody raised against the carboxyterminal region of the core protein region (kindly provided by Dr P. Roughley, Genetics Unit, McGill University, Montreal, Canada). This antibody was used and its quality checked in our previous work.<sup>5</sup>

For decorin, a mouse monoclonal antibody raised against human decorin (MAB143, clone 115402, dilution 1 : 2000; R & D systems, Lille, France) was used. The two antibodies were incubated overnight at 4 °C. A standard avidin–biotin peroxidase complex technique was performed (Vectastain ABC Elite; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), with NovaRED<sup>TM</sup> (Vector Laboratories) as chromogen. Sections were counterstained with Harris' haematoxylin solution and mounted.

Immunohistochemistry for HMB45 (ready to use; Immunotech, Marseille, France), protein S-100 (ready to use; Ventana, Tucson, USA), CD68 (1 : 200, clone KP1; Dako, Glostrup, Denmark), Ki-67 (1 : 50, clone Mib1; Dako) and a large spectrum of cytokeratins (1 : 50, clone KL1; Immunotech) was also performed on the same samples. Immunostaining was performed using a labelled streptavidin–biotin technique according to the manufacturer's instructions (Ventana ES instrument; Ventana Medical System, USA). Primary antibodies were incubated for 32 min at 37 °C, and 3-amino-9-ethylcarbazole (Laboratory Vision Corporation, Suffolk, UK) was used as chromogen.

Three types of negative controls for lumican staining were used. The tissue sections were incubated: (i) without primary antibody in PBS and 1% bovine serum albumin, (ii) with nonimmune rabbit serum and (iii) with the lumican antibody blocked by preincubation with the synthetic lumican peptide YLDNNKISNIPDEYFKR at 40  $\mu$ g/mL overnight at 4 °C. Incubation with nonimmune mouse IgG1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used as negative control for the decorin, HMB45, CD68, Ki-67, and cytokeratin stains.

Immunostaining pictures were captured using a digital camera. Expression of SLRPs expression was

	n	Age (years)	Female gender	Bl (mm)	Clark level	PR	Lumican score	Decorin score	Lumican / Decorin ratio
Normal skin	7	44.4 ± 8.9	7	N/A	N/A	0.1 ± 0.1	1 ± 0	1.6 ± 0.9	0.8 ± 0.3
MM	34	$65.6 \pm 19.8^{a}$	26	2.9 ± 3.1 <sup>gi</sup>	3.3 ± 0.9 <sup>bi</sup>	$0.2 \pm 0.1^{cgh}$	1.6 ± 0.7 (D);	1.7 ± 0.7 (D) <sup>a</sup> ;	1.1 ± 0.7 (D) <sup>c</sup> ;
							1.8 ± 0.5 (PT) <sup>b</sup>	1.7 ± 0.7 (PT)	0.9 ± 0.4 (PT)
SSM	16	53.4 ± 16.5 <sup>d</sup>	12	1.7 ± 1.1	2.9 ± 0.7	$0.2 \pm 0.1^{eh}$	1.5 ± 0.8 (D);	1.6 ± 0.7 (D);	1.2 ± 0.8 (D);
							1.3 ± 0.5 (PT)	1.6 ± 0.7 (PT)	0.9 ± 0.5 (PT)
NM	10	73.2 ± 19.5 <sup>d</sup>	8	5.5 ± 4.6	$4.0 \pm 0.7$	$0.3 \pm 0.1^{fh}$	1.6 ± 0.5 (D);	1.8 ± 0.6 (D);	1.0 ± 0.6 (D);
							1.2 ± 0.4 (PT)	1.7 ± 0.7 (PT)	0.8 ± 0.3 (PT)
LMM	7	79.4 ± 10.2 <sup>d</sup>	5	1.4 ± 0.6	3.1 ± 1.1	0.1 ± 0.1 <sup>eh</sup>	1.6 ± 0.5 (D);	$2.0 \pm 0.6$ (D); 2.0 \pm 0.6 (PT)	0.8 ± 0.3 (D);
ALM	1	87	1	5	3	0.4	2.0 (D): 2.0 (PT)	1.0 (D): 1.0 (PT)	2.0 (D): 2.0 (PT)
HMF	12	69 ± 13.7	10	N/A	N/A	$0.2 \pm 0.1^{ef}$	$1.3 \pm 0.5$	$2.2 \pm 0.7$	$0.7 \pm 0.3$
CMM	4	72.5 ± 5.9	3	N/A	N/A	$0.3 \pm 0.1^{e}$	0	0	N/A

Table 2 Histological data and qualitative mean scoring of the protein expression of lumican and decorin.

ALM, acral lentiginous melanoma; BI, Breslow index; CMM, cutaneous metastatic melanoma; D, dermis; HMF, Hutchinson's melanotic freckle; LMM, lentigo malignant melanoma; MM, malignant melanoma; N/A, not applicable; NM, nodular melanoma; PR, proliferation rate; PT, peritumoral stroma; SSM, superficial spreading melanoma. SLRP score: no positivity, score 0; presence, score 1; moderate labelling, score 2; extensive labelling, score 3. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. <sup>a</sup>Significant (P < 0.05) positive correlation was found between the level of decorin expression in the healthy distant dermis and the increasing age of the patients; <sup>b</sup>the decrease of the lumican expression (from lumican score 2 to 1) was significantly (P = 0.016) correlated with the increase of the Clark level from II to IV, and similar significant (P = 0.026) decrease of lumican expression (from lumican score 2 to 1) was correlated with an increase of the Clark level from III to IV; <sup>c</sup>in the healthy dermis, distant from the tumour, the increased ratio of lumican to decorin was inversely correlated with the proliferation of the tumour cells (P = 0.035); <sup>d</sup>the mean age of patients with SSM was significantly lower than those with NM (P = 0.01) or with LMM (P = 0.025) or with LMM (P = 0.001), but not with NM; <sup>f</sup> the proliferation rate of HMF was significantly different (P = 0.02) from patients with NM but not from those with SSM or LMM; <sup>g</sup> the proliferation rate was significantly and positively correlated with the type of melanoma (P = 0.04). <sup>b</sup>BI and Clark levels were significantly and positively correlated (P = 0.002).

graded by two independent pathologists [- = no positivity (score 0); + = presence (score 1); ++ = moderatelabelling (score 2); +++ = extensive labelling (score 3)](Tables 1 and 2). The number of patients in everycategory was used for statistical analysis. This classicsemiquantitative technique was found to be the onlymethod appropriate to evaluate the intensity of thestaining in the ECM.<sup>12</sup> Quantitative image-analysissoftware was not efficient enough to evaluate theextracellular staining.

#### Cell cultures and immunocytochemistry

Primary cultures of dermal fibroblasts were established from skin biopsies from unaffected donors as described by Vuillermoz *et al.*<sup>6</sup> MRC-5 human embryonic lung fibroblasts, HT-1080 dermal fibrosarcoma cells and A-375 human melanoma cells were obtained from the American Tissue Culture Collection (ATCC; Rocheville, MD, USA) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The HT-144 human melanoma cell line was obtained from ATCC and was grown in McCoy's medium (Invitrogen). Media were supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and penicillin–streptomycin (100U/mL). Cells were routinely passaged with phosphate buffered saline–EDTA, pH 7.4, containing 0.25% (w/v) trypsin.

For immunocytochemical studies, cells were grown on sterile coverslips in a 12-well culture plate until 80% confluence. Cells were incubated at 4 °C overnight with rabbit polyclonal antibody directed against human lumican or mouse monoclonal antibody raised against human decorin. Horseradish peroxidase-conjugated donkey antirabbit or antimouse antibodies (Amersham International, Buckinghamshire, UK) were used at a dilution of 1 : 200, and a commercial kit (NovaRED<sup>TM</sup>; Vector Laboratories), which gives a dark-red precipitate, used for colour development. Cells were counterstained with Harris' haematoxylin solution. Immunostaining pictures were captured using a digital camera.

#### **RT-PCR** analyses

RNA isolation from dermal fibroblasts of skin biopsies from unaffected donors, MRC-5 human embryonic lung

	Sense (5'-3')	Antisense (5'–3')			
Lumican	CCTGGTTGAGCTGGATCTGT	TATCCGGTGGAAGACTGGTT			
Decorin	AGCTGAAGGAATTGCCAGAA	TGGTGCCCAGTTCTATGACA			
GADPH	ACGGATTTGGTCGTATTGGG	CGCTCTAGGGAGGTTTTAGT			

fibroblasts, HT-1080 dermal fibrosarcoma cells, HT-144 human melanoma cell line and A-375 human melanoma cells was performed using a commercial kit (Qiagen RNeasy<sup>TM</sup>; Qiagen, Courtaboeuf, France) in accordance with the manufacturer's instructions. Total RNA treated with 1  $\mu$ g of DNase I was used to prepare cDNA by reverse transcription.

The human lumican or decorin cDNA was amplified by PCR together with the GAPDH cDNA for 32 cycles. Table 3 shows the primers used. The denaturation step was 2 min at 94 °C. The amplification step was 32 cycles of 92 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for a time depending on the fragment length. Product specificity was evaluated by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

#### Statistical analysis

In order to investigate the relationship between expression of SLRPs and patient's age, BI, Clark level and malignant melanoma subtype (SSM, NM, LMM), patients with malignant melanomas were grouped as follows: (i) for age, patients were grouped as 'young adults' (30–55 years, n = 10), 'confirmed adults' adults' (56-75 years, n = 12). and 'senior (76–97 years, n = 12); (ii) for BI, patients were grouped according to the TNM (tumour, node, metastasis) staging system, with BI of < 1 mm (n = 8), 1-2 mm (n = 12), 2-4 mm (n = 8), and > 4 mm (n = 12)6); (iii) for Clark level, the four groups were levels II (n = 6), III (n = 15), IV (n = 10) and V (n = 3); (iiii) for subtypes of malignant melanoma, the three groups were SSM (n = 16), NM (n = 10) and LMM (n = 7). Expression of lumican and decorin in malignant melanomas was also compared with the number of tumour cells positive for Ki-67, considered an indicator of poor prognosis. Patients were grouped according to the proliferation rate with a fixed threshold of 0.2%, as follows: < 0.2% (n = 19) and > 0.2% (n = 15). To investigate the relationship between expression of SLRPs and patient's age in HMF specimens, patients were grouped as 'adults' (42–68 years, n = 5) and 'seniors' (72–85 years, n = 7). A fixed proliferation rate threshold of 0.2% was also used to compare expression of SLRPs. The proliferation rate was also compared between the junctional region of HMF and the most **Table 3** Primers used for cDNA amplification.

positive areas of malignant melanomas or cutaneous metastatic melanomas.

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and are summarized in Table 2. Statistical analysis of the data was performed using the nonparametric Fisher's exact test in tables of four boxes, which required pooling of nonsignificantly different groups. Differences were considered significant at P < 0.05.

#### Results

#### Histopathological findings

Melanoma cell invasion through the papillary dermis and extension to the reticular dermis were found in all patients with melanoma. BI varied from 0.5 to 14 mm and Clark level varied from II to V. The percentage of tumour cells positive for Ki-67 varied from 1.5% to 53.8% (Table 1).

#### Lumican and decorin expression in skin

Lumican and decorin proteins were detected in the papillary and reticular dermis. Lumican (Fig. 1a) and decorin (Fig. 1b) were detected in the dermis with normal histology in the seven healthy patients and the 12 patients with HMF. Expression of both lumican and decorin was higher in the papillary than in the reticular dermis. The epidermis exhibited strong expression of cytokeratins (Fig. 1c), whereas neither lumican nor decorin was detected. None of the negative controls [primary antibody omitted (Fig. 1d), lumican antibody blocked by the synthetic lumican peptide (Fig. 1e), and incubation with nonimmune rabbit serum (data not shown)], stained positively. The nuclei of proliferative basal cells of the epidermis stained positively for Ki-67 (Fig. 1f).

### Lumican and decorin in the peritumoral stroma of malignant melanoma

Both lumican (Fig. 1g) and decorin (Fig. 1h) were detected in the peritumoral stroma of all patients with malignant melanoma. High levels of lumican expression were found in the stromal margin all around the tumour (Fig. 1g), but neither lumican nor decorin



**Figure 1** Immunohistochemical distribution of lumican and decorin in the dermis of the human normal skin and in the peritumoral stroma of human malignant melanoma. (a–f) Skin sections with normal histology were stained with antibodies directed against (a) lumican, (b) decorin, and (c) cytokeratins. Negative controls for lumican staining were prepared by (d) omitting the primary antibody, or (e) by blocking the lumican antibody with a synthetic lumican peptide. (f) Nuclei of proliferative cells were labelled with Ki-67. (g–l) Biopsies were taken from tumoral skin of a patient with malignant melanoma (patient 34) with high Breslow index (5). Skin sections were stained with antibodies directed against (g) lumican, (h) decorin, (i) HMB45 (melanoma cell marker) and (j) CD68 (macrophage marker). Negative controls for lumican staining were prepared by (k) blocking the lumican antibody with a synthetic lumican peptide. (l) Nuclei of proliferative cells were labelled with Ki-67. Results are representative of staining performed on biopsies from 34 malignant melanoma patients. E, epidermis; D, dermis; P, papillary dermis; R, reticular dermis; T, tumour. Scale bar: (a–f, h, i, l) 50 µm; (g, j, k) 100 µm.

positivity was observed within the tumour. Melanoma cells were detected immunologically using the melanoma cell markers HMB45 (Fig. 1i) and S-100 protein (data not shown). CD68-positive macrophage cells were preferentially located around the tumour (Fig. 1j). None of the negative controls [primary antibody omitted, lumican antibody blocked by the synthetic lumican peptide (Fig. 1k), and incubation with nonimmune rabbit serum (data not shown)], stained positively. Ki-67 staining was positive in the nuclei of numerous proliferative cells within the melanoma nodules (Fig. 1f). Lumican and decorin were present in the dermis, but not in the epidermis. Their expression in the dermis was highly variable between patients, both those

with malignant melanoma and those with HMF. Lumican and decorin were detected in the peritumoral stroma of all patients with malignant melanoma, but not within the tumour mass. All negative controls showed no significant staining. Similar results were obtained for cutaneous metastatic melanoma (data not shown). The immunohistochemical results are summarized in Table 1.

## Analysis of lumican and decorin expression correlated with patient age

Melanoma patients were grouped as described above. Significant (P < 0.05) positive correlation was found between the level of expression of decorin in the healthy distant dermis and increasing age of the patients. The mean age of patients with SSM  $(53.4 \pm 16.5)$  was significantly lower than that of patients with NM  $(73.2 \pm 19.5; P = 0.01)$  and patients with LMM  $(79.4 \pm 10.2; P = 0.02)$ . Patient age was not found to be correlated with lumican expression in the distant normal dermis or around the tumour and the melanoma, nor was any correlation observed between expression of SLRP or age of patients with HMF (69  $\pm$  13.7). No SLRP expression was observed in cutaneous metastatic melanomas of patients with a mean age of 72.5  $\pm$  5.9 (Table 2).

#### Analysis of lumican and decorin expression correlated with BI, Clark level, melanoma subtype and proliferation rate

Representative lumican, decorin and Ki-67 staining for extreme values of BI, Clark level and proliferation rate are illustrated in Figure 2.

The BI has been shown to be a strong prognostic factor in melanoma. Melanoma patients were grouped for BI as stated above. No significant correlation was found between the BI and the level of expression of lumican or decorin protein in the healthy dermis (Fig. 2a,b) and at the tumour margin (Fig. 2d,e).

Melanoma patients grouped as Clark levels II–V, as described above, were compared with regard to expression of lumican and decorin. Interestingly, in the peritumoral stroma, expression of lumican (Fig. 2d), but not decorin (Fig. 2e), decreased with increasing Clark level, reflecting the vertical progression of the tumour. This was less indicative for prognosis than the BI. More precisely, the decrease of lumican expression (from lumican score 2 to 1) was significantly (P = 0.016) associated with increase in Clark level from II to IV. A similar significant (P = 0.026) decrease of lumican expression (from Lumican score 2 to 1) was associated with an increase in Clark level from III to IV.

Lumican and decorin expression in malignant melanoma was also compared with the number of tumour cells positive for Ki-67 (Fig. 2c,f), considered an indicator of poor prognosis. In the healthy dermis, distant from the tumour, the increasing ratio of lumican to decorin was inversely correlated with tumour cell proliferation (P = 0.035) (Fig. 2f). These data suggest that decreased expression of lumican at the tumour margin might allow proliferation of the tumour cells.



**Figure 2** Lumican and decorin expression in the dermis of human malignant melanoma correlated with Breslow index, Clark level and proliferation rate. Representative skin sections showing dermis from melanoma patients with (a–c) low and (d–f) high Breslow index, Clark level and proliferation rate. Breslow index: (a–c) 0.5 mm, (d–f) 14 mm. Clark level: (a–c) II, (d–f) IV. Proliferation rate: (a–c) 0.015, (d–f) 0.330. Skin sections were stained with antibodies directed against (a, d) lumican, (b, e) decorin and (c, f) Ki-67 (cell proliferation marker). T, tumour). Scale bar: (a–f) 50  $\mu$ m.

Cutaneous metastatic melanomas, in which no SLRPs were detected, presented a significantly (P = 0.02) higher proliferation rate ( $0.328 \pm 0.07$ ) than HMF ( $0.160 \pm 0.12$ ), in which expression of the two SLRPs was variable. The rate was also higher than that of SSM ( $0.168 \pm 0.13$ ; P = 0.025) and LMM ( $0.114 \pm 0.06$ ; P = 0.001), but not higher than that of NM.

The proliferation rate of HMF was significantly different (P = 0.02) from that of NM (0.303 ± 0.12) but not from that of SSM or LMM. It was not correlated with the Clark level or patient age. However, the proliferation rate was significantly and positively correlated with the BI (P = 0.002) and the type of melanoma (P = 0.04). BI and Clark levels were significantly and positively correlated with each other (P = 0.002).

In addition, in the peritumoral stroma, comparison of the level of lumican expression in SSM (n = 16) vs. NM (n = 10) of malignant melanomas showed a decrease in lumican, but not decorin in NM, suggesting that lumican may regulate vertical progression of melanomas.

The qualitative scoring of lumican and decorin expression according to the various factors (BI, Clark level, proliferation rate) are summarized in Table 2.

## Lumican and decorin proteins are detectable in dermal fibroblasts but not in tumour cells *in vitro*

*In vitro*, neither lumican (Fig. 3f) nor decorin (Fig. 3h) staining was observed in highly metastatic A-375 melanoma cells. Faint staining of lumican or decorin could be detected in HT-144 melanoma cells and HT-1080 fibrosarcoma cells (data not shown).

In contrast, lumican and decorin were strongly expressed *in vitro* by normal dermal fibroblasts (Fig. 3b,d). These results suggest that peritumoral fibroblasts, rather than tumour cells, are responsible for the lumican expression that we observed around the tumour mass in malignant melanomas. Embryonic lung MRC-5 fibroblasts were also strongly positive for lumican and decorin (data not shown). All negative controls showed no significant staining.

# Reverse transcriptase PCR analysis of lumican and decorin transcripts in dermal fibroblasts and in tumour cells

We investigated lumican and decorin transcripts expression by reverse transcriptase PCR (Fig. 4). No signal was found in A-375 melanoma cells. Traces of







**Figure 4** Reverse transcriptase (RT) PCR analysis of lumican and decorin transcripts in dermal fibroblasts and in tumour cells. RT-PCR was performed in HT-1080 fibrosarcoma cells, in embryonic lung MRC–5 fibroblasts, in dermal fibroblasts, in A-375 melanoma cells, and in HT-144 melanoma cells. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) was used as an internal standard. The RT-PCR assay was performed using 1 µg of DNase I-treated total RNA as described under Materials and methods. A 10% aliquot of the RT reaction mixture was subjected to PCR, and 8-µL aliquots were withdrawn after 32 reaction cycles. The gel-separated DNA PCR products (lumican, 209 bp; decorin, 129 bp; GAPDH, 450 bp) were visualized by ethidium bromide staining. A-375 and HT-144 melanoma cells showed no or a faint band of the SLRPs cDNA in contrast to dermal fibroblasts or lung fibroblasts MRC-5 cells. HT-1080 fibrosarcoma cells expressed lumican but not decorin transcripts.

lumican and decorin cDNAs could be detected in HT-144 melanoma cells. In contrast, dermal fibroblasts and embryonic lung MRC-5 fibroblasts exhibited strong expression of lumican and decorin mRNAs. HT-1080 fibrosarcoma cells expressed lumican but not decorin transcripts.

#### Discussion

The distribution of SLRPs in the noninvolved dermis of the melanoma patients, at a distance from the tumour, was similar to the distribution in normal skin. In the present study, we observed for the first time a significant positive correlation between the expression of decorin protein in the healthy dermis distant from the tumour and the age of the patients with malignant melanoma. Previous work from our laboratory has shown that lumican transcripts are decreased in dermal fibroblasts in healthy elderly donors.<sup>6</sup> Therefore, the age-related alteration in the ratio of lumican to decorin could be a factor predisposing to melanoma progression. However, to our knowledge, no study had shown that elderly people have a faster melanoma progression. Because chronic sun exposure might influence the distribution of the SLRPs, we took into account the location of the melanomas, as they may result from sun-induced damage.

Melanoma progression in the premetastatic phase is characterized by vertical growth through the basement

membrane and penetration into the underlying dermal tissues. The extent of vertical growth is directly correlated with prognosis of this tumour.<sup>13</sup> Among the SLRPs, lumican and decorin have been shown to exert an antitumour effect. Decorin has been shown to be an antioncogenic molecule, and its mechanism of action has been relatively well described. It is able to bind the epidermal growth factor receptor and stimulate the expression and activity of p21<sup>CIP1/WAF1</sup>, a Cdk inhibitor.14,15 Decorin has been shown to be present in normal adult human skin, where it is the most abundant SLRP.<sup>4,6</sup> Therefore, in the present study, we used decorin as a reference for comparison to lumican distribution. We reported previously that lumican is involved in the control of melanoma growth and invasion.<sup>5</sup> It decreases subcutaneous tumour formation in vivo by decreasing cyclin D1 expression and increasing the apoptosis of murine melanoma cells. Lumican has also been reported to bind FasL and to facilitate the induction of the pro-apoptotic receptor Fas.<sup>16</sup> In the present study, lumican and decorin expression in malignant melanoma was compared with the number of tumour cells positive for Ki-67, considered an indicator of poor prognosis.<sup>13</sup> In the healthy dermis, distant from the tumour, the increasing ratio of lumican to decorin was inversely correlated with the proliferation of the tumour cells, suggesting that decreased expression of lumican at the tumour margin might allow proliferation.

Accumulation of lumican around the tumour margin was detected in an area rich in CD68-positive macrophages. Interestingly, a cell-surface receptor for nonglycanated lumican, was identified in macrophages.<sup>17</sup> The respective roles of the glycosaminoglycan chains and the core protein in the antitumour activity of lumican are still under question. It has been suggested that the glycosaminoglycan chains might limit access to the cell surface receptor. However, the importance of the carbohydrate area of lumican seems limited, as the antitumour activity remains after deglycosylation. Moreover, the recombinant deglycosylated core protein of lumican has been shown to have antitumour activity.<sup>5</sup>

Unlike basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma, melanomas are highly invasive and malignant, arising from either congenital dysplastic naevi or de novo from resident melanocytes. The BI has been shown to be a strong prognostic factor.<sup>18</sup> However, in the dermis or at the tumour margin, we found no significant correlation between the BI and the level of expression of lumican or decorin. In contrast, in the peritumoral stroma, expression of lumican, but not decorin, decreased significantly with increasing Clark level. The decreased expression of lumican in the peritumoral stroma surrounding the tumour mass was correlated with a deep infiltration of melanoma cells within the dermis, suggesting that lumican may participate in a defence mechanism against melanoma development. However, compared with the BI, the Clark level is not considered a major prognostic factor for patients with melanoma,<sup>19</sup> therefore, its observed correlation with lumican expression has to be interpreted with caution. Similarly, high expression of lumican has been shown to play a role in the slow growth of carcinoid tumours.<sup>20</sup>

In the peritumoral stroma, comparison of the level of lumican expression in SSM vs. NM showed a decrease of lumican expression in NM, suggesting that lumican might regulate melanoma vertical progression. The horizontal phase of melanoma cell invasion in the epidermis does not involve lumican, which is not expressed in this tissue. In contrast, peritumoral dermal lumican might regulate vertical invasion. The absence of lumican expression in cutaneous metastatic melanomas supports this hypothesis.

Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis has been shown to correlate with poor prognosis.<sup>21</sup> In the present study, however, it was not possible to search for a correlation between lumican expression and patient, because of the limited number of patients for whom follow-up studies were available.

Our immunohistochemical data in malignant melanomas reveal lumican and decorin accumulation in the peritumoral stroma surrounding the tumour mass, suggesting a defence mechanism against melanoma development. These results are in agreement with previous studies of lumican expression in various types of cancer including pancreatic, colorectal, and breast carcinomas.<sup>22</sup> Melanoma cells were devoid of any lumican or decorin immunoreactivity. In vitro, we confirmed that dermal fibroblasts express decorin and lumican.<sup>6</sup> Lung MRC-5 fibroblasts cells also secrete decorin, as described previously.<sup>23</sup> In contrast, A-375 melanoma cells did not express these SLRPs, and HT-144 melanoma cells exhibited only a faint staining. These immunohistochemical data were confirmed by reverse transcriptase PCR analysis, where A-375 and HT-144 melanoma cells showed no or a faint band of the SLRP cDNA, in contrast to dermal or MRC-5 fibroblasts. Recently, lumican substituted with keratan sulphate chains was shown to be expressed and secreted by human melanoma cells (WM9 and M5 melanoma cell lines), but not normal melanocytes.<sup>24</sup> However, we found no or very low lumican expression in the melanoma cells that we studied. Lumican has been shown to carry attached keratan sulphate chains in corneal stroma but not in skin.8

Many cell–matrix and cell–cell interactions are implicated in the progression and growth of tumours. Murine melanoma cells express various integrins that are involved in cell migration, including vitronectin and fibronectin receptors. The expression of these integrins and their interaction with extracellular matrix macromolecules are necessary for proliferation and invasion of solid tumours.<sup>25</sup> A cell-surface receptor for nonglycanated lumican has been identified in macrophages, which did not recognize the proteoglycan form of the molecule.<sup>17</sup>

Further study is necessary to identify the lumican receptor(s) expressed at the cell surface of melanoma cells and to clarify the antitumour mechanism of lumican and the downstream signal transduction pathways involved in malignant melanoma.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Marne) and the Cancéropôle Grand Est.

#### References

 Ruiter D, Bogenrieder T, Elder D *et al.* Melanoma–stroma interactions. structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002; **3**: 35–43.

- 2 Iozzo RV. Matrix proteoglycans from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 609–52.
- 3 Schönherr E, Sunderkötter C, Schaefer L *et al.* Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea. *J Vasc Res* 2004; **41**: 499–508.
- 4 Carrino DA, Onnerfjord P, Sandy JD *et al.* Age-related changes in the proteoglycans of human skin. Specific cleavage of decorin to yield a major catabolic fragment in adult skin. *J Biol Chem* 2003; **278**: 17566–72.
- 5 Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'Onofrio MF et al. The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp Cell Res* 2004; **296**: 294–306.
- 6 Vuillermoz B, Wegrowski Y, Contet-Audonneau JL *et al.* Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2005; **277**: 63–72.
- 7 Kao WW-Y, Funderburgh JL, Xia Y *et al.* Focus on molecules: lumican. *Exp Eye Res* 2006; **82**: 3–4.
- 8 Chakravarti S, Magnuson T, Lass JH *et al.* Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 1998; **141**: 1277–86.
- 9 Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-β by the proteoglycan decorin. *Nature* 1990; **346**: 821–4.
- 10 Danielson KG, Baribault H, Holmes DF *et al.* Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 1997; **136**: 729– 43.
- 11 De Luca A, Santra M, Baldi A *et al.* Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinase. *J Biol Chem* 1996; **271**: 18961–5.
- 12 Patey M, Delemer B, Bellon G *et al.* Immunohistochemical study of thrombospondin and its receptors alpha root of beta 3 and CD36 in normal thyroid and in thyroid tumours. *J Clin Pathol* 1999; **52**: 895–900.
- 13 Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Nordling S et al. Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant melanoma. Br J Cancer 1998; 77: 1917–25.

- 14 Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ *et al.* Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor.
   *J Biol Chem* 1999; **274**: 4489–92.
- 15 Santra M, Mann DM, Mercer EW *et al.* Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppresion in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest* 1997; **100**: 149–57.
- 16 Vij N, Roberts L, Joyce S *et al.* Lumican regulates corneal inflammatory responses by modulating fas-fas ligand signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: 88–97.
- 17 Funderburgh JL, Mitschler RR, Funderburgh ML et al. Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38: 1159–67.
- 18 Tran KT, Lamb B, Deng JS *et al.* Matrikines and matricryptins: implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Derm Sci* 2005; **40**: 11–20.
- 19 Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ *et al.* Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001 **19**: 3635–48.
- 20 Shinji S, Tajiri T, Ishiwata T *et al.* Different expression levels of lumican in human carcinoid tumor and neuroendocrine cell carcinoma. *Int J Oncol* 2005; 26: 873–80.
- 21 Seya T, Tanaka N, Shinji S *et al.* Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis correlates with poor prognosis. *Oncol Rep* 2006; **16**: 1225–30.
- 22 Naito Z. The role of small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *J Nippon Med Sch* 2005; **72**: 137–45.
- 23 Honda E, Munakata H. Purification and characterization of decorin from the culture media of MRC-5 cells. *Int J Bioch Cell Biol* 2004; 36: 1635–44.
- 24 Sifaki M, Assouti M, Nikitovic D *et al.* Lumican, a small leucine-rich proteoglycan substituted with keratan sulfate chains is expressed and secreted by human melanoma cells and not normal melanocytes. *IUBMB Life* 2006; **58**: 606–10.
- 25 Hart IR, Birch M, Marshall JF. Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 115–28.


Available online at www.sciencedirect.com



Experimental Cell Research

Experimental Cell Research 296 (2004) 294-306

www.elsevier.com/locate/yexcr

# The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression

Boris Vuillermoz,<sup>a,1</sup> Antonina Khoruzhenko,<sup>a,1,2</sup> Marie-France D'Onofrio,<sup>a</sup> Laurent Ramont,<sup>a</sup> Lydie Venteo,<sup>b</sup> Corinne Perreau,<sup>a</sup> Frank Antonicelli,<sup>a</sup> François-Xavier Maquart,<sup>a</sup> and Yanusz Wegrowski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Biochemistry, CNRS UMR 6198, Faculty of Medicine, F-51095 Reims Cedex, France <sup>b</sup>Laboratory of Pathology, EA 3306, IFR53 Biomolecules, Faculty of Medicine, F-51095 Reims Cedex, France

Received 25 September 2003; received in revised form 22 January 2004

Available online 19 March 2004

### Abstract

Lumican is a member of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family. It contributes to the organisation of the collagen network and plays an important role in cell migration and tissue repair. The present study aimed to determine the influence of lumican expression on adhesion, anchorage-dependent and -independent growth, migration, in vitro invasion and in vivo melanoma growth. For that purpose, B16F1 mouse melanoma cells were stably transfected with an expression plasmid containing the complete lumican cDNA. Lumican expression by tumor cells did not change the proliferative activity of mouse melanoma cells in monolayer culture and did not influence either cell adhesion to extracellular matrix gel or type I collagen or cell spreading on these substrates. In contrast, lumican-transfected cells were characterized by a strong reduction of their anchorage-independent proliferation in agarose gel and capacity to invade extracellular matrix gel. After subcutaneous injections of transfected B16F1 cells in syngenic mice, lumican expression significantly decreased subcutaneous tumor formation in vivo, with a concomitant decrease of cyclin D1 expression. Lumican induced and/or increased the apoptosis of B16F1 cells. The results suggest that lumican is involved in the control of melanoma growth and invasion and may be considered, like decorin, as an anti-tumor factor from the extracellular matrix. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Proteoglycan; Lumican; Melanoma; Invasion; Migration; Anti-tumor

### Introduction

Malignant melanoma is the second cancer in mortality rate in Caucasian population [1,2]. In the vertical phase of tumor growth, the cells acquire the capacity to penetrate the papillary dermis, forming expansive, aggressive nodules [3]. In dermis, melanoma cells get in contact with extracellular matrix and induce a stromal reaction [4]. The quality and integrity of extracellular matrix can influence melanoma growth and progression and its capacity for metastasis [5].

Dermis extracellular matrix is composed of different types of collagens, many glycoproteins (including fibronectin, tenascin, thrombospondin), hyaluronan and proteoglycans. The small leucine-rich proteoglycans (SLRP) family, which includes decorin, biglycan and lumican, constitutes an abundant component of skin extracellular matrix [6]. Recent generation of knock-out mice has proven the role of these small proteoglycans in the regulation of the formation of collagen fibrillar network [7–9].

The SLRP family is composed of (glyco)proteins of  $M_r$  approximately 40,000 containing 7–10 leucine-rich domains. The core protein adopts a unique horseshoe or

*Abbreviations:* CFE, colony forming efficiency; ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacryl-amide gel electrophoresis; SLRP, small leucin-rich proteoglycan.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, 51 rue Cognacq Jay, F-51095, Reims Cedex, France. Fax: +33-326-918055.

E-mail address: yanusz.wegrowski@univ-reims.fr (Y. Wegrowski).

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> The first two authors contributed equally to this work.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Present address: Laboratory of Functional Diagnosis, Institute of Endocrinology and Metabolism, Academy of Medical Science of Ukraine, 04114 Kiev, Ukraine.

arch conformation to permit protein–protein interaction [6,10]. It is characterized by 4 and 2 conserved cysteine signature in the N- and C-terminal domain, respectively. Biglycan and decorin have one and two chondroitin/dermatan sulphate chains, respectively, attached to the core protein. Lumican was shown to be substituted with keratan sulphate in cornea [11] or with non-sulfated polylactosamine chain in tumor stroma [12]. The data concerning skin lumican are scanty, although it was shown that, in dermis, lumican is present in glycoprotein form and may control fibrillogenesis [9,13].

Recently, lumican expression was studied in tumor tissue. In different types of cancer, lumican was always expressed by fibroblasts or fibroblast-like cells adjacent to infiltrating tumor cells [12-14]. Lumican mRNA and proteins were also detected in pancreatic cancer cells in culture [12], but was not expressed in several types of epithelial breast cancer cell lines [13]. Lumican is a major SLRP of breast carcinoma, up-regulated in tumor zone in comparison to adjacent normal tissue [15]. A reduced expression of lumican was associated with poor outcome of invasive carcinoma [16]. Lumican containing non-sulfated polylactosamine chains was also expressed by colorectal carcinoma and in adjacent tumor stroma [14]. Lumican was also detected in pancreas cancers and pancreatic cancer cells in culture<sup>[12]</sup>. Nothing is known about expression of lumican in melanomas or melanoma cells in culture.

By regulating collagen fibrillogenesis, the SLRP family of macromolecules contributes to the mechanical and permeability properties of extracellular matrices, including dermis [17]. Apart from this fundamental function, SLRPs are able to bind and neutralise growth factors, including TGF- $\beta$  [18]. Decorin can also inhibit the growth of different cancer cells [19] by neutralising the EGF receptor-dependent kinases and up-regulating p21<sup>CIP1/WAF1</sup> through interaction with the EGF receptor in a non-competitive way [20]. In vivo, decorin was shown to inhibit the growth of different tumors implanted in nude mice [21]. Recently, it was demonstrated that another SLRP, biglycan, inhibited pancreatic cancer cell growth [22] by a mechanism probably involving the SMAD4 transduction pathway [23].

Transformation of melanoma from planar to vertical growth, that is, dermal penetration, constitutes the first dangerous event in the malignancy of this tumor [3]. Lumican-lacking mice have a fragile dermis due to irregular fibrillogenesis and neither decorin nor biglycan physiological expression in the dermis compensates the lack of lumican [9]. The expression of lumican in the stroma of growing cancers and the implication of decorin and biglycan in the inhibition of growth of different tumors led us to examine the potential role of lumican in melanoma progression. In this paper, we show that lumican inhibits melanoma growth and progression in a mouse experimental model. Our results suggest a mechanism different from those of decorin or biglycan.

#### Materials and methods

### Reagents

Culture reagents and molecular biology products were obtained from Gibco BRL (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Agar was purchased from BioMérieux (Meylan, France). Matrigel (ECM gel), bovine serum albumin (BSA), glutaraldehyde, cristal violet and Hoechst 33342 were purchased from Sigma (S<sup>t</sup>-Quentin Fallavier, France). Nglycosidase F was purchased from Roche Diagnostics (Meylan, France). Keratanase II was purchased from Seikagaku (Coger, Morillon, France). Ni-NTA resin superflow was purchased from Quiagen (Courtaboeuf, France). The lumican polyclonal antibody against carboxy-terminal region of the core protein was generously provided by Dr P. Roughley (Genetics unit, McGill University, Montreal). The secondary horseradish peroxidase-labelled goat anti-rabbit antibodies were from Amersham Biosiences (Saclay, France). Anti-mouse Bax polyclonal antibody was obtained from Cell Signaling (Ozyme, S<sup>t</sup> Quentin en-Yvelines, France), anti-mouse cyclin D1 (clone SP4) polyclonal antibody were purchased from Labvision (Microm Microtech, Francheville, France).

### Animals and cells

Female C57BL/6 mice (average body mass: 18–20 g, 7 weeks old) were purchased from Harlan-France (Gannat, France). Animals were individually caged in a room with constant temperature and humidity, standard food and water ad libitum. All mice were acclimatized for 1 week before starting the experiments. The experiments were conducted according to the recommendations of the Centre National de la Recherche Scientifique.

Murine B16F1 cells, a lung metastatic subline of murine B16 melanoma, were a generous gift of Dr. M. Gregoire (INSERM UMRS 419, Nantes, France). Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS in 25 cm<sup>2</sup> flasks (Nunclon, Merck Eurolab, Strasbourg, France) under a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 37°C.

### Vector construction and transfection of lumican cDNA

A cDNA encoding the complete human lumican coding sequence (HLum) previously cloned into the pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO cloning vector was generously provided by Dr P. Roughley [24]. The cell expression construct (pcDNA3-HLum) was produced by *Eco*RI digestion of the pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO vector, separation of the fragment of 1.2 kb containing the complete sequence of lumican by agarose gel electrophoresis, and religation into the pcDNA3 plasmid (Invitrogen). The recombinant expression construct (pQE30-HLum) was produced by *Hin*dIII and *Kpn*I digestion of the pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO vector, separation of the 1.5-kb fragment by agarose gel electrophoresis, and religation into the plas-

mid pQE30 (Quiagen). The proper insertion and sequence of the constructs was confirmed by DNA sequencing.

For stable transfections, 15  $\mu$ g of plasmid pcDNA3 (vector alone) and pcDNA3-HLum were transfected into subconfluent B16F1 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). After 2 days, cells were expanded into 100-mm dishes. Transfected cells were selected in the presence of 400  $\mu$ g/ml neomycin (G418). Resistant colonies of transfected B16F1 cells were isolated by critical dilution and screened for lumican production. In parallel, mock-transfected cells with empty plasmid were prepared.

### Western blot

Proteins secreted into the culture media were concentrated by ethanol precipitation. The samples were reconstituted into 30 µl 100 mM Tris-HCl, pH 7.4. Half of the samples were incubated with 2.5 U/ml N-glycosidase F or 0.005U/ml keratanase II at 37°C overnight [24]. The cell layer was harvested by scraping, followed by centrifugation at 1000  $\times$ g and proteins were prepared using the method of Staal et al. [25]. All the samples were separated under reducing conditions in 7.5% polyacrylamide gels [26]. The tumors were homogenised in 50 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.6 and 0.6% NP40 at 4°C containing a cocktail of proteinase inhibitors, and proteins were extracted by overnight gentle agitation. The extracts were centrifuged and the supernatants were collected for protein analysis. The protein concentration was determined by Bradford method [27] and the samples were separated by electrophoresis as above.

Following electrophoresis, proteins were transferred from the polyacrylamide gels to nitrocellulose by electroblotting [28]. The membranes were soaked in TBS-T solution (0.005% Tween 20, 20 mM Tris and 140 mM NaCl, pH 7.6) containing 5% BSA for 2 h. After washing, the membranes were incubated with a rabbit polyclonal anti-human lumican primary antibody [24] at a final dilution of 1:400, or with a rabbit polyclonal anti-mouse Bax primary antibody at a final dilution of 1:1000, for 15 h at 4°C with constant agitation. The membranes were washed with TBS-T and probed with 1:1000 dilution of a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase in a solution of 1% BSA in TBS-T for 30 min at room temperature. The excess of second antibody was washed out by TBS-T and the complexes revealed by the ECL Plus Chemiluminescence Detection kit (Amersham-Pharmacia), as indicated by the manufacturer.

### Melanin production

The level of melanin production by wild-type B16F1 cells, mock-transfected B16F1 cells and HLum-transfected B16F1 cells was measured by monitoring the absorbance of solubilised cell extracts [29,30]. Briefly, after detachment by 0.25% trypsin solution, the cells were settled down by centrifugation for 10 min at  $1500 \times g$ , then 2 ×

 $10^6$  cells were resuspended in 500 µl of 0.85-M potassium hydroxide and 10% dimethyl sulfoxide. The samples were incubated at 80°C for 90 min and centrifuged to remove insoluble material. The absorbance was measured at 405 nm.

### Cell proliferation, adhesion and spreading

For measuring cell proliferation, mouse melanoma cells  $(10^4 \text{ cells/ml} \text{ in RPMI-1640} \text{ medium supplemented with } 10\% FBS)$  were plated into 24-well plates (0.5 ml per well). At the 3rd day, 10 µl FBS was added into each well. At 0, 3rd and 5th days, the cells were fixed with 1.1% glutaraldehyde for 20 min and stained with crystal violet. The wells were rinsed and air dried. Bound stain was dissolved in 500 µl of 10% acetic acid and the absorbance was measured at 560 nm [31].

Adhesion of the cells was determined by counting the number of cells attached to the substrate after 4 h of incubation in 96 well plates. Matrigel (10 µg/well), or type I collagen from rat tail tendons (10  $\mu$ g/well) were used for the assays. The wells were saturated with 200 µl of 1% heatinactivated BSA before adding the substratum. BSA-coated culture plastic was used as control. Two thousand cells were seeded in pre-coated wells. At the end of the incubation period, cells were fixed with methanol and stained using the May-Grunvald-Giemsa reagent. The number of adhered cells was counted for five random fields of observation at ×200 magnification. The percentage of spreaded cells was calculated for the cells adhered to Matrigel and type I collagen [32]. Cells with a cytoplasm diameter equal or larger than the nuclear diameter were considered as spreaded.

### Anchorage-independent growth

Soft agar growth assays were carried out in 6-well plates. Each well contained the following layers: a bottom layer of 0.9% agar (1 ml), a middle layer of 0.3% agar (1 ml) containing the cell suspension ( $5 \times 10^3$  cells/well) and a top layer of 0.9% agar (1 ml). Agar was previously mixed 1:1 with 2 × growth medium (RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS). After 10 days of culture, the number of colonies was counted in triplicate [33,34]. The groups of cells containing no less than 50 cells were considered as colonies.

The colony forming efficiency (CFE) was determined by the formula:

 $CFE = (Number of colonies \times 100)$ 

/Number of seeded cells.

### Cell invasion and migration

The invasive capacity of transfected cells in vitro was probed by the determination of their ability to invade an artificial basement membrane made of Matrigel. Polycarbonate filters (8 µm pore size, 0.3 cm<sup>2</sup> total filter area) of Transwell device (Corning Costar, Dutscher, Brumath, France) were coated with Matrigel (10 µg/filter) containing or not recombinant human lumican (0, 1 or 10  $\mu$ g). Then, 5  $\times$ 10<sup>4</sup> cells in 100 µl RPMI-1640 medium supplemented with 0.2% BSA were placed into the upper chamber of the Transwell device. Eight hundred microliters of medium containing 2% BSA and 10% FBS were placed into the lower chamber. After 24 h of incubation, the cells were fixed with methanol for 5 min and stained by the May-Grunvald-Giemsa method. The cells remaining in the upper chamber were removed by cotton swab. Invaded cells were counted on the lower side of the filter. Five random fields at  $\times 200$ magnification for every filter were counted [35]. Assay of the cell migration was carried out with the same method using uncoated filters.



Fig. 2. Melanin content of B16F1 melanoma cells. Wild-type cells (1), mock-transfected cells (2) and cells transfected with HLum (3) were resuspended in potassium hydroxide and dimethyl sulfoxide and processed as described in Materials and methods. The absorbance of melanin was measured at 405 nm. Histograms represent the mean of four clones of two independent triplicate cultures ( $\pm$ 1SD).



Fig. 1. Western blot analysis of lumican secreted into the medium of B16F1 melanoma cells (A). Total medium proteins from confluent culture of wild-type B16F1, mock-transfected B16F1 (transfected with pcDNA3 vector alone; four clones were studied: 3, 16, 18 and 19), and HLum-transfected B16F1 cells (transfected by pcDNA3-HLum construct, clones: 4, 7, 8 and 36) were separated by SDS-PAGE and transferred into nylon membrane as indicated in Materials and methods. The membrane was probed with an anti-lumican polyclonal antibody. Right arrow indicates the position migration of the  $M_r$  approximately 57,000-lumican band in HLum-transfected cells. (B) Digestion of secreted lumican with glycolytic enzymes. Lanes 1 and 4: the medium proteins from HLum-transfected B16F1 cells were digested with N-glycosidase F and Keratanase II, respectively. Lanes 2 and 3: the medium proteins from HLum-transfected B16F1 cells were undigested. The  $M_r$  approximately 57,000 and  $M_r$  approximately 37,000 lumican bands are indicated on the right margin. The position migration of size markers of 116, 97, 66 and 29 kDa are depicted on the left margin.



Fig. 3. The proliferative activity of B16F1 melanoma cells in monolayer culture. Wild-type cells, mock-transfected cells and HLum-transfected cells were seeded into 24-well plates. At the indicated times, triplicate dishes were fixed with glutaraldehyde and stained by violet crystal as described in Materials and methods. The bound stain was dissolved in 10% acetic acid and the absorbance measured at 560 nm. Histograms represent the mean  $\pm$  1SD of four clones in two independent triplicate cultures.

### Expression and purification of recombinant lumican

Recombinant human lumican core protein was expressed in *Escherichia coli* JM109, DE3 strain (Promega, Charbonnière-les-bains, France). Transformed cells were grown at  $37^{\circ}$ C in 100 ml of Luria Bertani medium containing 50 µg of ampicillin/ml until the A<sub>600nm</sub> was about 0.6. Protein expression was induced by addition of 0.4 mM isopropyl-ßD-thiogalactopyranoside. After 4 h culture at 37°C under agitation, bacterial suspension was harvested by centrifugation at 4000  $\times$  g for 15 min at 4°C. The pellets were resuspended in 1.5 ml of 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.4. The cells were disrupted by sonication. After centrifugation (3000  $\times$  g, 5 min, room temperature), the pellets were washed with 2 ml 10 mM Tris, pH 8 and vigorously extracted in 8 M urea, pH 8.0, during 30 min, then centrifuged (10000  $\times$  g, 5 min at room temperature). The supernatant was incubated for 1 h with 1 ml of Ni-NTA resin superflow. The resin was put in a chromatography column, washed with 4 ml of the urea buffer pH 6.3 then pH 5.9. Finally, the proteins were eluted with 4 ml of elution solution (8 M urea, pH 4.5). After dialysis against distilled water, the purity of the protein was assessed by SDS-PAGE and by Western blotting using anti-lumican polyclonal antibody.

#### In vivo tumor growth studies

The mice were subcutaneously injected in the right thigh with  $2.5 \times 10^5$  HLum-transfected B16F1 cells suspended in 200 µl RPMI-1640. Control mice were injected with the same number of mock-transfected cells (empty plasmid) or wild-type B16F1 cells, which both do not express lumican. Mice were sacrificed 14 days later for measurement of the tumor size. Tumor volume was calculated using the formula: volume =  $a \times b^2 \times 0.5$ , where *a* is the longest diameter and *b* the shortest [36]. Assays were performed using groups of seven animals each in two independent experiments.



Fig. 4. Attachment and spreading of the B16F1 melanoma cells on different substrata. Wild-type cells (open bars), mock-transfected cells (full bars) or HLumtransfected cells (stippled bars) were seeded on Matrigel (A, C) or type I collagen-coated dishes (B, D) in 96 well plates. After 4 h of incubation, cells were fixed, stained with May-Grundvald-Giemsa method and counted for attachment (A, B) or spreading (C, D) as indicated in Materials and methods. Histograms represent the mean  $\pm$  1SD of four clones in two separate experiments performed in triplicate.

### Immunohistochemistry and nuclear morphology

Tissue samples were fixed in 4% fresh paraformaldehyde in PBS, pH 7.2 at 4°C overnight. Specimens were embedded in paraffin and sectioned at 3  $\mu$ m. After deparaffinisation, the sections were treated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min at room temperature to block endogenous peroxidase. The slides were heated in a pressure cooking in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0), then washed in PBS buffer and incubated with normal rabbit serum for 20 min at room temperature. The lumican protein was detected using an anti-lumican rabbit antibody, diluted (1:160) in PBS-1% BSA and incubated at 4°C overnight. The cyclin D1 protein was detected using an anti-cyclin D1 rabbit antibody, diluted (1:100) in PBS-1% BSA, and incubated at 4°C overnight. Sections from a normal dermis were used as positive controls. As negative controls, the tumor sections were incubated in PBS and 1% BSA without antibody. Sections were then washed and incubated with a biotinylated secondary antibody for 45 min at room temperature followed by streptavidin peroxidase. Color development was obtained with 3-amino-9-ethylcarbazole as chromogen (Vector Lab-



Fig. 5. Lumican expression by B16F1 melanoma cells decreases anchorage-independent cell growth. Cells were plated in monolayer (A, B, C) or in soft agar (D, E, F) as described under Materials and methods. Upper panel: photograph of control cells (A, D), mock-transfected cells (B, E) and cells transfected with HLum (C, F) after 10 days of culture. Cells were stained by the May-Grundvald-Giemsa method (scale bars, 20  $\mu$ m). Lower panel: quantification of colony-forming efficiency (10 days of culture). The ratio of colonies number per 100 seeded cells was calculated for wild-type cells (open bar), mock-transfected cells (full bar) or HLum-transfected cells (stippled bar). Histograms represent the mean  $\pm$  1SD of three clones in three different experiments performed in triplicate, \*\*: significantly lower than wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells, *P* < 0.01.

oratories, Burlingame, CA), which gives a dark-red reaction product. The tumor sections were counterstained with Harris Hematoxyline (blue).

Positive immunohistochemical reaction of cyclin D1 was evaluated using a light microscope taking into account the staining of the nuclei only. At least 1000 cells were counted in each section, the percentage of stained cells was evaluated two times independently by two different investigators.

For nuclear staining, cells were washed with PBS, pH 7.2, treated with Hoechst 33342 (50  $\mu$ g/ml) in PBS for 30 min at 37°C and observed in a Nikon Eclipse TE 300 fluorescence microscope. Cells pictures were captured through CCD-camera (Nikon DXM 1200). We evaluated the cells from their nuclear morphology.

### Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. For in vitro experiments, statistical significance between groups was assessed by unpaired Student's *t* test. Statistical analysis of in vivo tumor growth was performed using the non-parametric Mann–Withney *U* rank sum test. The *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

### Results

# Transfection and characterisation of lumican into B16F1 mouse melanoma cells

B16F1 mouse melanoma cells were used as a model for the study of melanoma invasion and metastasis [29,37,38]. Western blot analysis (Fig. 1A, WT) showed that wild-type B16F1 cells do not express lumican core protein. Moreover,



Fig. 6. Lumican expression decreases the migration of B16F1 melanoma cells through uncoated Transwell filter. Wild-type cells (open bars), mock-transfected cells (full bars) or cells transfected with HLum (stippled bars) were seeded into the upper chamber of Transwell. The number of cells, which crossed through the filter was determined in five random fields of observation at magnification ×200, after 24 h of incubation at 37°C and staining by the May-Grundvald-Giemsa method. Histograms represent the mean  $\pm$  1SD of two independent experiments performed in triplicate with four different clones. \*\*\*: Significantly lower than wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells, P < 0.001.



Fig. 7. Lumican expression decreases the ability of B16F1 melanoma cells to invade Matrigel. Wild-type cells (open bars), mock-transfected cells (full bars) or cells transfected with HLum (stippled bars) were seeded into the upper chamber of Transwell. The number of cells, which crossed through the Matrigel-coated filter was determined in five random fields of observation at magnification ×200, after 24 h of incubation at 37°C and staining by the May-Grundvald-Giemsa method. Histograms represent the mean  $\pm$  1SD of two independent experiments performed in triplicate with four different clones. \*\*\*: Significantly lower than wild-type (WT) and mock-transfected B16F1 cells, P < 0.001.

no lumican mRNA was observed in these cells by Northern blot analysis (data not shown).

To study the effects of lumican expression on the properties of melanoma cells, we transfected B16F1 cells with an expression plasmid containing the full-length human lumican cDNA (HLum) or with an empty plasmid (mock-transfected cells). Western blot analysis of four clones stably transfected with human lumican cDNA (clones 4, 7, 8 and 36) showed lumican secretion into the medium of B16F1 melanoma cells under the form of  $M_r$  approximately 57,000 band which corresponds to the glycosylated form of lumican [24]. No lumican was secreted by mock-transfected cells (clones 3, 16, 18 and 19; Fig. 1A). Treatment of the newly secreted proteins with keratanase II did not influence the migration of the  $M_{\rm r}$  approximately 57,000 band (Fig. 1B, lanes 3 and 4). On the contrary, treatment with N-glycosidase F (Fig. 1B, lane 1 and 2) decreased its size to  $M_r$  approximately 37,000, which corresponds to the size of the lumican core protein. These results indicate that HLum-transfected cells produce lumican under its glycoprotein form. No difference of cell morphology was observed for the lumican-expressing clones as compared to that which integrated the empty plasmid (mock-transfected cells) or the wild-type, non-transfected cells.

To determine if lumican expression can change the level of differentiation of mouse melanocytes, melanin synthesis by B16F1 cells was measured. There was no difference of melanin content between the wild-type B16F1, mock-transfected B16F1 and HLum-transfected B16F1 cells (Fig. 2).

# Lumican does not influence cell adhesion, spreading and growth in monolayer culture

To further determine the influence of lumican on cell physiology, the proliferation activity of wild-type B16F1, HLum-transfected B16F1 and mock-transfected B16F1 cells



Fig. 8. Production and purification of human recombinant lumican. SDS-PAGE electrophoresis of *Escherichia coli* lysate transfected with pQE30 vector alone (lane 1), or with pQE30-HLum vector (lane 2) and of the purified fraction obtained after Ni-NTA chromatography (lane 3) stained with Coomassie blue (A) or revealed with anti-lumican (B). Right arrows indicate the position migration of the  $M_r$  approximately 37,000 lumican core protein. The position migration of size markers of 45 and 29 kDa are depicted on the left margin.

was examined. There was no significant difference of proliferation in lumican-expressing B16F1, wild-type B16F1 and mock transfected B16F1 cells in monolayer culture (Fig. 3).

We tested the influence of lumican expression on cell adhesion to Matrigel and type I collagen. The number of adhered cells after 4 h of incubation did not differ significantly for lumican-expressing B16F1, wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells (Figs. 4A and B), indicating that lumican expression did not influence cell adhesion neither on plastic (not shown) nor on Matrigel or type I collagen. There was no significant difference between the percentage of spreaded cells (Figs. 4C and D). All these results indicate that transfected cells kept similar morphology and growth rate in monolayer as wild-type cells.

### Lumican expression inhibits anchorage-independent growth

In contrast to monolayer cultures (Figs. 5A, B and C), there was a prominent effect of lumican expression on cell growth in soft agar. The number and size of colonies formed by the lumican-expressing cells were significantly decreased in comparison with colonies formed by wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells (Figs. 5D, E and F). Moreover, in this last case, most of the colonies had an irregular shape and were smaller than the colonies from wild-type and mock-transfected cells. Colony forming efficiency (CFE) of wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells was  $6.7 \pm 1.4$  and  $5.4 \pm 1.0$ , respectively, while CFE for lumican-expressing B16F1 cells was decreased to  $0.9 \pm 0.3$  (P < 0.01) (Fig. 5, lower panel).

### Lumican expression significantly decreases cell migration and invasion through ECM gel

To estimate the migratory potential of mouse melanoma cells transfected with lumican, we determined the ability of the cells to migrate through non-covered Transwell filter. The number of lumican-expressing B16F1 cells which were able to cross the filter was significantly decreased in comparison with wild-type B16F1 and mock-transfected B16F1 cells (Fig. 6). The mock-transfected cells retained a capacity to migrate through non-covered filter similar to that of non-transfected cells, indicating that transfection by itself, and acquired resistance for neomycine, did not change their migration potential. The mean number of lumican-expressing B16F1 cells migrated through the uncoated filter was 49  $\pm$  40 per counted field versus 400  $\pm$  60 and 340  $\pm$  90,



Fig. 9. Recombinant lumican decreases B16F1 melanoma cell migration and Matrigel invasion. Wild-type B16F1 cells were seeded into the upper chamber of Transwell device. Filters were coated either with recombinant lumican 0, 1 or 10  $\mu$ g (A) or with a mixture of 10  $\mu$ g Matrigel and 0, 1 or 10  $\mu$ g recombinant lumican (B). The number of cells, which crossed through filter was determined in five random fields of observation at magnification ×200, after 24 h of incubation at 37°C and staining by the May-Grundvald-Giemsa method. Histograms represent the mean ± 1SD of triplicate experiments. \*\*: Significantly lower than control (0  $\mu$ g recombinant lumican), *P* < 0.01.

respectively, for wild-type and mock-transfected B16F1 cells (P < 0.001). The same effect of lumican expression was detected for invasion of mouse melanoma cells through Matrigel, an analogue of basement membrane, in Transwell filter assays (Fig. 7). The mean number of lumican-expressing B16F1 cells which invaded the Matrigel was  $24.5 \pm 25$  per field of observation, whereas for wild-type and mock-transfected B16F1 cells, the number of invaded cells was  $142.5 \pm 36.5$  and  $142 \pm 15.5$ , respectively (P < 0.001). These results indicate that lumican expression inhibits the migratory potential of melanoma cells as well through the Transwell filter alone as covered with Matrigel.

### Recombinant lumican reproduces the inhibiting effect of lumican expression on B16F1 cell migration and Matrigel invasion

Recombinant human lumican core protein was produced in *E. coli*, (JM109 DE3), and purified by affinity chromatography on Ni-NTA resin superflow column. The Western blot analysis showed lumican expression by the HLumtransfected bacteria (Fig. 8). The observed  $M_r$  approximately 37,000 protein band corresponded to the non-glycosylated core protein of lumican [24]. For invasion and migration



Fig. 11. Lumican-expression decreases the tumorigenicity of B16F1 melanoma cells in vivo. Tumors were generated by subcutaneous injection of  $2.5 \times 10^5$  wild-type cells (1), mock-transfected cells (2), or HLum-transfected B16F1 cells (3), as described under Materials and methods. Tumor volume was measured at 14 days after injection. \*\*: Significantly different from wild-type and mock-transfected B16F1 cell tumors, P < 0.01.

studies, Transwell filters were coated with purified recombinant lumican alone (0, 1 or 10  $\mu$ g) or with a mixture of Matrigel (10  $\mu$ g) and lumican (0, 1 or 10  $\mu$ g). When the filter was coated with recombinant lumican alone, a significant inhibition of cell migration was already observed with 1  $\mu$ g lumican added (Fig. 9A). When the filter was coated with a mixture of Matrigel and lumican, the number of



Fig. 10. Tumors from HLum-transfected B16F1 melanoma cells strongly express lumican. Tumors were generated by subcutaneous injection of  $2.5 \times 10^5$  wild-type (a), mock-transfected (b), or HLum-transfected cells (c) in the right thigh of syngenic C57BL6 mice, as described under Materials and methods. Immunohistochemical study was performed using a polyclonal anti-lumican antibody. Intense staining was found in tumors (T) from HLum-transfected cells whereas only a faint staining of the normal dermis (D) and tumor stroma was observed in the tumors from wild-type and mock-transfected cells. Magnification  $\times 50$  (first column), magnification  $\times 200$  (second column).

A B C Wild type Mock-transfected Hlum-transfected

Fig. 12. Expression of cyclin D1 in tumors. Tumors were generated by subcutaneous injection of  $2.5 \times 10^5$  wild-type, mock-transfected, or HLumtransfected cells in the right thigh of syngenic C57BL6 mice, as described under Materials and methods. Immunohistochemical staining of cyclin D1 showed multiple strongly stained nuclei in control tumors (A, B) whereas few weakly stained cell nuclei were observed in tumors from HLum-transfected cells (C) (scale bars, 10 µm).

invaded cells was significantly decreased when 10  $\mu$ g of recombinant lumican were mixed with Matrigel (Fig. 9B). These results indicate that recombinant lumican decreases the migratory potential of melanoma cells as well through the filter alone as through Matrigel.

### *Lumican expression decreases the tumorigenicity of B16F1 melanoma cells in vivo*

To confirm the inhibiting influence of lumican on tumor growth in vivo, C57BL6 syngenic mice were injected subcutaneously with  $2.5 \times 10^5$  cells, either wild-type, mock-transfected or lumican-expressing B16F1 cells. The

mice developed local tumors after 8 days. The developing tumor did not influence the viability and food intake of animals up to 21 days. Tumors were excised 14 days after inoculation for analysis.

Immunohistochemical study (Fig. 10) showed that tumors developed from HLum-transfected B16F1 cells contained an important amount of lumican (Fig. 10c), whereas wild-type and mock-transfected cells did not (Figs 10a and b). A faint staining was also observed in the normal dermis and in the tumor stroma.

Lumican-expressing B16F1 cells produced significantly smaller tumors when compared with wild-type cells and mock-transfected cells (Fig. 11). The average tumor size



Fig. 13. A—effects of recombinant lumican on nuclear morphology. Wild-type B16F1 cells ( $2 \times 10^4$  /well) were plated into 24-well plates and incubated at 37°C for 16 h without or with recombinant lumican, then stained with Hoechst 33342. (a) Non-treated B16F1 cells (control). Note the homogeneous distribution of the chromatin in the nucleus. (b and c) Lumican-treated B16F1 cells (b:10 µg/ml; c:50 µg/ml). Note the condensed chromatin at the nuclear periphery and fragmented nuclei (arrows) (scale bars, 5 µm). B—effects of lumican on Bax expression. (a) Wild-type B16F1 cells were incubated for 16 h without (controls) or with 10 or 50 µg/ml recombinant lumican, or with 50 µM Doxorubicine. At the end of the incubation period, cells were collected and homogenised and Bax expression evaluated by Western blot. The membrane was probed with an anti-Bax polyclonal antibody. Right arrow indicates the position migration of the  $M_r$  approximately 20,000 Bax band. (b) Tumors obtained 14 days after subcutaneous injection of wild-type, mock-transfected (controls) or HLum-transfected B16F1 cells were collected and homogenised, as described in Materials and methods. Bax expression was evaluated by Western blot.

was decreased by approximately 50% (P < 0.01), when HLum-transfected cells were used. By contrast, mock-transfected B16F1 cells produced tumors of the same size than wild-type cells.

### Effect of lumican on cell cycle progression and apoptosis

Cell cycle progression is tightly regulated through a complex network of positive and negative cell cycle regulatory molecules, such as Cdks, cyclins and Cdk inhibitors [39]. In this study, we examined the expression of cyclin D1, known to play a major role in the control of cell cycle progression [40], in the tumors generated by wild-type, mock-transfected and HLum-transfected B16F1 cells. Positive labelling for cyclin D1 was observed in 40.3  $\pm$  2.8%, 41  $\pm$  3.0% and 29.6  $\pm$  1.4% of the cell nuclei of these tumors, respectively, indicating a significant (*P* < 0.001) inhibition of cyclin D1 expression in tumors generated by HLum-transfected cells (Fig. 12C), compared to the wild-type and mock-transfected ones (Figs. 12A and B).

The ability of recombinant lumican to induce apoptosis in B16F1 cell was determined by fluorescence microscopy using cells stained with Hoechst-33342 (Fig. 13). Control cells contained a round nucleus with homogeneous chromatin (Fig. 13A(a)). After exposure to recombinant lumican at the concentrations 10 and 50  $\mu$ g/ml for 16 h, B16F1 cells showed morphologic changes typical of apoptosis, such as cytoplasmic and nuclear shrinkage and chromatin condensation or fragmentation (Fig. 13A). Chromatin condensation and fragmentation was also detectable in the tumors generated by subcutaneous injection with wild-type cells, mocktransfected cells or HLum-transfected B16F1 cells (data not shown). It was not possible to accurately quantify the chromatin condensation in the tumors, however, due to the presence of necrosis area.

To further explore the effects of recombinant lumican, we performed Western blot analysis of Bax expression in B16F1 cells pre-treated with recombinant lumican at the concentration 10 and 50  $\mu$ g/ml for 16 h (Fig. 13B, panel a). The levels of Bax were up-regulated in cells treated by recombinant lumican 50  $\mu$ g/ml for 16 h. Increased Bax expression was also found in vivo in the tumors obtained with HLum-transfected cells (Fig. 13B, panel b).

Taken together, our results indicate that lumican can decrease the melanoma growth in vivo as in vitro by decreasing cell cycle, but also the melanoma progression by inducing and/or increasing the apoptosis of tumor cells.

### Discussion

In the present study, we demonstrated that lumican expression inhibits some essential characteristics of melanoma cells in vitro and melanoma tumor growth in vivo. Previous studies demonstrated the presence of lumican in different types of cancer, including breast carcinoma [41], pancreatic and colorectal cancers [14]. In breast tumors, lumican expression was inversely correlated with cancer progression. Reduced expression of lumican and decorin was correlated with poor outcome of invasive cancer [16]. The expression of SLRP molecules, including lumican, was proposed as a tissue defence mechanism against invading malignant cells [42]. The most studied SLRP molecule with anti-oncogenic effect was decorin. The ectopic expression of this proteoglycan or its addition to the culture medium retarded numerous cancer cell lines growth in monolayer culture, without affecting the growth of non-transformed cells [43,44]. When injected into tumor or ectopically expressed, decorin-limited cancer expansion [45]. The mechanism of decorin action was partially elucidated since this proteoglycan can bind and neutralise the EGF receptor [20] and stimulate the expression and activity of p21<sup>ĈIP1/WAF1</sup> Cdk inhibitor [44].

Lumican-transfected B16F1 cells secreted much lumican both in vitro and in vivo. A faint expression of lumican was also found in normal dermis, tumor stroma and in the blood vessels. Such localization was already reported [46]. Lumican expression by B16F1 cells significantly inhibited hypodermal melanoma growth in syngenic mice and the anchorage-independent growth of these cells in soft agar. Lumican did not, however, change the B16F1 cell differentiation, their growth rate in monolayer culture and their adhesion or spreading on plastic, Matrigel or type I collagen. These characteristics contrast with that of decorin, which was shown to inhibit proliferation in monolayer culture by arresting the cells in G1 phase [44]. Expression of lumican in growing tumors inhibited the expression of cyclin D1, the major cyclin controlling Cdk activation and regulation of cell cycle progression [39]. These results suggest that the mechanism of action of lumican on melanoma cells is different from that of decorin. Decorin may act on individual cells even at distance, while lumican action was observed in growing tumors only, suggesting the influence of stromal components against cell invasion. We showed that lumican expression can substantially inhibit cell migration and cell invasion through an in vitro reconstituted basement membrane, like Matrigel. Melanoma progression in pre-metastatic phase is characterized by vertical growth through the basement membrane, with penetration into the underlying dermal tissue [2]. The extent of vertical growth is directly correlated with the poor prognosis of this tumor [47].

Many cell-matrix and cell-cell interactions are implicated in the progression and growth of the tumor [48]. B16F1 melanoma cells express different integrins, including vitronectin and fibronectin receptors, which are involved in cell migration [49]. The expression of integrins and their interaction with extracellular matrix macromolecules are necessary for proliferation and invasion of solid tumors [50,51]. On the contrary, anti-adhesive molecules expressed on the cell surface, for example, the chondroitin sulfate NG2 proteoglycan, are able to enhance melanoma growth [29]. Lumican secreted by HLum-transfected B16F1 melanoma cells was devoid of keratan sulphate chains but was in glycosylated form, as judged by its resistance and susceptibility to digestion by keratanase and N-glycosidase F, respectively (Fig. 1B). These data, together with that obtained with recombinant lumican, indicate that the lumican core protein was responsible for the observed effects. The inhibition of cell migration and invasion by lumican suggests that the molecule may influence the integrin signalling pathway, as it was shown for CD44 [52]. This proteoglycan regulates the interaction of  $\alpha 4\beta 1$  integrin with fibronectin and thus adhesion-mediated growth control [53,54].

Another way of controlling the tumor progression is the induction of apoptosis. Many anti-tumor drugs have proapoptotic effects [55]. Indeed, lumican increased Bax expression in vitro and in vivo, and chromatin condensation in vitro, as observed after Hoechst-33342 staining. Our results suggest that, in addition to the inhibition of cell migration/ invasion, lumican triggers apoptotic pathway. Bax is a major pro-apoptotic cytoplasmic factor, which may be activated either by the Bid pathway or directly by DNA damage [56]. The way by which lumican induces apoptosis in melanoma cells has to be established.

The growth of melanoma cells involves different growth factors. Interleukin-6, PDGF, bFGF and TGF- $\beta$  are necessary for tumor progression [57]. Lumican, as other SLRP molecules, may neutralise TGF- $\beta$  [18]. It was recently shown that TNF $\alpha$  may also interact with SLRP [58]. Apart interactions with some cell surface proteins, necessary for movement-dependent cell growth, lumican might also control the availability of growth factors. It was shown that growth factor depletion stress may also trigger the apoptotic pathway [59]. Studies are in progress to elucidate the detailed mechanism of lumican action on melanoma development and progression. As decorin, lumican can be considered as an extracellular protein, which controls tumor growth.

### Acknowledgments

This work was supported by grants from ARERS (Association Régionale pour l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique et Technologique en Champagne-Ardenne), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Haute-Marne), the Centre National de la Recherche Scientifique and the University of Reims Champagne-Ardenne. We thank Pr M. Pluot (EA 3306, IFR53 Biomolecules, Reims, France) for providing technical facilities and Dr P. Roughley (Genetic unit, Mc Gill University, Montreal) for providing anti-lumican antibodies and pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO vector.

### References

 D.E. Elder, Skin cancer. Melanoma and other specific nonmelanoma skin cancers, Cancer 75 (1995) 245–256.

- [2] C. Balch, A. Houghton, S.-J.A. Soong, Cutaneous Melanoma, 3rd edition, Quality Medical Publishing, St. Louis, 1998.
- [3] L. Barnhill, N. Crowson, K. Busam, S. Granter, Textbook of Dermatopathology, 1998, McGraw-Hill, New York.
- [4] S. Suster, Hyalinizing spindle and epithelioid cell nevus. A study of five cases of a distinctive histologic variant of Spitz's nevus, Am. J. Dermatopathol. 16 (1994) 593–598.
- [5] D. Ruiter, T. Bogenrieder, D. Elder, M. Herlyn, Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects, Lancet Oncol. 3 (2002) 35–43.
- [6] R.V. Iozzo, The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 32 (1997) 141–174.
- [7] K.G. Danielson, H. Baribault, D.F. Holmes, H. Graham, K.E. Kadler, R.V. Iozzo, Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility, J. Cell Biol. 136 (1997) 729–743.
- [8] T. Xu, P. Bianco, L.W. Fisher, G. Longenecker, E. Smith, S. Goldstein, J. Bonadio, A. Boskey, A.M. Heegaard, B. Sommer, K. Satomura, P. Dominguez, C. Zhao, A.B. Kulkarni, P.G. Robey, M.F. Young, Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice, Nat. Genet. 20 (1998) 78–82.
- [9] S. Chakravarti, T. Magnuson, J.H. Lass, K.J. Jepsen, C. LaMantia, H. Carroll, Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican, J. Cell Biol. 141 (1998) 1277–1286.
- [10] G. Schmidt, H. Robenek, B. Harrach, J. Glossl, V. Nolte, H. Hormann, H. Richter, H. Kresse, Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin, J. Cell Biol. 104 (1987) 1683–1691.
- [11] J.R. Hassell, D.A. Newsome, J.H. Krachmer, M.M. Rodrigues, Macular corneal dystrophy: failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77 (1980) 3705–3709.
- [12] Y. Ping Lu, T. Ishiwata, G. Asano, Lumican expression in alpha cells of islets in pancreas and pancreatic cancer cells, J. Pathol. 196 (2002) 324–330.
- [13] J.A. Rada, P.K. Cornuet, J.R. Hassell, Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins, Exp. Eye Res. 56 (1993) 635–648.
- [14] Y.P. Lu, T. Ishiwata, K. Kawahara, M. Watanabe, Z. Naito, Y. Moriyama, Y. Sugisaki, G. Asano, Expression of lumican in human colorectal cancer cells, Pathol. Int. 52 (2002) 519–526.
- [15] E. Leygue, L. Snell, H. Dotzlaw, S. Troup, T. Hiller-Hitchcock, L.C. Murphy, P.J. Roughley, P.H. Watson, Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma, J. Pathol. 192 (2000) 313–320.
- [16] S. Troup, C. Njue, E.V. Kliewer, M. Parisien, C. Roskelley, S. Chakravarti, P.J. Roughley, L.C. Murphy, P.H. Watson, Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer, Clin. Cancer Res. 9 (2003) 207–214.
- [17] A.M. Hocking, T. Shinomura, D.J. McQuillan, Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix, Matrix Biol. 17 (1998) 1–19.
- [18] A. Hildebrand, M. Romaris, L.M. Rasmussen, D. Heinegard, D.R. Twardzik, W.A. Border, E. Ruoslahti, Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta, Biochem. J. 302 (Pt. 2) (1994) 527–534.
- [19] M.A. Nash, A.E. Loercher, R.S. Freedman, In vitro growth inhibition of ovarian cancer cells by decorin: synergism of action between decorin and carboplatin, Cancer Res. 59 (1999) 6192–6196.
- [20] R.V. Iozzo, D.K. Moscatello, D.J. McQuillan, I. Eichstetter, Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor, J. Biol. Chem. 274 (1999) 4489–4492.
- [21] J.G. Tralhao, L. Schaefer, M. Micegova, C. Evaristo, E. Schonherr, S. Kayal, H. Veiga-Fernandes, C. Danel, R.V. Iozzo, H. Kresse, P. Lemarchand, In vivo selective and distant killing of cancer cells using

adenovirus-mediated decorin gene transfer, FASEB J. 17 (2003) 464-466.

- [22] C.K. Weber, G. Sommer, P. Michl, H. Fensterer, M. Weimer, F. Gansauge, G. Leder, G. Adler, T.M. Gress, Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines, Gastroenterology. 121 (2001) 657–667.
- [23] W.B. Chen, W. Lenschow, K. Tiede, J.W. Fischer, H. Kalthoff, H. Ungefroren, Smad4/DPC4-dependent regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells, J. Biol. Chem. 277 (2002) 36118–36128.
- [24] J. Grover, X.N. Chen, J.R. Korenberg, P.J. Roughley, The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage, J. Biol. Chem. 270 (1995) 21942–21949.
- [25] F.J. Staal, M. Roederer, L.A. Herzenberg, Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kappa B and transcription of human immunodeficiency virus, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87 (1990) 9943–9947.
- [26] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680–685.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
- [28] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (1979) 4350–4354.
- [29] M.A. Burg, K.A. Grako, W.B. Stallcup, Expression of the NG2 proteoglycan enhances the growth and metastatic properties of melanoma cells, J. Cell. Physiol. 177 (1998) 299–312.
- [30] H. Kosano, T. Kayanuma, H. Nishigori, Stimulation of melanogenesis in murine melanoma cells by 2-mercapto-1-(beta-4-pyridethyl) benzimidazole (MPB), Biochim. Biophys. Acta 1499 (2000) 11-18.
- [31] H. Wang, T.B. Ng, V.E. Ooi, W.K. Liu, Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines, Int. J. Biochem. Cell Biol. 32 (2000) 365–372.
- [32] W.O. Twal, A. Czirok, B. Hegedus, C. Knaak, M.R. Chintalapudi, H. Okagawa, Y. Sugi, W.S. Argraves, Fibulin-1 suppression of fibronectin-regulated cell adhesion and motility, J. Cell Sci. 114 (2001) 4587–4598.
- [33] R.M. Niles, R. Combs, The relationship between susceptibility to retinoic acid treatment and protein kinase C alpha expression in murine melanoma cell lines, Exp. Cell Res. 223 (1996) 20–28.
- [34] M. Gu, K. Meng, P.W. Majerus, The effect of overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTPMEG on cell growth and on colony formation in soft agar in COS-7 cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 (1996) 12980–12985.
- [35] W. Zhao, H. Liu, S. Xu, F. Entschladen, B. Niggemann, K.S. Zanker, R. Han, Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase, Cancer Lett. 162 (2001) S49–S55 (Suppl.).
- [36] M. Wald, T. Olejar, V. Sebkova, M. Zadinova, M. Boubelik, P. Pouckova, Mixture of trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time of C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16, Cancer Chemother. Pharmacol. 47 (2001) S16–S22 (Suppl.).
- [37] D. Hangan, V.L. Morris, L. Boeters, C. von Ballestrem, S. Uniyal, B.M. Chan, An epitope on VLA-6 (alpha6beta1) integrin involved in migration but not adhesion is required for extravasation of murine melanoma B16F1 cells in liver, Cancer Res. 57 (1997) 3812–3817.
- [38] K.R. Gehlsen, M.J. Hendrix, In vitro assay demonstrates similar invasion profiles for B16F1 and B16F10 murine melanoma cells, Cancer Lett. 30 (1986) 207–212.

- [39] O. Coqueret, Linking cyclins to transcriptional control, Gene 299 (2002) 35–55.
- [40] R.L. Sutherland, E.A. Musgrove, Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models, Breast Cancer Res. 4 (2002) 14–17.
- [41] E. Leygue, L. Snell, H. Dotzlaw, K. Hole, T. Hiller-Hitchcock, P.J. Roughley, P.H. Watson, L.C. Murphy, Expression of lumican in human breast carcinoma, Cancer Res. 58 (1998) 1348–1352.
- [42] R.V. Iozzo, I. Cohen, Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma, Experientia 49 (1993) 447–455.
- [43] M. Santra, T. Skorski, B. Calabretta, E.C. Lattime, R.V. Iozzo, De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995) 7016–7020.
- [44] M. Santra, D.M. Mann, E.W. Mercer, T. Skorski, B. Calabretta, R.V. Iozzo, Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, J. Clin. Invest. 100 (1997) 149–157.
- [45] C.C. Reed, J. Gauldie, R.V. Iozzo, Suppression of tumorigenicity by adenovirus-mediated gene transfer of decorin, Oncogene 21 (2002) 3688-3695.
- [46] J.L. Funderburgh, M.L. Funderburgh, M.M. Mann, G.W. Conrad, Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta, J. Biol. Chem. 266 (1991) 24773–24777.
- [47] J.M. Karjalainen, M.J. Eskelinen, S. Nordling, P.K. Lipponen, E.M. Alhava, V.M. Kosma, Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant melanoma, Br. J. Cancer 77 (1998) 1917–1925.
- [48] W. Hornebeck, H. Emonard, J.C. Monboisse, G. Bellon, Matrix-directed regulation of pericellular proteolysis and tumor progression, Semin. Cancer Biol. 12 (2002) 231–241.
- [49] D.M. Ramos, E.D. Berston, R.H. Kramer, Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells, Cancer Res. 50 (1990) 728–734.
- [50] E. Ruoslahti, Structure and biology of proteoglycans, Annu. Rev. Cell Biol. 4 (1988) 229–255.
- [51] I.R. Hart, M. Birch, J.F. Marshall, Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis, Cancer Metastasis Rev. 10 (1991) 115–128.
- [52] J.R. Knutson, J. Iida, G.B. Fields, J.B. McCarthy, CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha 2 beta 1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes, Mol. Biol. Cell 7 (1996) 383–396.
- [53] C.M. Verfaillie, A. Benis, J. Iida, P.B. McGlave, J.B. McCarthy, Adhesion of committed human hematopoietic progenitors to synthetic peptides from the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin: cooperation between the integrin alpha 4 beta 1 and the CD44 adhesion receptor, Blood 84 (1994) 1802–1811.
- [54] R.W. Hurley, J.B. McCarthy, E.A. Wayner, C.M. Verfaillie, Monoclonal antibody crosslinking of the alpha 4 or beta 1 integrin inhibits committed clonogenic hematopoietic progenitor proliferation, Exp. Hematol. 25 (1997) 321–328.
- [55] Z. Huang, Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design, Oncogene 19 (2000) 6627–6631.
- [56] J.M. Adams, Ways of dying: multiple pathways to apoptosis, Genes Dev. 17 (2003) 2481–2495.
- [57] I.M. Shih, M. Herlyn, Autocrine and paracrine roles for growth factors in melanoma, In Vivo 8 (1994) 113–123.
- [58] E. Tufvesson, G. Westergren-Thorsson, Tumour necrosis factor-alpha interacts with biglycan and decorin, FEBS Lett. 530 (2002) 124–128.
- [59] D.G. Breckenridge, M. Germain, J.P. Mathai, M. Nguyen, G.C. Shore, Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways, Oncogene 22 (2003) 8608–8618.

# Etude *in vitro* de mécanismes anti-tumoraux induits par le lumicanne recombinant sur les cellules de mélanome

## RESUME

Le mélanome est le cancer cutané le plus grave en raison de son potentiel métastatique élevé et son pronostic redoutable. Le lumicanne est une glycoprotéine, appartenant à la famille des SLRP, retrouvée dans la matrice extracellulaire dermique. Au cours de précédents travaux. nous avons démontré que le lumicanne diminue la progression du mélanome in vivo (Vuillermoz et al., 2004). Dans la présente étude, nous montrons que le lumicanne diminue la migration des cellules de mélanome humain A375 ainsi que leur invasion au travers d'une membrane basale artificielle reconstituée de Matrigel®. Ce phénomène n'est pas dû à un effet apoptotique induit par le lumicanne mais à son habilité à augmenter l'adhésion cellulaire. Afin d'élucider les propriétés anti-invasives du lumicanne, nous avons orienté notre étude sur l'identification du récepteur du lumicanne exprimé par les cellules A375 ainsi que sur les mécanismes intracellulaires mis en jeu. L'adhésion des cellules A375 au lumicanne est dosedépendante et requiert la présence des cations divalents Mg<sup>2+</sup> et Mn<sup>2+</sup>. A l'aide d'un panel d'anticorps bloquants monoclonaux dirigés contre les diverses sous-unités d'intégrines, nous avons montré que les cellules A375 se lient au lumicanne via la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$ . L'utilisation de la rhodocétine, un inhibiteur sélectif dirigé contre la sous-unité d'intégrine  $\alpha_2$ , suggère l'implication de celle-ci. Comparé à d'autres substrats de la matrice extracellulaire, le lumicanne conduit à la formation de regroupements de la sous-unité d'intégrine  $\beta_1$  le long de la membrane plasmique ainsi qu'à une diminution du nombre de complexes d'adhésion focale. Nous avons également observé, en présence de lumicanne, une organisation anormale du réseau d'actine du cytosquelette. Ces résultats suggèrent que le lumicanne est capable d'augmenter l'adhésion et de diminuer la migration des cellules A375 au travers d'intégrines contenant la sous-unité  $\beta_1$  et pourrait de ce fait contribuer à l'inhibition du phénotype migratoire de ces cellules.

## **MOTS CLES**

Protéoglycannes - Mélanome - Adhérence cellulaire - Migration cellulaire - Intégrine alpha2beta1

## **COMPOSITION DU JURY**

Dr Marek HAFTEK (Lyon)
Dr Patrick VERRANDO (Marseille)
Dr Jean-Luc CONTET-AUDONNEAU (Nancy)
Pr François-Xavier MAQUART (Reims)
Dr Yanusz WEGROWSKI (Reims)

## **COORDONNEES**

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire CNRS UMR 6237 – IFR 53 Interactions Cellules-Microenvironnement UFR Médecine – 51 Rue Cognacq-Jay - 51095 REIMS Cedex