

Université de Reims-Champagne Ardenne

UFR Médecine

2009

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

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

Spécialité: Biochimie et Biologie moléculaire

Soutenue publiquement le 10 Décembre 2009

Par

Cédric ZELTZ

Née le 18 Mars 1981 à Troyes (10)

ANALYSE DES MECANISMES D'INTERACTION
DU LUMICANNE AVEC LES CELLULES

Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire
CNRS UMR 6237, IFR 53 Biomolécules
UFR Médecine de Reims

Membres du jury

Rapporteurs: Monsieur le Professeur Philippe GALERA (Caen)
Monsieur le Docteur Mohamed OUZZINE (Nancy)

Examineurs: Monsieur le Docteur Marek HAFTEK (Lyon)
Monsieur le Professeur Philippe BIREMBAUT (Reims)
Monsieur le Professeur François-Xavier MAQUART (Reims)

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

A mes parents

A mon Chichi

A mon Bichon

A ma famille et proches

Remerciements

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

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur François-Xavier Maquart pour m'avoir, accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions. Je le remercie également pour sa participation à ce jury de thèse.

Je remercie vraiment Monsieur le Docteur Yanusz Wegrowski, qui a supervisé cette thèse, pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances impressionnantes dans le domaine de la biochimie.

Je remercie Monsieur le Docteur Stéphane Brézillon pour son co-encadrement, ses conseils et les discussions que nous avons eues.

J'aimerais témoigner ma gratitude envers Monsieur le Professeur Philippe Galera et Monsieur le Docteur Mohamed Ouzzine pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également Monsieur le Docteur Marek Haftek et Monsieur le Professeur Philippe Birembaut pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie également Monsieur le Professeur Philippe Gillery, Mesdames et Messieurs les Docteurs Frank Antonicelli, Georges Bellon, Hervé Emonart, Roselyne Garnotel, William Hornebeck, Stéphane Jaisson, Didier Marot, Jean-Claude Monboisse, Sylvie Pasco-Brassart, Laurent Ramont et Bernard Rothhut pour leurs multiples conseils et remarques au cours des réunions ou discussions au sein du laboratoire.

Je remercie tous les membres de la « lumicanne team », en particulier coco que j'ai embêté avec mes questions durant ces trois ans, mais qui a toujours été là. Je te remercie d'avoir partagé tes compétences avec moi. Je remercie de tout cœur le Docteur Marie-France D'Onofrio qui m'a initié dans ce club fermé, tu m'as beaucoup manqué. Puissent tes vœux se réaliser. Je remercie également Mademoiselle Sandrine Kurdykowski en lui souhaitant bonne chance pour la suite et le Docteur Yannick Bontemps pour ses apparitions sympathiques. *A thought for the polish students, who enabled me to practice my English.*

Je remercie tous mes collègues du laboratoire: Mesdames Martine Decarme, Aurélie Dupont-Déshorgue, Johanna Lorin, Isabelle Proult et Christèle Sellier, et les futurs docteurs Karine, Nadia, Stéphane et tous ceux que j'oublie (désolé !).

Je remercie également Madame Catherine Lejeune pour sa très grande gentillesse et sa disponibilité.

Je tiens à remercier Christine Terryn et le Docteur Hélène Bobichon pour leur aide en vidéomicroscopie et microscopie confocale, respectivement.

Je remercie aussi le Docteur Frédéric Delacoux pour ses conseils en mutagenèse dirigée.

I would like to thank our collaborators the Doctors Eble and Käpylä for their works in solid phase assay.

Un grand merci à mes compagnons de route des conférences CIES, Benoît, Fred et Florence pour ces bons moments.

Merci à Yves Gourdin du service reprographie pour l'impression de ce manuscrit.

Je tiens surtout à offrir tous mes remerciements à mes parents qui ont toujours cru en moi et qui m'ont aidé durant toutes ces années. Je voulais vous dire que je vous aime.

Un mot pour mon Chichi, qui toutes les journées est resté seul à m'attendre. Je t'aime mon toupoutou.

Une pensée également à mon Bichon qui nous manquait à Chichi et moi. Je t'aime aussi mon chonchon.

Un grand merci à mes amis et ma famille.

Je n'oublie pas de remercier mes supports financiers, sans qui ce travail n'aurait pas été possible : La région Champagne-Ardenne, le Cancéropôle du Grand Est et la ligue nationale contre le cancer.

Sommaire

	Pages
<i>Liste des Abréviations</i>	14
<i>Liste des Illustrations</i>	18
<i>Liste des publications et communications</i>	25
<i>Introduction</i>	31
<i>Généralités</i>	33
CHAPITRE I : LA PEAU ET LE MELANOME	34
1- Structure de la peau	34
1.1- L'hypoderme	34
1.2- Le derme	36
1.3- La jonction dermo-épidermique	36
1.4- L'épiderme	38
2- La matrice extracellulaire (MEC)	40
2.1- Les collagènes	40
2.2- Les glycoprotéines matricielles	41
2.3- L'élastine	44
2.4- Les protéoglycannes	45
2.4.1- Les glycosaminoglycannes (GAG)	45
2.4.2- Liaison des GAG aux protéines dans les protéoglycannes	47
2.4.2.1- Les liaisons O-glycosidiques	47
2.4.2.2- Les liaisons N-glycosidiques	48
2.4.3- Classification des protéoglycannes	49
2.4.3.1- Les protéoglycannes intracellulaires	49
2.4.3.2- Les protéoglycannes de la surface cellulaire	49
2.4.3.3- Les protéoglycannes de la matrice extracellulaire	49
2.4.4- Les petits protéoglycannes et protéines riches en leucine (SLRP)	52
2.4.4.1- Classification des SLRP	52

2.4.4.1.1- Les SLRP de la classe I	52
2.4.4.1.2- Les SLRP de la classe II	52
2.4.4.1.3- Les SLRP de la classe III	53
2.4.4.1.4- Les SLRP de la classe IV	53
2.4.4.1.5- Les SLRP de la classe V	53
2.4.4.2- Structure des SLRP	54
2.4.4.2.1- Le domaine de répétitions riches en leucine (LRR) central	54
2.4.4.2.2- La partie N-terminale des SLRP	55
2.4.4.2.3- La partie C-terminale des SLRP	57
2.4.4.2.4- Structure tridimensionnel des SLRP	57
2.4.4.3- Rôles physiologiques des SLRP	58
2.4.4.4- Rôle des SLRP dans le cancer	59
2.4.4.5- Régulation de l'expression des SLRP	60
2.4.5- Le lumicanne	62
2.4.5.1- Gène et promoteur du lumicanne	62
2.4.5.2- Structure du lumicanne	64
2.4.5.3- Rôles biologiques du lumicanne	66
2.4.5.3.1- Interaction du lumicanne avec le collagène	66
2.4.5.3.2- Rôle du lumicanne dans la réponse immunitaire et l'inflammation	66
2.4.5.3.3- Rôle du lumicanne dans le cancer	67
3- Le mélanome	67
3.1- Incidence et mortalité	67
3.2- Les facteurs de risque	68
3.2.1- Les facteurs génétiques	68
3.2.2- La pigmentation de la peau	68
3.2.3- Les <i>naevi</i>	69
3.2.4- Les facteurs hormonaux	69
3.2.5- L'exposition au soleil	69
3.3- Diagnostic clinique et pronostic	69
3.3.1- Diagnostic clinique	69
3.3.2- Critère du pronostic	70
3.4- Classification anatomoclinique des mélanomes	71

3.5- Traitement du mélanome métastatique	71
CHAPITRE II : LA MIGRATION CELLULAIRE	73
1- Introduction	73
2- Le cycle de migration cellulaire	75
2.1- La famille des Rho GTPases	75
2.2- La polarisation de la cellule	77
2.2.1- La protéine Cdc42	77
2.2.2- Les complexes de polarité	79
3- Formation des protrusions et de l'adhésion	80
3.1- Formation des protrusions	80
3.2- Formation de l'adhésion	83
3.2.1- Les intégrines	83
3.2.2- Assemblage de l'adhésion – Protéines des complexes focaux	86
3.2.2.1- La taline et la vinculine	87
3.2.2.2- Les protéines FAK et Scr	87
3.2.2.3- La paxilline	89
4- Les forces de traction et de contraction	89
5- Désassemblage de l'adhésion et rétraction à l'arrière de la cellule	90
<i>Matériel et Méthodes</i>	92
CHAPITRE I : MATERIEL BIOLOGIQUE	93
1- Souches cellulaires	93
2- Protéines de la MEC	95
3- Peptides synthétiques	95
4- Anticorps	96
4.1- Anticorps primaires	96
4.2- Anticorps secondaires	96
5- Plasmides	96
5.1- pQE30-Hlum	96
5.2- pCEP4-Hlum	96
6- siRNA	98

CHAPITRE II : METHODES	99
1- Méthodes de Biologie Moléculaire	99
1.1- Extraction des plasmides à partir de bactéries	99
1.2- Sous-clonage du lumicanne et des fragments L 1-6 et L 1-9 recombinants	99
1.2.1- Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-6	99
1.2.1.1- Amplification de la cassette L 1-6	99
1.2.1.2- Digestion enzymatique de la cassette L 1-6 et du vecteur pQE30	100
1.2.1.3- Ligation du plasmide pQE30-L 1-6 et transformation bactérienne	100
1.2.2- Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-9	101
1.3- Mutagenèse dirigée	101
1.3.1- Synthèse des amorces mutagènes	101
1.3.2- Synthèse des brins mutés	102
1.3.3- Sélection des plasmides mutés	103
1.4- RT-PCR	103
1.4.1- Transcription inverse des ARN (RT)	103
1.4.2- Amplification du milieu RT par PCR	104
2- Méthodes de Biochimie	104
2.1- Chromatographie	104
2.1.1- Chromatographie échangeuse d'ion	104
2.1.1.1- Préparation de la résine DEAE-Sephadex A50	104
2.1.1.2- Préparation des échantillons	105
2.1.1.3- Chromatographie	105
2.1.2- Chromatographie d'immuno-affinité	105
2.1.2.1- Immobilisation des anticorps anti-lumicanne sur la résine Sépharose 4B activé au CnBr	105
2.1.2.2- préparation des échantillons	106
2.1.2.3- Chromatographie	106
2.1.3- Purification par chromatographie d'ion métal-affinité sur colonne Ni-NTA Superflow	107
2.1.3.1- Purification des protéines humaines recombinantes produites en système procaryote : lumicanne, L 1-6, L 1-9, Hlum (K265A) et Hlum (K267A)	107
2.1.3.1.1- Culture bactérienne	107
2.1.3.1.2- Extraction des protéines recombinantes des corps	

d'inclusion	107
2.1.3.1.3- Chromatographie	107
2.1.3.2- Purification du lumicanne produit par les cellules HEK-Hlum	108
2.2- Electrophorèse SDS-PAGE et Western immunoblotting	108
2.2.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)	108
2.2.2- Electrotransfert et immuno-révélation des protéines (Western immunoblotting)	109
2.2.3- Anticorps primaires	110
2.3- Digestion du lumicanne par l'enzyme N-glycosidase F	110
2.4- Analyse de la phosphorylation sur résidu tyrosine	110
2.5- Test de fixation du lumicanne au domaine $\alpha 2I$ en phase solide	111
2.5.1- Interaction lumicanne – $\alpha 2\beta 1$	111
2.5.2- Interaction lumicanne - $\alpha 2I$	111
3- Méthodes de Biologie Cellulaire	112
3.1- Culture cellulaire	112
3.1.1- Transfection cellulaire	113
3.1.1.1- Transfection des cellules HEK-293 EBNA	113
3.1.1.2- Transfection des siRNA	113
3.1.2- Mesure de viabilité cellulaire	114
3.2- Adhésion cellulaire	114
3.2.1- Préparation des plaques 96 puits	114
3.2.2- Test d'adhésion cellulaire	115
3.2.3- Test de compétition pour l'adhésion cellulaire	115
3.3- Migration cellulaire	115
3.3.1- Migration en chambre de Boyden (Transwell [®])	115
3.3.2- Migration en vidéomicroscopie	116
3.3.2.1- Migration cellulaire aléatoire	116
3.3.2.2- Migration cellulaire en modèle de blessure/cicatrisation	117
3.4- Microscopie laser confocale	117
3.5- Cytométrie en flux	117
4- Méthodes de bioinformatique et d'analyse statistique	118
4.1- Structure du lumicanne par homologie	118
4.2- Analyse statistique des résultats obtenus	118

<i>Résultats</i>	119
CHAPITRE I : EXPRESSION DE DIFFERENTES FORMES DU LUMICANNE HUMAIN – ETUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE COEUR ET DE LA FORME GLYCOSYLEE	120
1- Expression du lumicanne par les cellules humaines MRC5 et HEK-Hlum	120
2- Purification du lumicanne exprimé par les cellules MRC5	123
2.1- Purification par chromatographie échangeuse d'ion	123
2.2- Purification par chromatographie d'immunoaffinité	123
2.3- Rendement de production	124
3- Purification du lumicanne glycosylé recombinant exprimé par les cellules HEK-Hlum	126
3.1- Purification par chromatographie d'ion métal-affinité	126
3.2- Rendement de production	126
4- Etude fonctionnelle comparative entre la protéine cœur et la forme glycosylée du lumicanne	127
4.1- Effet du lumicanne glycosylé sur l'adhésion des cellules A375	127
4.2- Effet du lumicanne glycosylé sur la migration des cellules A375	128
CHAPITRE II : IMPLICATION DE L'INTEGRINE $\alpha 2\beta 1$ DANS L'INHIBITION DE LA MIGRATION CELLULAIRE PAR LE LUMICANNE	131
1- Effet du lumicanne sur des cellules invalidées pour l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$	131
1.1- Mise en évidence de l'invalidation de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$	131
1.2- Effet du lumicanne sur la migration des cellules A375 dont l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ est invalidée	132
2- Effet du lumicanne sur des cellules surexprimant la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$	136
3- Interaction directe du lumicanne avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$	139
CHAPITRE III : CARACTERISATION DE LA SEQUENCE ACTIVE DU LUMICANNE RESPONSABLE DE L'INHIBITION DE LA MIGRATION CELLULAIRE	142
1- Détermination de la séquence active du lumicanne présentant un effet inhibiteur de migration cellulaire	142

1.1- Localisation de la région active au sein du lumicanne	142
1.2- Analyse de la région comportant les LRR 7 à 9	142
1.3- Etude du LRR 9 sur la migration des cellules de mélanome	145
2- Effet de lumcorin sur l'adhésion des cellules de mélanome	150
3- Effet de lumcorine sur la migration et l'adhésion des cellules de mélanome en présence de collagène	150
4- Effet du peptide dérivé du LRR 8 du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome	151
5- Effet de lumcorin sur la phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK	156
6- Détermination des acides aminés impliqués dans l'inhibition de la migration par lumcorine et le lumicanne	157
CHAPITRE IV : EFFET DU LUMICANNE ET DE LUMCORIN SUR LA MIGRATION DES CELLULES NON TRANSFORMEES	161
1- Effet du lumicanne et de lumcorin sur la migration des fibroblastes dermiques	161
1.1- Effet du lumicanne sur la migration des fibroblastes dermiques	161
1.2- Effet de lumcorin sur la migration des fibroblastes dermiques	161
2- Effet du lumicanne et de lumcorin sur la migration des cellules endothéliales	164
2.1- Effet du lumicanne sur la migration des cellules HUVEC	164
2.2- Effet de lumcorin sur la migration des cellules HUVEC	164
3- Effet du lumicanne et de lumcorin sur la migration des cellules souches mésenchymateuses (CSM)	166
3.1- Effet du lumicanne sur la migration des cellules CSM	166
3.2- Effet de lumcorin sur la migration des cellules CSM	166
<i>Discussion</i>	169
<i>Conclusions et Perspectives</i>	181
<i>Références Bibliographiques</i>	185
<i>Annexes</i>	206

Liste
Des
Abréviations

aa	Acides aminés
ADAMTS	<i>A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ADN(c)	Acide désoxyribonucléique (complémentaire)
aPKC	<i>Atypic protein kinase C</i>
ARN(m)	Acide ribonucléique (messenger)
BET	Bromure d'éthidium
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CS	Chondroïtine sulfate
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
Da, kDa	Dalton, kilo-Dalton
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DS	Dermatane sulfate
EBNA	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen-1</i>
EBP	<i>Elastin binding protein</i>
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EGF(R)	<i>Epidermal growth factor (receptor)</i>
Ena/VASP	<i>Enabled/ vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
et coll.	et collaborateurs
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
g, mg, µg, fg	Gramme, milligramme, microgramme, femtogramme
GAG	Glycosaminoglycannes
Gal	Galactose
GalNAc	N-acétylgalactosamine
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide exchange inhibitor</i>
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>

GlcA	Acide glucuronique
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GST	Glutathione-S-transferase
GTP	Guanosine triphosphate
H, min, sec	Heure, minute, seconde
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1- pipérazine éthane sulfonique
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HS	Héparanne sulfate
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
IdoA	Acide iduronique
IFN	Interféron
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
JDE	Jonction dermo-épidermique
Kd	Constante de dissociation
KS	Kéراتanne sulfate
L, mL, μL	Litre, millilitre, microlitre
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
LUT	<i>Look-up table</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MIDAS	<i>Metal ion-dependant adhesion site</i>
MLC(K)	<i>Myosin light chain (kinase)</i>
M, mM, nM, μM	Molaire, millimolaire, nanomolaire, micromolaire
MMP	Métalloprotéinase matricielle
Mr	Masse moléculaire relative
MTOC	<i>Microtubule-organizing center</i>
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

m/v, v/v	Masse/volume, Volume/volume
Ni-NTA	Nickel - nitrilotriacétique
nm, μm	Nanomètre, micromètre
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAK1	<i>P21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
pb, kpb, kb	Paires de bases, kilo-paires de bases, kilobases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PG	Protéoglycane(s)
PRELP	<i>Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein</i>
RNI	<i>Pancreatic ribonuclease inhibitor</i>
ROCK	<i>Rho kinase</i>
RT(PCR)	<i>Reverse transcriptase (PCR)</i>
SCR	<i>Scramble</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SLRP	<i>Small leucine-rich proteoglycan</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cystein</i>
Src	<i>Sarcoma</i>
SSM	<i>Superficial spreading melanoma</i>
SVF	Sérum de veau foetal
TBS(T)	<i>Tris buffered saline (Tween20)</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
Tm	<i>melting temperature</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
U	Unité d'activité enzymatique
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>

Liste
des
illustrations

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Structure de la peau
(A) Représentation schématique d'une coupe de la peau.
(B) Coupe histologique d'une peau fœtale.
- Figure 2 :** Structure de la jonction dermo-épidermique
(A) Représentation schématique des complexes d'ancrage.
(B) Coupe en microscopie électronique à faible grossissement de la JDE.
- Figure 3 :** Les quatre populations cellulaires de l'épiderme.
- Figure 4 :** Structure de l'épiderme.
(A) Représentation schématique des différentes strates épidermiques.
(B) Coupe histologique d'une peau épaisse.
- Figure 5 :** Représentation des différentes liaisons GAG-protéine selon le type de GAG impliqué.
- Figure 6 :** Analyse phylogénétique et organisation chromosomique des différentes classes de SLRP.
- Figure 7 :** Organisation des répétitions riches en leucine des SLRP.
- Figure 8 :** Structures secondaires composant les SLRP.
- Figure 9 :** Structure de la partie N-terminale des SLRP.
- Figure 10 :** Structure de l'inhibiteur de la ribonucléase porcine (RNI) obtenue par étude cristallographique.
- Figure 11 :** Structure d'un monomère de la décorine humaine obtenue par étude cristallographique de la forme dimérique.
- Figure 12 :** Interaction de la décorine avec l'EGFR.
- Figure 13 :** Structure du gène du lumicanne.
- Figure 14 :** Séquence du promoteur du gène du lumicanne humain.
- Figure 15 :** Alignement de séquence du lumicanne de différentes espèces.
- Figure 16 :** Localisation des sites potentiels de N-glycosylation sur la protéine cœur du lumicanne.
- Figure 17 :** Les différentes formes anatomocliniques de mélanome.
- Figure 18 :** Etapes de la migration cellulaire.
- Figure 19 :** Les membres de la famille des Rho GTPases.

- Figure 20 :** Le cycle des Rho GTPases.
- Figure 21 :** La polarité des cellules en migration.
- Figure 22 :** Filament d'actine.
- Figure 23 :** Activité protéique requise pour l'initiation des filopodes et des protrusions.
- Figure 24 :** Représentation schématique de la structure d'une intégrine hétérodimérique.
- Figure 25 :** Schématisation des interactions à proximité des intégrines entre les différentes protéines impliquées dans la migration.
- Figure 26 :** Les protéines associées à FAK.
- Figure 27 :** Les protéines FAK et Src dans la signalisation de la migration cellulaire.
- Figure 28 :** Illustrations des différentes forces impliquées dans la migration cellulaire.
- Figure 29 :** Observation des différents types cellulaires au microscope à contraste de phase.
- Figure 30 :** Schématisation du plasmide pQE30-Hlum.
- Figure 31 :** Schématisation du plasmide pCEP4-Hlum.
- Figure 32 :** Représentation de la méthode de mutagenèse dirigée QuickChange[®] II.
- Figure 33 :** (A) Analyse par Western immunoblotting de la digestion par l'enzyme N-glycosidase F, du lumicanne produit par les cellules HEK et MRC5.
(B) Analyse par Western immunoblotting des chaînes de kératane sulfate.
- Figure 34:** (A) Profil d'élution de la purification du lumicanne en chromatographie échangeuse d'ion.
(B) Analyse des fractions d'élution par Western immunoblotting.
- Figure 35 :** (A) Profil d'élution de la purification du lumicanne en chromatographie d'immunoaffinité.
(B) Analyse des fractions d'élution par Western immunoblotting.
- Figure 36 :** Purification du lumicanne glycosylé par chromatographie d'ion métal-affinité – Analyse des fractions éluées par Western immunoblotting.
- Figure 37 :** Effet du lumicanne Hlum 37 sur la migration de trois lignées de mélanome.
- Figure 38 :** Effet réversible du lumicanne sur les cellules A375.
- Figure 39 :** Effet du lumicanne glycosylé (Hlum 57) sur l'adhésion des cellules de mélanome A375.
- Figure 40 :** Effet du lumicanne glycosylé (Hlum 57) sur la migration des cellules de mélanome A375.
- Figure 41 :** (A) Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'inactivation de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ (gène ITGA2).
(B) Quantification de l'inactivation de l'expression du gène ITGA2.

- Figure 42 :** Analyse par immunocytofluorescence de l'expression protéique de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$.
- Figure 43 :** Effet du lumicanne sur la migration des cellules sialpha2.
- Figure 44 :** (A) Mise en évidence de l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface des cellules CHO-A2.
(B) Adhésion des cellules CHO-WT et CHO-A2 sur le collagène et lumicanne.
- Figure 45 :** Effet du lumicanne sur la migration des cellules CHO-WT et CHO-A2.
- Figure 46 :** Interaction directe du lumicanne avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$.
- Figure 47 :** Interaction directe du lumicanne avec le domaine $\alpha 2I$.
- Figure 48 :** (A) Représentation schématique de la protéine du lumicanne et des fragments dérivés.
(B) Détection de la protéine coeur du lumicanne et des fragments L 1-9 et L 1-6 par Western immunoblotting.
- Figure 49 :** Effet des fragments L 1-9 et L 1-6 sur la migration des cellules A375.
- Figure 50 :** Alignement de la séquence protéique partielle humaine de quatre SLRP (lumicanne (Lum), fibromoduline (Fib), décorine (Dec) et biglycane (Big)) incluant les LRR 7 à 9.
- Figure 51 :** (A) Séquence et localisation des différents peptides synthétiques utilisés au cours de cette étude.
(B) Vue de la face concave du lumicanne.
- Figure 52 :** Effet dose-réponse du peptide 9 sur la migration des cellules de mélanome A375.
- Figure 53 :** Effet des peptides 5 et 11 sur la migration des cellules de mélanome A375.
- Figure 54 :** Effet du peptide 9 sur la migration des trois lignées de mélanome A375, B16F1 et HT144.
- Figure 55 :** Effet de lumcorin sur l'adhésion des cellules de mélanome au lumicanne.
- Figure 56 :** Effet des fragments L 1-9 et L 1-6 sur l'adhésion des cellules A375.
- Figure 57 :** Effet de lumcorin sur la migration des cellules A375 en présence de collagène.
- Figure 58 :** Effet de lumcorin sur l'adhésion des cellules A375 au collagène.
- Figure 59 :** Effet du peptide 8 sur la migration des cellules A375 et B16F1.
- Figure 60 :** Effet du mélange lumcorine et peptide 8 sur la migration des cellules A375.
- Figure 61 :** Analyse de l'effet de lumcorin sur la phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK par Western immunoblotting.
- Figure 62 :** Séquence des peptides dérivés du LRR 9 du lumicanne et de la fibromoduline.

- Figure 63 :** Effet des peptides dérivés de lumcorin sur la migration des cellules A375.
- Figure 64 :** Comparaison de l'effet entre lumcorin et le peptide dérivé du LRR 9 de la fibromoduline sur la migration des cellules A375.
- Figure 65 :** Comparaison de l'effet entre le peptide L9M et F9M sur la migration des cellules A375.
- Figure 66 :** Effet des formes mutantes du lumicanne sur la migration des cellules A375.
- Figure 67 :** Effet du lumicanne sur la migration en Transwell[®] des fibroblastes dermiques.
- Figure 68 :** (A) Trajectoires des fibroblastes au cours de la migration.
(B) Analyse de la vitesse de migration des fibroblastes dermiques.
- Figure 69 :** (A) Trajectoires des cellules HUVEC au cours de la migration sur lumicanne.
(B) Analyse de la vitesse de migration des cellules HUVEC.
- Figure 70 :** (A) Trajectoires des cellules CSM au cours de la migration sur lumicanne.
(B) Analyse de la vitesse de migration des cellules CSM.
- Figure 71 :** (A) Trajectoires des cellules CSM au cours de la migration en présence de lumcorin.
(B) Analyse de la vitesse de migration des CSM.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I :** Les différents types de collagènes.
- Tableau II :** Les principales glycoprotéines de la matrice extracellulaire.
- Tableau III :** Les différents types de glycosaminoglycannes.
- Tableau IV :** Classification des principaux protéoglycannes.
- Tableau V :** Régulation de l'expression de la décorine, du biglycane et du lumicanne.
- Tableau VI :** Gènes associés à un risque héréditaire de mélanome.
- Tableau VII :** Classement des intégrines selon leur relation avec leur principal ligand.
- Tableau VIII :** Ligands du domaine cytoplasmique de la sous-unité d'intégrine $\beta 1$.

LISTE DES VIDEOS

Les vidéos se trouvent sur le CD-ROM ci-joint. Toutes les vidéos sont au format .avi, compatible entre autre avec le lecteur Windows Media Player. Le nom des fichiers des différentes vidéos est détaillé ci-dessous.

- Vidéo 1 :** Adhésion des cellules A375 sur fibronectine.
- Vidéo 2 :** Adhésion des cellules A375 sur collagène.
- Vidéo 3 :** Adhésion des cellules A375 sur BSA.
- Vidéo 4 :** Adhésion des cellules A375 sur Hlum 37.
- Vidéo 5 :** Adhésion des cellules A375 sur Hlum 57.
- Vidéo 6 :** Migration (wound-healing) des fibroblastes dermiques - Contrôle.
- Vidéo 7 :** Migration (wound-healing) des fibroblastes dermiques – Peptide 9 scramble.
- Vidéo 8 :** Migration (wound-healing) des fibroblastes dermiques - Lumcorin.
- Vidéo 9 :** Migration (aléatoire) des cellules HUVEC – Contrôle.
- Vidéo 10 :** Migration (aléatoire) des cellules HUVEC – Lumicanne.
- Vidéo 11 :** Migration (wound-healing) des cellules HUVEC – Contrôle.
- Vidéo 12 :** Migration (wound-healing) des cellules HUVEC – Peptide 9 scramble.
- Vidéo 13 :** Migration (wound-healing) des cellules HUVEC – Lumcorin.
- Vidéo 14 :** Migration (aléatoire) des cellules CSM – Contrôle.
- Vidéo 15 :** Migration (aléatoire) des cellules CSM – Lumicanne.
- Vidéo 16 :** Migration (wound-healing) des cellules CSM – Contrôle.
- Vidéo 17 :** Migration (wound-healing) des cellules CSM – Peptide 9 scramble.
- Vidéo 18 :** Migration (wound-healing) des cellules CSM – Lumcorin.

Liste des Publications

Et

Communications

LISTE DES PUBLICATIONS

Brézillon S, Zeltz C, Schneider L, Terry C, Vuillermoz B, Ramont L, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.
J Physiol Pharmacol 2009; 60 suppl4: xxx-xxx.

Zeltz C, Brézillon S, Perreau C, Ramont L, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumcorin: a leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration.
FEBS Lett 2009; 583: 3027-32.

Brézillon S, Radwanska A, Zeltz C, Malkowski A, Ploton D, Bobichon H, Perreau C, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart F.X, Wegrowski Y.
Lumican core protein inhibits melanoma cell migration via alterations of focal adhesion complexes.
Cancer Lett 2009; 283: 92-100.

LISTE DES PUBLICATIONS SOUS FORME DE RESUME

Zeltz C, Brezillon S, D'Onofrio MF, Perreau C, Franz C, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumcorin : a leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration.
Oncology, 11:suppl2, S64, 2009

Brezillon S, Schneider L, Terryn M, Vuillermoz B, Ramont L, **Zeltz C**, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Maquart FX, Wegrowsky Y.
Lumican inhibits B16F1 melanoma cell-induced lung metastasis.
Oncology, 11:suppl2, S40, 2009

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

Zeltz C, Brézillon S, Perreau C, Heino J, Franz CM, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumcorin : a leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration. Third Berder meeting “Targeting and imaging of tumor microenvironment”, Berder, September 23rd-26th 2009.

Brézillon S, **Zeltz C**, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.

Third Berder meeting “Targeting and imaging of tumor microenvironment”, Berder, September 23rd-26th 2009.

Brézillon S, **Zeltz C**, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.

9th Jenner Glycobiology and Medecine Symposium, Bruxelles, Belgique, 13-15 September 2009.

Zeltz C, Brézillon S, Perreau C, Heino J, Franz CM, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumcorin : a leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration.

2nd Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies and 26th CARD, Reims, 3-5 Juin 2009.

Brézillon S, **Zeltz C**, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.

1er Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie, Nancy, France, 19-20 mars 2009.

Zeltz C, Brézillon S, Perreau C, Heino J, Franz CM, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumcorin : un peptide dérivé du LRR 9 du lumicanne humain inhibe la migration du mélanome.

Journée « Jeunes Chercheurs » de l’IFR 53, Reims, 2009.

Zeltz C, Brézillon S, Perreau C, Maquart FX, Wegrowski Y.

Le peptide dérivé du LRR 9 du lumicanne humain inhibe la migration du mélanome

Journée « Jeunes Chercheurs » de l’IFR 53, Reims, 2008.

LISTE DES COMMUNICATIONS PAR VOIE D’AFFICHE

Brezillon S, Zeltz C, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-Blaszkiwicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumican inhibits B16F1 melanoma lung metastasis.
2nd Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies and 26th CARD, Reims, 3-5 Juin 2009.

Brezillon S, Radwanska A, Zeltz C, Malkowski A, Ploton D, Bobichon H, Perreau C, Malicka-Blaszkiwicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumican core protein inhibits melanoma cell migration via alterations of focal adhesion complexes.
2nd Joint Meeting of the French and German Connective Tissue Societies and 26th CARD, Reims, 3-5 Juin 2009

Zeltz C, Brézillon S, D’Onofrio MF, Perreau C, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumcorin: a leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration.
1er Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie, Nancy, 19-20 Mars 2009.

Zeltz C, Brézillon S, D’Onofrio MF, Perreau C, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumcorin: a leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration.
Réunion annuelle de l’axe IV, IGBMC, Illkirch, France, 29 Janvier 2009.

Brezillon S, Zeltz C, Schneider L, Terryn C, Vuillermoz B, Ramont L, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-Blaszkiwicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.
Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.
Réunion annuelle de l’axe IV, IGBMC, Illkirch, France, 29 Janvier 2009.

Zeltz C, Brézillon S, D’Onofrio MF, Perreau C, Maquart FX, Wegrowski Y.
Un peptide dérivé du LRR9 du lumicanne humain inhibe la migration des cellules de mélanome.
2^{ème} forum du Cancéropôle Grand-Est, Vittel, 17 Octobre 2008.

Brézillon S, Schneider L, Vuillermoz B, Ramont L, Zeltz C, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Maquart FX, Wegrowski Y.
Le lumicanne humain recombinant inhibe le développement des métastases pulmonaires induites par les cellules de mélanome B16F1.
2^{ème} forum du Cancéropôle Grand-Est, Vittel, 17 Octobre 2008.

Brézillon S, Radwanska A, **Zeltz C**, Perreau C, Maquart FX, Malicka-Blaskiewicz M, Wegrowski Y.

Lumican core protein inhibits melanoma cells migration via changes of focal adhesion complexes.

Gordon Research Conference on Proteoglycans, 6-11 Juillet 2008.

Brézillon S, Radwanska A, **Zeltz C**, D'Onofrio MF, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

Mechanism of melanoma cell adhesion to lumican.

XXI Meeting of the FECTS, Marseille, 9-13 Julil 2008.

Introduction

Le mélanome est un cancer de la peau très agressif, qui se développe au dépens des mélanocytes. L'étape la plus cruciale au cours du processus cancéreux est l'invasion tumorale. L'invasion des cellules de mélanome va générer des métastases au niveau d'autres organes distants, signe d'un mauvais pronostic de survie.

La migration est une fonction cellulaire impliquée dans de nombreux processus tels que la cicatrisation, l'inflammation et l'invasion tumorale. La migration des cellules adhérentes est induite le plus souvent par l'interaction de la cellule à un substrat de la matrice extracellulaire. Ce phénomène implique des récepteurs aux protéines matricielles, les intégrines.

Le lumicanne est une protéine matricielle qui appartient à la famille des petits protéoglycannes riches en leucine (SLRP), incluant la décorine, le biglycane et la fibromoduline. Le rôle physiologique du lumicanne est la régulation de la fibrillogenèse du collagène de type I. Bien que le lumicanne soit un protéoglycane au niveau de la cornée, il est exprimé sous forme glycosylé dans le derme. Diverses études ont montré que le lumicanne jouait également un rôle lors de pathologies cancéreuses.

Notre équipe travaille sur la relation entre le lumicanne et le mélanome. Nous avons précédemment démontré que le lumicanne inhibait la progression du mélanome *in vivo* (Vuillermoz et coll. 2004). Les cellules de mélanome sont capables d'adhérer au lumicanne (D'Onofrio et coll. 2008), ce qui entraîne un remodelage de leur cytosquelette, perturbant ainsi leur migration (Brézillon et coll. 2009). Cependant, certains mécanismes impliqués dans l'inhibition de la migration par le lumicanne restait à élucider.

Dans le premier chapitre de notre étude, nous montrons la production du lumicanne sous forme glycosylé et la comparaison de ses effets à ceux de la protéine cœur, sur les cellules de mélanome.

Dans le second chapitre, nous montrons une interaction directe entre le lumicanne et son médiateur, que nous avons identifié, impliqué dans l'inhibition de la migration cellulaire.

Dans le troisième chapitre, nous caractérisons une séquence active responsable de l'inhibition de la migration des cellules de mélanome par le lumicanne, ainsi que les acides aminés impliqués.

Dans le quatrième et dernier chapitre, nous présentons l'aptitude de la séquence active du lumicanne à réguler la migration de cellules normales impliquées dans la pathologie cancéreuse.

Généralités

CHAPITRE I : LA PEAU ET LE MELANOME

1- Structure de la peau

La peau est un organe enveloppant le corps humain ; elle est en continuité avec les muqueuses recouvrant les cavités naturelles de l'organisme. Il s'agit de l'organe le plus lourd chez l'être humain, représentant environ 3 % du poids de l'organisme et une surface de 2 m² chez un adulte normal. L'épaisseur de la peau est dite épaisse ou fine suivant l'épaisseur de son épiderme, mais l'épaisseur de l'hypoderme est également très variable.

La peau, ses annexes (les phanères, les glandes exocrines) et les récepteurs sensitifs présentent de nombreuses fonctions, parmi elles, un rôle de protection, de thermorégulation, une fonction sensorielle, d'échange et des fonctions métaboliques.

Au niveau structural, la peau est subdivisée en quatre régions superposées qui sont, de la profondeur vers la surface (figure 1) (Prost-Squarcioni et coll. 2005):

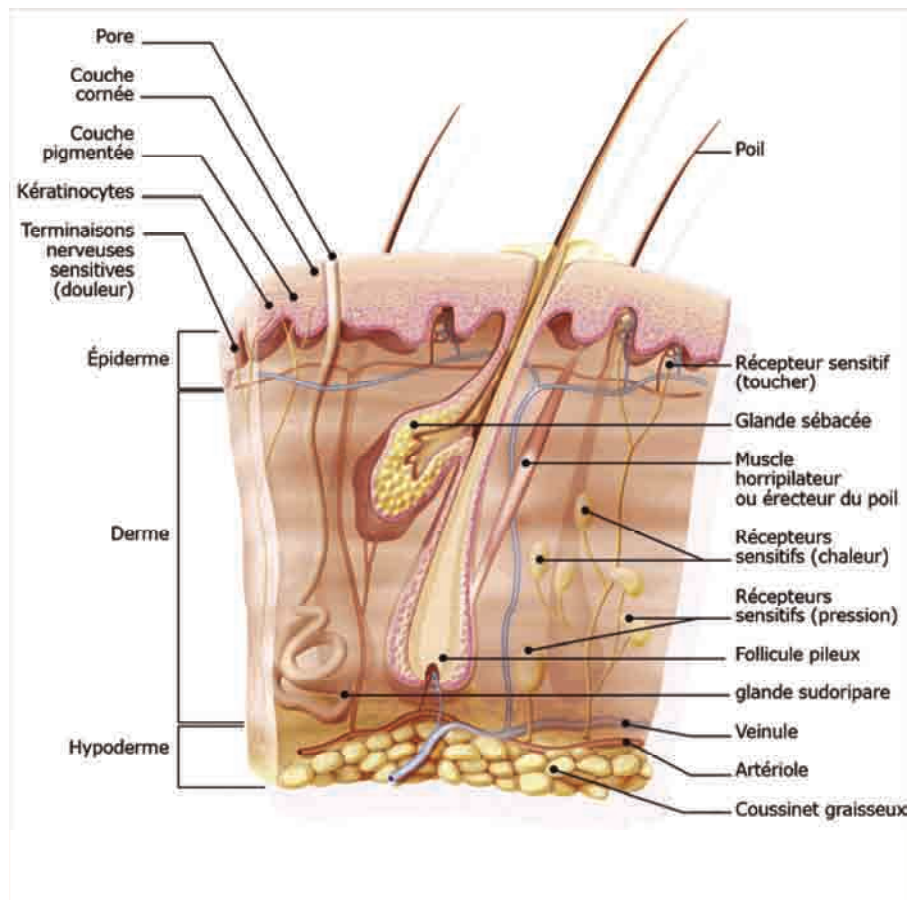
- L'hypoderme
- Le derme
- La jonction dermo-épidermique
- L'épiderme

Les annexes de la peau qui proviennent de l'épiderme embryonnaire, sont situées dans le derme et l'hypoderme.

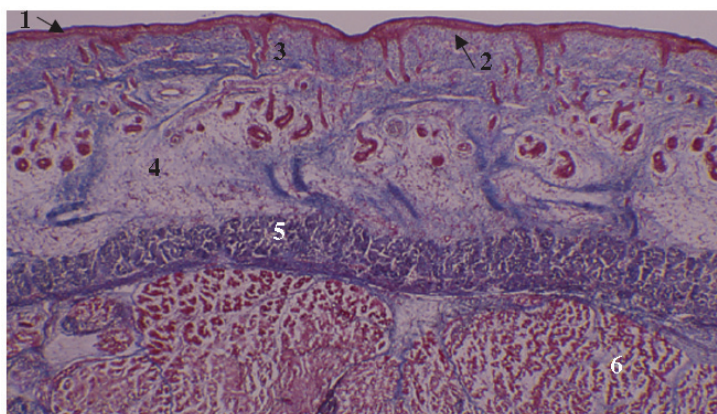
1.1- L'hypoderme

L'hypoderme est constitué de lobules graisseux séparés par des septums interlobulaires conjonctivo-élastiques, permettant le passage des vaisseaux et des nerfs destinés au derme. L'épaisseur du tissu adipeux varie selon les régions du corps et le sexe, mais l'hypoderme est absent des paupières, des oreilles et des organes génitaux masculins. Le tissu adipeux blanc de l'hypoderme est constitué d'adipocytes à vésicule uniloculaire. Ces cellules constituent un réservoir énergétique en participant à la lipogenèse et à la lipolyse : elles synthétisent les triglycérides, les stockent et les dégradent pour libérer des acides gras. De plus, *via* leur regroupement, elles assurent un rôle dans la protection mécanique. Les adipocytes bruns (à vésicules multiloculaires), présent chez le nouveau-né, participent à la thermogénèse.

A



B



- 1 = épiderme
- 2 = jonction dermo-épidermique
- 3 = derme
- 4 = hypoderme
- 5 = aponévrose
- 6 = tissu musculaire

Figure 1 : Structure de la peau.

(A) Représentation schématique d'une coupe de la peau. Disponible à partir URL : http://www.santea.com/gp/santea/gp/au_quotidien/le_corps_humain/infectiologie/structure_de_la_peau. (B) Coupe histologique d'une peau fœtale (d'après Prost-Squarcioni et coll. 2005).

1.2- Le derme

De même que l'hypoderme, le derme est un tissu conjonctif, richement vascularisé et innervé. Il est subdivisé en deux zones, le derme papillaire, jouté à la jonction dermo-épidermique (JDE) et qui présente un tissu conjonctif lâche, et le derme réticulaire, qui se continue sans limite franche avec l'hypoderme et qui est formé d'un tissu conjonctif dense. La composante matricielle du derme est composée d'un réseau élastique, de fibres de collagène et de réticuline et également de protéoglycannes et de glycosaminoglycannes (GAG) comme l'acide hyaluronique.

Les cellules, qui sont plus abondantes dans le derme papillaire que dans le derme réticulaire, forment deux populations : une population fixe, définie par les fibroblastes et fibrocytes, et une population de cellules mobiles d'origine hématopoiétique, les mastocytes et macrophages entre autres. Les fibroblastes, qui sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire ont une activité intense au cours de la cicatrisation. Ces cellules participent au renouvellement du collagène et des fibres élastiques, notamment par sécrétion de métalloprotéases.

Outre son rôle dans la cicatrisation, le derme a une fonction importante dans la thermorégulation et l'élimination des déchets toxiques de l'organisme. Il prend également en charge la nutrition de l'épiderme par diffusion.

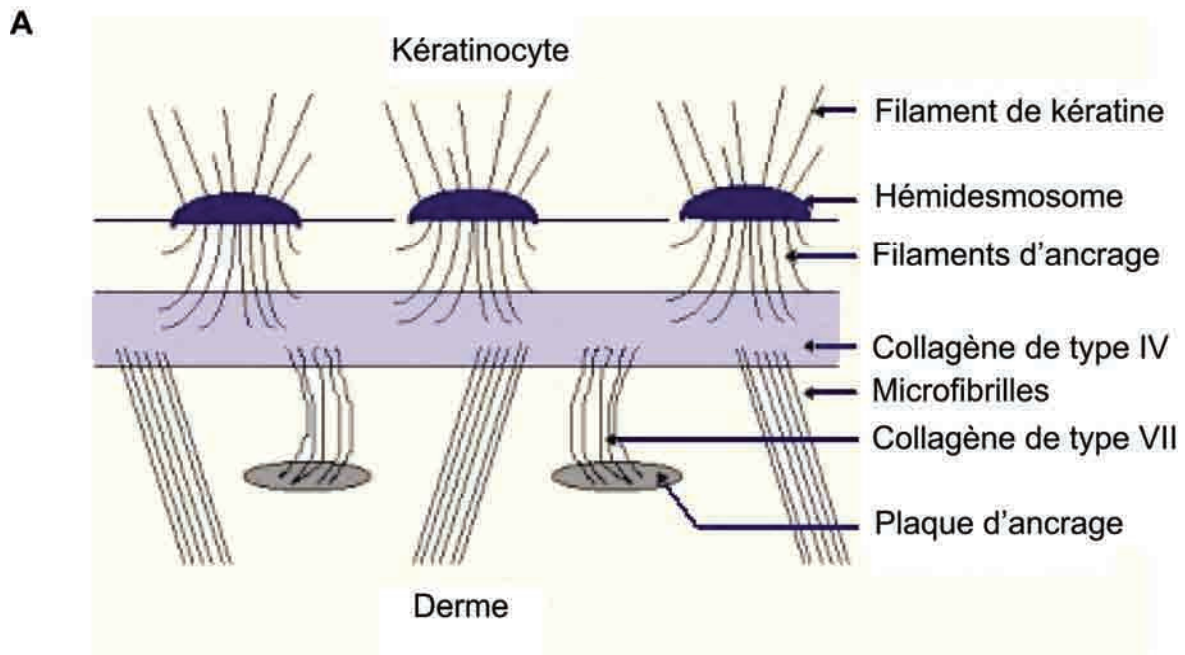
1.3- La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique joue un rôle essentiel dans l'adhésion du derme à l'épiderme. C'est une membrane basale qui forme une barrière entre le derme et l'épiderme, limitant ainsi les échanges de molécules et de cellules entre ces deux couches. Le franchissement de la membrane basale par des cellules est le plus souvent pathologique. De plus, la JDE va servir de support pour la migration des kératinocytes lors des processus de cicatrisation. Au niveau des kératinocytes, la solidité mécanique du tissu est assuré par des complexes d'ancrage de l'épiderme sur le derme, formés par un hémidesmosome et des filaments d'ancrage.

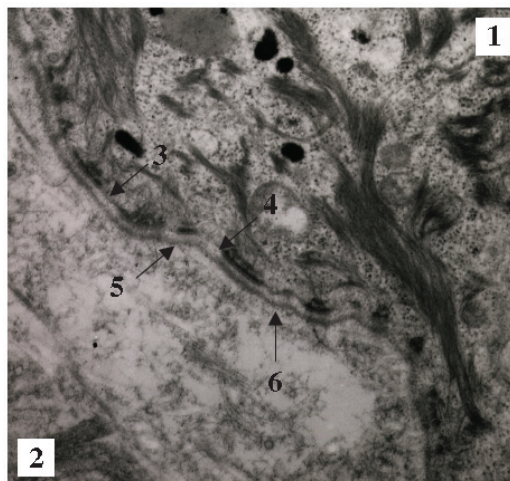
Lorsque la JDE est examinée en microscopie électronique, deux structures sont observées, du derme vers l'épiderme (figure 2):

- La *lamina densa*, de 30 à 60 nm d'épaisseur, synthétisée par les cellules basales de l'épiderme et composée de collagène de type IV, de fibres d'ancrage de collagène de type VII, de laminine 1, de nidogènes et de protéoglycannes.

- La *lamina lucida*, de 20 à 40 nm d'épaisseur, traversée par les filaments d'ancrages constitués de collagène de type VII.



B



1 = épiderme, 2 = derme, 3 = membrane cytoplasmique, 4 = *lamina lucida*, 5 = *lamina densa*, 6 = zone des fibrilles d'ancrage

Figure 2 : Structure de la jonction dermo-épidermique.

(A) Représentation schématique des complexes d'ancrages. Disponible à partir URL : <http://alsim.chez-alice.fr/Intro.html>. (B) Coupe en microscopie électronique à faible grossissement de la JDE (d'après Prost-Squarcioni et coll. 2005).

1.4- L'épiderme

L'épiderme, épithélium stratifié, pavimenteux et kératinisé, est la couche superficielle de la peau. L'épiderme n'est irrigué par aucun vaisseau sanguin et lymphatique, mais contient en revanche de nombreuses terminaisons nerveuses libres. Il est constitué de quatre types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules immunocompétentes (cellules de Langerhans et lymphocytes $\gamma\delta$) et les cellules de Merkel (figure 3).

Les kératinocytes représentent 80 % de la population cellulaire de l'épiderme. Ces cellules vont subir des modifications lors de leur différenciation de la profondeur vers la surface de l'épiderme, lui donnant sa morphologie en couches stratifiées (figure 4). L'épiderme est ainsi défini en quatre couches continues, de la profondeur vers la surface :

- La couche basale, *Stratum basale*, où les kératinocytes, de forme cylindrique et allongée, forment une seule assise de cellules. C'est au niveau de cette strate que les cellules se divisent.
- La couche épineuse, *Stratum spinosum*, où les kératinocytes deviennent polygonaux et leur noyau s'arrondissant (5 à 10 assises). Les kératinocytes sont liés entre eux par des desmosomes.
- La couche granuleuse, *Stratum granulosum*, où le noyau et le cytoplasme des kératinocytes s'aplatissent (1 à 3 assises). Il y a apparition de granulations basophiles dans le cytoplasme.
- La couche cornée, *Stratum corneum*, où les kératinocytes sont aplatis, anucléés et kératinisés, devenant ainsi des cornéocytes. Au niveau superficiel, les kératinocytes perdent leur cohésion avec les cellules voisines et desquament.

Les mélanocytes sont la deuxième population cellulaire présente dans l'épiderme. Ils apparaissent comme des cellules dendritiques et sont uniquement localisés dans la couche basale de l'épiderme, où leur fonction est la synthèse des pigments naturels de la peau : les mélanines. Les mélanines, phéomélanines et eumélanines, sont synthétisées dans des organites spécialisés, les mélanosomes qui vont ensuite être transférés aux kératinocytes voisins pour protéger le matériel génétique de l'effet mutagène des rayons ultraviolet.

Les cellules de Langerhans, 3 à 8 % des cellules épidermiques, sont des cellules dendritiques mobiles, présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques (Boulais et Misery 2008).

Les cellules de Merkel sont des cellules neuro-épithéliales produisant des neuromédiateurs. Ces cellules paraissent être excitables, capables de transduire des stimuli

vers plusieurs nerfs sensoriels. Ils agissent directement ou indirectement dans la fonction du tact, mais leur implication dans d'autres fonctions cutanées reste à être élucidée (Boulais et Misery 2008).

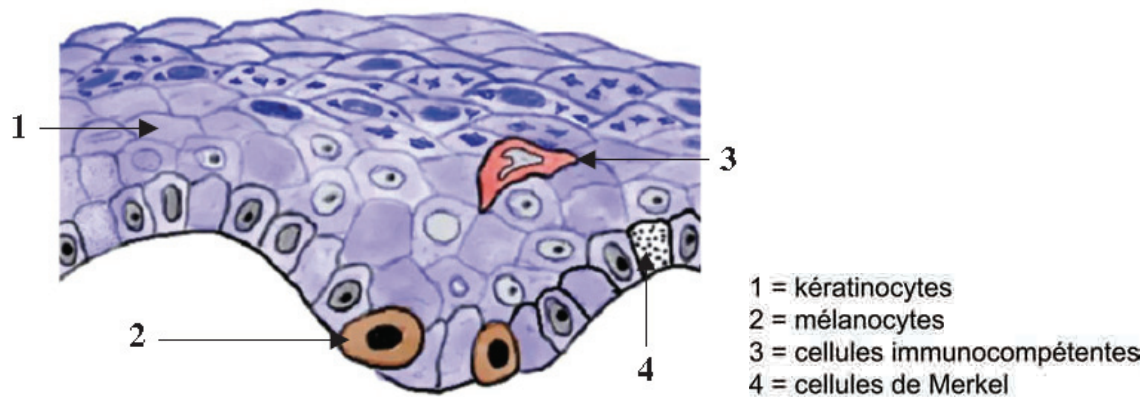


Figure 3 : Les quatre populations cellulaires de l'épiderme (d'après Prost-Squarcioni et coll. 2005).

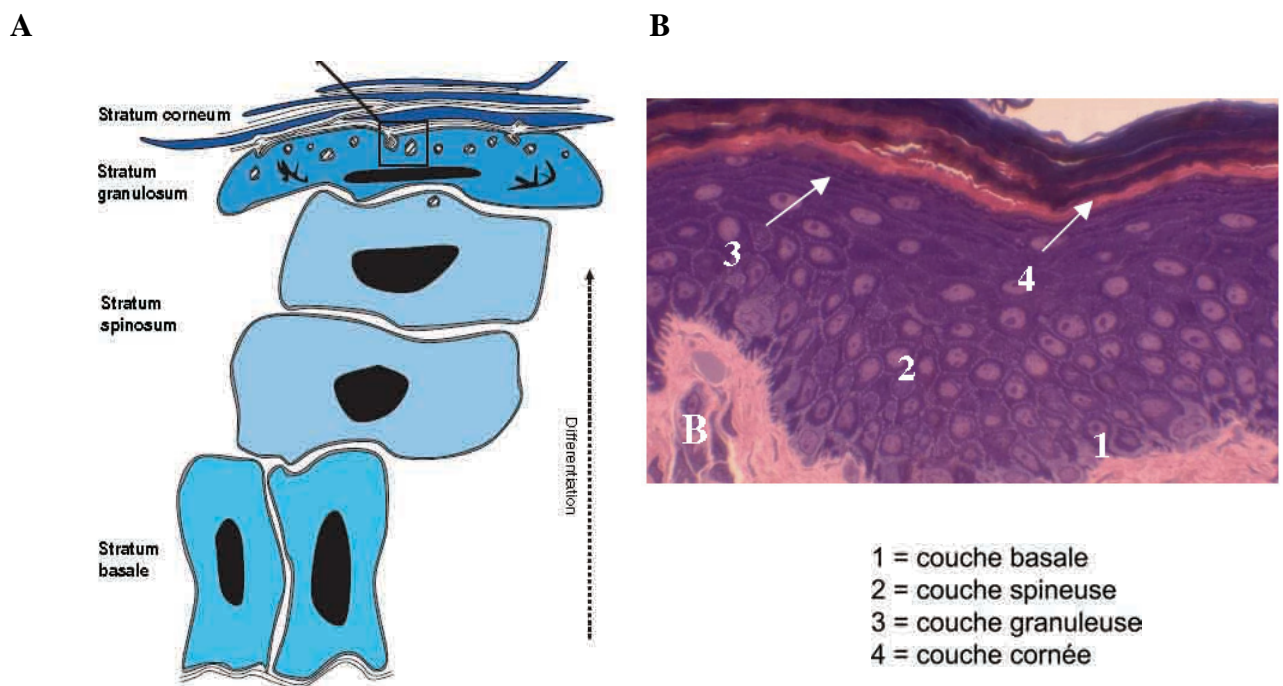


Figure 4 : Structure de l'épiderme.

(A) Représentation schématique des différentes strates épidermiques (d'après Proksch et coll. 2008). (B) Coupe histologique d'une peau épaisse (d'après Prost-Squarcioni et coll. 2005).

2- La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un tissu conjonctif, réseau complexe de collagènes, glycoprotéines, élastine et protéoglycannes. L'arrangement et la concentration des différentes macromolécules donnent une grande diversité de MEC. Ces constituants sont synthétisés par les cellules mésenchymateuses comme les fibroblastes au niveau du derme. Les cellules vont générer une MEC très ordonnée pour les entourer et les supporter. La MEC va ensuite jouer un rôle essentiel dans la survie, la prolifération et la migration de ces cellules (Vakonakis et Campbell 2007).

La MEC est continuellement remodelée par des enzymes de dégradation telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP). Cette famille qui comprend au moins 21 membres, présente la faculté de dégrader virtuellement toutes les molécules matricielles. L'activité des MMP est en partie régulée par des inhibiteurs spécifiques, les TIMP (Hornebeck et coll. 2003). Il existe une balance entre la synthèse et la dégradation de la MEC, et un déséquilibre de ce système peut conduire à des pathologies.

Les MMP, par dégradation des protéines de la MEC, vont libérer des peptides qui peuvent eux-mêmes induire de nouveaux signaux pour les cellules environnantes. Le terme de matrikine désigne de tels peptides dérivés de la MEC, dotés d'activités régulatrices cellulaires (Maquart et coll. 1999). Les matricryptines, elles, contiennent des sites cryptiques qui ne seront actifs qu'une fois exposés, après une modification structurale ou conformationnelle (Tran et coll. 2005).

2.1- Les collagènes

Les collagènes sont l'élément structural principal de la MEC. Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale et biologique des tissus et organes comme la peau (Kolacna et coll. 2007).

Tous les membres de la famille des collagènes sont caractérisés par la formation d'une triple hélice due à l'association de trois chaînes peptidiques. L'assemblage en triple hélice nécessite un résidu glycine tous les trois résidus d'acides aminés des chaînes polypeptidiques. Ceci résulte en une structure répétée $(\text{Gly-X-Y})_n$ qui caractérise les domaines collagéniques des collagènes. Les positions X et Y sont souvent occupées par une proline et une hydroxyproline. La quantité de 4-hydroxyproline est essentielle pour la formation de ponts hydrogènes intramoléculaires et contribue ainsi à la stabilité de la conformation en triple hélice. Pour les collagènes dits mineurs, les domaines collagéniques (hélicoïdaux) sont

alternés avec des domaines non collagéniques (non hélicoïdaux). Des interruptions au niveau de la triple hélice peuvent causer des flexibilités intramoléculaires et permettent des clivages protéolytiques spécifiques. Les triples hélices natives sont particulièrement résistantes à presque toutes les protéases (Gelse et coll. 2003).

Actuellement, vingt huit types de collagènes ont été décrits (tableau I). Basé sur leur structure et leur organisation supramoléculaire, les collagènes ont été regroupés en sous-famille :

- Les collagènes fibrillaires, représentant presque 90 % des collagènes totaux.
- Le collagène de membranes basales (collagène IV).
- Le collagène microfibrillaires (collagène VI).
- Les filaments d'ancrage (collagène VII).
- Les collagènes à réseau hexagonal.
- Les collagènes FACIT (Fibril-Associated with Interrupted Triple helices)
- Les collagènes transmembranaires.
- Les multiplexines.

Certaines matrikines issues de collagène possèdent des activités biologiques. C'est le cas du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(\text{IV})$ du collagène IV (Pasco et coll. 2000) et du collagène XIX (Ramont et coll. 2007) qui inhibent la progression du mélanome.

2.2- Les glycoprotéines matricielles

Les glycoprotéines de la MEC possèdent des structures et des propriétés biologiques très variées. Elles jouent un rôle à la fois structural et fonctionnel, dans l'organisation de la matrice et dans l'adhésion des cellules à cette matrice. Ces protéines ont également un rôle dans la migration, la prolifération cellulaire et la différenciation. Les glycoprotéines les mieux caractérisées sont la fibronectine, les ténascines, les laminines, les thrombospondines et l'ostéonectine (Culav et coll. 1999).

La fibronectine joue un rôle dans l'adhésion cellule-matrice *via* les intégrines. Les ténascines sont aussi impliquées dans l'adhésion cellulaire et les laminines contribuent à la structure de la membrane basale (tableau II).

Plusieurs matrikines issues de certaines glycoprotéines matricielles ont été identifiées pour leur capacité à réguler des fonctions cellulaires (Maquart et coll. 2005).

Tableau I : Les différents types de collagènes (d'après Gelse et coll. 2003 ; Veit et coll. 2006).

Type	Composition moléculaire	Localisation génomique	Distribution tissulaire
Collagènes fibrillaires			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31-q22) COL1A2 (7q22.1)	ubiquitaire
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11-q13.2)	cartilage, corps vitreux,
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	peau, vaisseaux, fibres réticulaires
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2-q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	poumon, cornée, os, membranes fœtales
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI) \alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	cartilage, corps vitreux
XXIV	$[\alpha 1(XXIV)]_3$	COL24A1 (1p22.3)	os, cartilage, cornée, peau
XXVII	$[\alpha 1(XXVII)]_3$	COL27A1 (9q32)	cartilage, œil, poumon
Collagènes de la membrane basale			
IV	Forme prédominante : $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 6 sous-unités $\alpha 1-\alpha 6$ forment molécule hétérodimérique	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36-q37) COL4A4 (2q36-q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	membranes basales
Collagènes microfibrillaires			
VI	$\alpha 1(VI)\alpha 2(VI)\alpha 3(VI)$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	derme, cartilage, placenta, poumon, vaisseaux, disque intervertébral
Filaments d'ancrage			
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	COL7A1 (3p21.3)	peau, jonction dermo-épidermique

Type	Composition moléculaire	Localisation génomique	Distribution tissulaire
Collagènes à réseau hexagonal			
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2\alpha 2(\text{VIII})$	COL8A1 (3q12-q13.1) COL8A2 (1p34.3-p32.3)	cellules endothéliales, membrane de Descemet de l'œil
X	$[\alpha 3(\text{X})]_3$	COL10A1 (6q21-q22.3)	cartilage hypertrophique
Collagènes FACIT			
IX	$\alpha 1(\text{IX})\alpha 2(\text{IX})\alpha 3(\text{IX})$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33-p32.2) COL9A3 (20q13.3)	cartilage, cornée, corps vitreux
XII	$[\alpha 3(\text{XII})]_3$	COL12A1 (6q12-q13)	derme, os, tendon, ligament
XIV	$[\alpha 3(\text{XIV})]_3$	COL14A1 (8q23)	derme, foie, poumon, vaisseaux, placenta
XIX	$[\alpha 3(\text{XIX})]_3$	COL19A1 (6q12-q14)	cerveau, œil, testicule
XX	$[\alpha 3(\text{XX})]_3$	COL20A1 (20q13.33)	cartilage, tendon, cornée, peau
XXI	$[\alpha 3(\text{XXI})]_3$	COL21A1 (6p12.3-p11.2)	vaisseaux sanguins
XXVI	$[\alpha 3(\text{XXVI})]_3$	COL26A1 (7q22.1)	ovaire, testicule
Collagènes transmembranaires			
XIII	$[\alpha 3(\text{XIII})]_3$	COL13A1 (10q22)	épiderme, intestin, foie, poumon
XVII	$[\alpha 3(\text{XVII})]_3$	COL17A1 (10q24.3)	jonction dermo-épidermique
XXIII	$[\alpha 3(\text{XXIII})]_3$	COL23A1 (5q35.3)	os, cartilage, cornée, poumon
XXV	$[\alpha 3(\text{XXV})]_3$	COL25A1 (4q25)	cerveau
Multiplexines			
XV	$[\alpha 3(\text{XV})]_3$	COL15A1 (9q21-q22)	fibroblastes, pancréas, rein, muscle lisse
XVI	$[\alpha 3(\text{XVI})]_3$	COL16A1 (1p34)	fibroblastes, kératinocytes
XVIII	$[\alpha 3(\text{XVIII})]_3$	COL18A1 (21q22.3)	poumon, foie
Collagènes résiduels			
XXII	$[\alpha 3(\text{XXII})]_3$	COL22A1 (8q24.23)	cartilage, tendon
XXVIII	$[\alpha 3(\text{XXVIII})]_3$	COL28A1 (7p21.3)	peau, poumon, cœur

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-MEC Migration cellulaire Chimiotactisme Liaison aux intégrines, héparine, héparane-sulfate, facteur XIII de la coagulation, collagène et fibrine
Laminines	Adhérence cellule-membrane basale Liaison aux intégrines, collagène IV, protéoglycannes, nidogène
Nidogène	Adhérence cellule-MEC Liaison aux laminines, collagène IV
Ostéonectine	Régulation de la prolifération des cellules endothéliales, du dépôt et de l'assemblage des protéines de la MEC Stimulation de l'angiogenèse
Tenascines	Liaison aux protéoglycannes, fibronectine, intégrines Propriétés adhésives/anti-adhésives impliquées dans les phénomènes de migration cellulaire selon le type cellulaire
Thrombospondines	Molécules adhésives ou anti-adhésives selon le type cellulaire 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, glycosaminoglycannes

2.3- L'élastine

L'élastine est l'élément central des fibres élastiques de la MEC, responsable de leur élasticité. Il s'agit d'une protéine insoluble, hydrophobe et amorphe, qui est associée à une composante microfibrillaire, le plus souvent glycoprotéique comme les fibrillines. Le précurseur de l'élastine, la tropoélastine, qui est une protéine soluble, est synthétisé par les

fibroblastes dans la peau. L'élastine confère la souplesse et l'élasticité aux tissus soumis à des contraintes mécaniques. Par ailleurs, l'élastine est capable de se fixer sur son récepteur, EBP (Elastin Binding Protein). EBP est essentiel lors de l'élastogénèse où il participe à l'assemblage des fibres élastiques par la déposition extracellulaire de l'élastine. Cependant, des peptides d'élastine, obtenus après dégradation de l'élastine et contenant la séquence VGVAPG, sont capables de se fixer sur EBP et induire des réponses biologiques. Ainsi, cette interaction va promouvoir l'invasion tumorale et l'angiogénèse (Duca et coll. 2004 ; Robinet et coll. 2005).

2.4- Les protéoglycannes

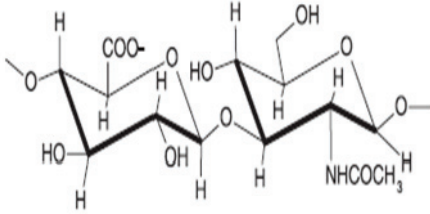
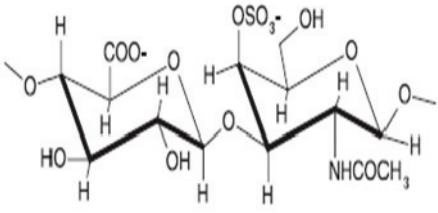
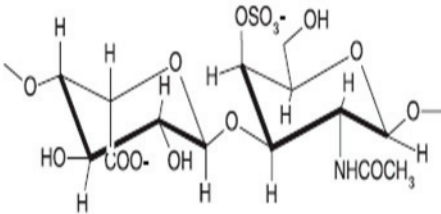
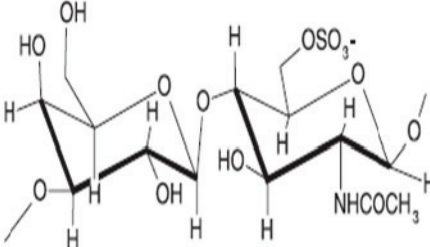
Les protéoglycannes (PG) sont synthétisés par la plupart des cellules et sont des composants ubiquitaires de la matrice extracellulaire, de la membrane basale et de la surface cellulaire. Les PG sont composés d'une protéine cœur sur laquelle sont attachés de façon covalente des chaînes linéaires de glycosaminoglycannes (Yung et Chan 2007).

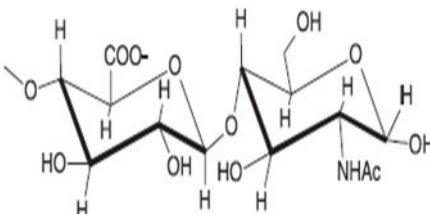
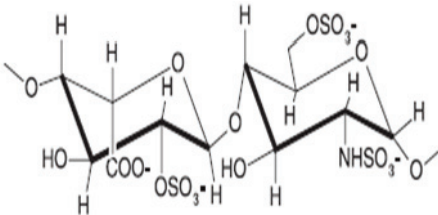
2.4.1- Les glycosaminoglycannes

Les GAG sont des molécules de carbohydrates qui interagissent avec une grande variété de protéines impliquées dans les processus biologiques et pathologiques. Les GAG sont sulfatés, chargés négativement et présentent une masse moléculaire apparente comprise entre 4000 et 100 000, excepté l'acide hyaluronique qui est non sulfaté et dont la masse moléculaire apparente peut aller jusqu'à 10^7 . Les chaînes de GAG sont composées d'une répétition d'unités disaccharidiques. Les disaccharides sont composés d'un acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) et d'un sucre aminé (D-galactosamine ou D-glucosamine). Les GAG diffèrent selon le type d'hexosamine, d'hexose ou d'acide hexuronique dont les unités sont constituées. Les sucres aminés peuvent être sulfatés sur le carbone 4 ou 6 ou sur l'azote de groupement N-acétyl (Gandhi et Mancera 2008). Il existe différents types de GAG : l'acide hyaluronique, les chondroïtines sulfates, les dermatannes sulfates, les kératannes sulfates, l'héparine et les héparannes sulfates (tableau III).

Les GAG jouent un rôle majeur dans la signalisation cellulaire et le développement, l'angiogénèse (Iozzo et coll. 2001), la progression tumorale (Timar et coll. 2002), les métastases et l'anti-coagulation. Ils sont aussi connus pour promouvoir l'invasion et la pathogénèse microbienne.

Tableau III : Les différents types de glycosaminoglycannes (d'après Gandhi et Mancera 2008). GlcA : acide glucuronique, GlcNAc : N-acétylglucosamine, GalNAc : N-acétylgalactosamine, IdoA : acide iduronique

Glycosaminoglycane	Unités disaccharidiques	Fonctions
Acide hyaluronique	 <p>D-GlcA-β(1→3)-D-GlcNAc-β(1→4)</p>	<p>Masse moléculaire 10^3-10^7 Non-sulfaté, non-covalamment attaché aux protéines de la MEC</p> <p>Présent dans le fluide synovial, l'humeur vitrée et dans la MEC des tissus conjonctifs relâchés</p>
Chondroïtine sulfate (C4S, C6S et C4,6S)	 <p>D-GlcA-β(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p>	<p>Masse moléculaire 5 000-50 000 GAG le plus abondant dans le corps Présent dans le cartilage, tendon, ligament et aorte</p> <p>Les sulfatations peuvent être portées en position 4 et/ou 6 des résidus de N-acétylgalactosamine</p>
Dermatane sulfate	 <p>L-IdoA-α(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)</p>	<p>Masse moléculaire 15 000-40 000 Présent dans la peau, les vaisseaux sanguins et les valves cardiaques</p>
Kérotane sulfate	 <p>D-Gal-β(1→4)-D-GlcNAc6S-β(1→3)</p>	<p>Masse moléculaire 4 000-19 000 GAG le plus hétérogène</p> <p>KS I est présent dans la cornée KS II est présent dans le cartilage</p>

Glycosaminoglycane	Unités disaccharidiques	Fonctions
Héparanne sulfate	 <p>D-GlcA-α(1\rightarrow4)-D-GlcNAc-α(1\rightarrow4) (unité de répétition disaccharidique majoritaire)</p>	<p>Masse moléculaire 10 000-70 000</p> <p>Acide L-iduronique: 30-50 % 2-deoxy-2-sulphamido-α-D-glucopyranosyl: 40-60 %</p> <p>Composant extracellulaire exprimé au niveau des membranes basales et comme composant ubiquitaire à la surface cellulaire</p>
Héparine	 <p>L-IdoA2S-β(1\rightarrow4)-D-GlcNS6S-α(1\rightarrow4) (unité de répétition disaccharidique majoritaire)</p>	<p>Masse moléculaire 10 000-12 000</p> <p>Acide L-iduronique: >70 % 2-deoxy-2-sulphamido-α-D-glucopyranosyl: >85 %</p> <p>Composant intracellulaire des mastocytes Présent dans la peau, le foie et les poumons</p>

2.4.2- Liaison des GAG aux protéines dans les protéoglycannes

Les chaînes de GAG, excepté l'acide hyaluronique, sont attachées covalamment à une protéine cœur, soit par une liaison O-glycosidique ou soit par une liaison N-glycosidique.

2.4.2.1- Les liaisons O-glycosidiques

La liaison des chondroïtines sulfates, des dermatannes sulfates et des héparannes sulfates se fait *via* une liaison O-glycosidique entre un xylose de la chaîne glycanique et un résidu sérine de la protéine cœur (Xyl-O-Ser). Les kératannes sulfates de type KSII retrouvés dans le cartilage sont liés à la protéine par une liaison impliquant un résidu sérine ou thréonine et une N-acétylgalactosamine (GalNAc-O-Ser/Thr) (Funderburgh 2000). Un deuxième type de liaison O-glycosidique (Man-O-Ser) pour les kératannes sulfates aurait été identifié sur un protéoglycane du cerveau (Krusius et coll. 1986).

2.4.2.2- Les liaisons N-glycosidiques

Les kératannes sulfates de type KSI, retrouvé au niveau de la cornée, se lient à la protéine cœur par une liaison N-glycosidique impliquant un résidu asparagine et une N-acétylglucosamine sur laquelle est greffé un fucose. Les chaînes glycaniques de type KSI et KSII se terminent par la greffe d'un acide sialique sur l'extrémité non réductrice de la dernière lactosamine (Funderburgh 2000).

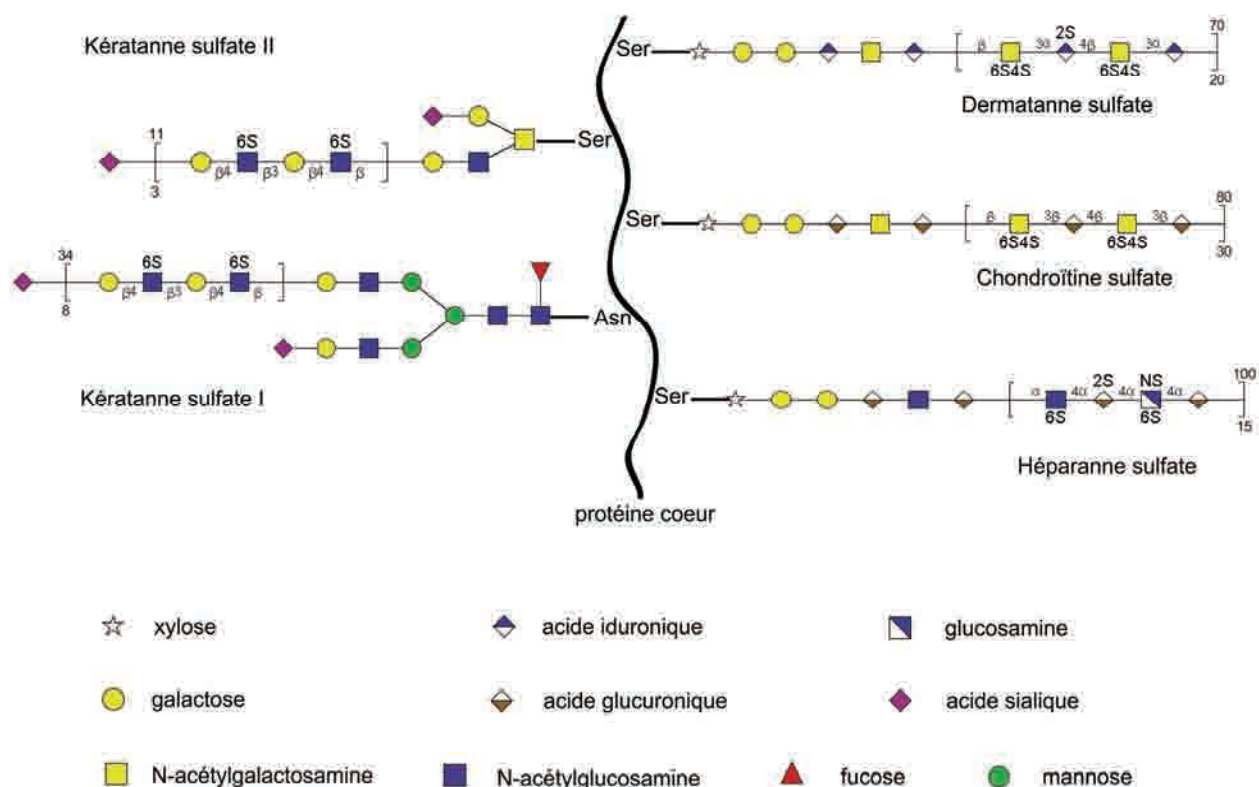


Figure 5 : Représentation des différentes liaisons GAG-protéine selon le type de GAG impliqué. La schématisation a été réalisée grâce au logiciel GlycanBuilder (Ceroni et coll. 2007). 2S, 4S, 6S et 6S4S indiquent la position des sulfates. NS : non sulfaté. Les chiffres donnés de part et d'autre des crochets indiquent le nombre minimal et maximal de répétitions du motif oligosaccharidique. (d'après Voet et Voet 1998, Funderburgh 2000).

2.4.3- Classification des protéoglycannes

La meilleure façon de classer les protéoglycannes est, à l'heure actuelle, selon leur localisation tissulaire : intracellulaire, surface cellulaire et matrice extracellulaire (tableau IV).

2.4.3.1- Les protéoglycannes intracellulaires

La serglycine est un protéoglycanne intracellulaire (granulaire) retrouvé dans les cellules hématopoïétiques et les cellules endothéliales. Il a d'importantes fonctions liées à la formation de plusieurs types de granules de stockage. Par ailleurs, ce protéoglycanne intracellulaire joue un rôle majeur dans les réactions inflammatoires. La serglycine peut-être incorporée à la MEC puisqu'elle a été décrite comme étant également un produit de sécrétion (Kolset et Tveit 2008).

2.4.3.2- Les protéoglycannes de la surface cellulaire

Deux grandes familles de protéoglycannes membranaires sont reconnues: les syndécannes et les glypicannes. Ces deux familles diffèrent par leur mode d'ancrage à la membrane cellulaire. Ainsi, les syndécannes sont transmembranaires alors que les glypicannes sont ancrés via un glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les syndécannes sont impliqués dans les interactions cellules-cellules et cellules-MEC, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (Alexopoulou et coll. 2007).

2.4.3.3- Les protéoglycannes de la matrice extracellulaire

Ils sont divisés en deux grands groupes :

- Les protéoglycannes dont la protéine cœur généralement de grande taille présente des homologies de séquence structurale avec d'autres protéines. Dans ce groupe, nous distinguons :

- les *protéoglycannes de type hyalectannes* (aggrécane, versicane, neurocane et brévécane)

Cette famille comprend fondamentalement quatre membres. L'aggrécane est le premier protéoglycanne à être caractérisé à partir du cartilage articulaire. Leur protéine cœur est organisée en trois domaines, les domaines N-terminal, central et C-terminal. Les propriétés biologiques des hyalectannes reposent sur leur caractère polyanionique

et sur les différentes interactions de leurs domaines modulaires avec la MEC et les cellules.

-les *protéoglycannes non hyalectannes*, de membrane basale (perlécane, agrine, bamacanne).

Ces protéoglycannes participent essentiellement à la structuration des membranes basales, associés à la laminine ou le collagène de type IV.

- Les protéoglycannes caractérisés par la répétition d'un motif peptidique riche en leucine (SLRP ou small leucine-rich proteoglycan).

Tableau IV : Classification des principaux protéoglycannes (d'après Praillet et coll. 1998, Iozzo 1998). CS : chondroïtine sulfate, DS : dermatanne sulfate, HS : héparanne sulfate, KS : kératanne sulfate.

Protéoglycannes		Protéine cœur (kDa)	Type de GAG (nombre)
INTRACELLULAIRES			
<i>Granulaires</i>	Serglycine	10-19	Héparine/CS
SURFACE CELLULAIRE			
<i>Transmembranaires</i>	Syndécanne-1	31	HS (3-4)
	Syndécanne-2	20	CS/DS (2)
	Syndécanne-3	28	HS (3-4)
	Syndécanne-4	20	HS (3-4)
<i>Ancrage GPI</i>	Glypicanne-1	64	HS/CS (4)
	Glypicanne-2	59	HS (5)
	Glypicanne-3	50	HS
	Glypicanne-4	57	HS
	Glypicanne-5		
	Glypicanne-6		

Protéoglycannes		Protéine cœur (kDa)	Type de GAG (nombre)
<i>Autres</i>	Thrombomoduline	57	CS
	FAT	500	HS
	NG-2	300	CS
	HIP	18	CS
	Podocalyxine-like	55	CS
	bêtaglycane	90	HS
	Neuroglycane-C	120	CS
	RPTP- β	92	CS
	Dystroglycane	153-43	
	Sarcoglycane	50	
	CD44		HS/CS
	Epicanne		KS

MATRICE EXTRACELLULAIRE

<i>type hyalectanne</i>	Aggrécane	220	CS/KS (\approx 100)
	Versicane	265-370	CS/DS (10-30)
	Neurocane	136	CS (3-7)
	Brévicanne	100	CS (1-3)
<i>non hyalectannes</i>	Perlécane	400-467	HS/CS (3)
	Agrine	250	HS (3)
	Bamacanne	138	CS (3)
<i>Petits protéoglycannes riche en leucine</i>	Décorine	36	DS/CS (1)
	Biglycane	38	DS/CS (1-2)
	Fibromoduline	42	KS (2-3)
	Lumicanne	38	KS (3-4)
	Kératocanne	38	KS (3-5)
	PRELP	44	KS (2-3)
	Ostéoadhérine	42	KS (2-3)
	Epiphycane	35	DS/CS (2-3)
	Ostéoglycine	35	KS (2-3)
	Chondroadhérine	38	
	Podocanne	95	
	Asporine	39	
	ECM2	55	
	Opticine	35	

Protéoglycannes		Protéine cœur (kDa)	Type de GAG (nombre)
<i>Autres</i>	Collagène IX		CS
	Collagène XII		CS
	Collagène XIV		CS
	Collagène XVIII		HS
	Phosphacanne	92	CS
	Testicanne	44	HS/CS (1-2)
	Claustrine	70	KS
	Bone marrow PG	20	CS

2.4.4- Les petits protéoglycannes et protéines riches en leucine (SLRP)

Les SLRP sont des protéines de la matrice extracellulaire qui comprennent plusieurs répétitions riches en leucine (LRR). Cette famille, appartenant à la superfamille des protéines riches en leucine, regroupe 17 membres, répartis en cinq classes distinctes selon plusieurs paramètres incluant la conservation et l'homologie de séquence à un niveau génomique et protéique, la présence et la séparation des quatre cystéines N-terminales et également l'organisation chromosomique (Iozzo 1999, Schaefer et Iozzo 2008), (figure 6).

2.4.4.1- Classification des SLRP

2.4.4.1.1- Les SLRP de la classe I

Dans cette classe, nous retrouvons la décorine, le biglycane et l'asporine. Les gènes codants les SLRP de la classe I des mammifères contiennent 8 exons avec des jonctions intron/exon très conservées. Cette classe est caractérisée par le *cluster* de cystéine N-terminal CX₃CXCX₆C. Alors que la décorine et le biglycane peuvent être substitués avec une ou deux chaînes de chondroïtine/dermatane sulfate, l'asporine ne possède pas le dipeptide Ser-Gly et les acides aminés requis pour la glycosylation.

2.4.4.1.2- Les SLRP de la classe II

Ce groupe, comprenant cinq membres, peut être divisé en trois sous-familles distinctes. La fibromoduline et le lumicane constituent la première sous-famille avec 48 % d'identité de la séquence protéique, le kératocane et PRELP constituent la seconde sous-famille avec 55 % d'homologie de structure, tandis que l'ostéoadhérine forme la dernière

sous-famille avec 37 à 42 % d'homologie avec les autres membres de la classe II. Leurs gènes respectifs ont une organisation exonique similaire (3 exons). Cette classe présente la séquence consensus riche en cystéine CX_3CXCX_9C . Les SLRP de la classe II contiennent un *cluster* de résidus tyrosine du côté N-terminal qui peuvent être sulfatés, qui pourrait contribuer à leur nature polyanionique. Les membres de la classe II sont substitués par des chaînes de kératane-sulfate et de polylactosamine (kératane sulfate non sulfaté).

2.4.4.1.3- Les SLRP de la classe III

Cette classe contient trois membres caractérisés par un faible nombre de LRR et une organisation génomique comprenant 7 exons. L'épiphycanne et l'ostéoglycine (mimécane) ont une homologie de séquence de seulement 40 %. Les membres de cette classe contiennent la séquence consensus N-terminal CX_2CXCX_6C . L'épiphycanne peut être substitué par des chondroïtine sulfate ou par des dermatane sulfate, l'ostéoglycine par des kératane sulfate. Bien que la plupart de ces SLRP ont une séquence consensus pour la glycosylation, certains d'entre eux existent comme glycoprotéine dans les tissus.

2.4.4.1.4- Les SLRP de la classe IV

La quatrième classe est composée de la chondroadhérine, de la nyctalopine et d'un nouveau membre, tsukushi (Ohta et coll. 2004). Cette classe de SLRP, comparée aux autres classes, n'est pas canonique. Ainsi, le cluster de cystéine N-terminal diffère entre les membres de cette classe ($CX_3CXCX_{6-17}C$).

2.4.4.1.5- Les SLRP de la classe V

Cette classe est également non canonique et contient deux gènes, le podocanne et la podocanne-like protein 1. Ces deux protéines ont un cluster riche en cystéine différent ($CX_{3-4}CXCX_9C$). Le podocanne est une glycoprotéine et non un protéoglycane.

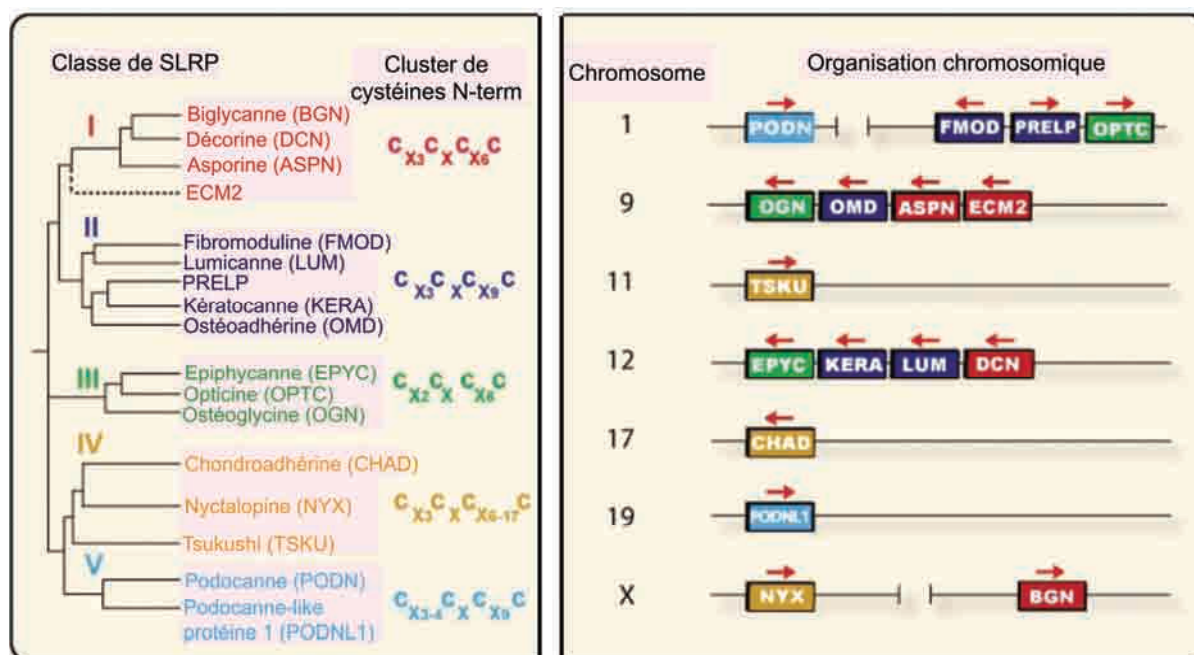


Figure 6 : Analyse phylogénétique et organisation chromosomique des différentes classes de SLRP. (d'après Schaefer et Iozzo 2008).

2.4.4.2- Structure des SLRP

Les SLRP ont un domaine LRR central flanqué par des motifs cystéines conservés sur les cotés N- et C-terminaux (McEwan et coll. 2006).

2.4.4.2.1- Le domaine LRR central

Ce domaine consiste en des répétitions en tandem riche en leucine et autres petits résidus hydrophobes. Ces répétitions contiennent un motif caractéristique de 11 acides aminés, LxxLxLxxNxL (x étant n'importe quel acide aminé), où les leucines peuvent être substituées par des isoleucines, des valines ou d'autres acides aminés hydrophobes. Auparavant, Hocking et coll. (1998) ont proposé une séquence consensus LRR de 24 acides aminés, x-x-I/V/L-x-x-x-x-F/P/L-x-x-L/P-x-x-L-x-x-L/I-x-L-x-x-N-x-I/L. La longueur des répétitions individuelles (LRR) diffère selon les SLRP et varie de 20 à 39 acides aminés (figure 7). Les LRR de la classe I, II et V montrent un modèle régulier court-long-long, où les LRR courts ont 20 à 21 acides aminés et les longs LRR contiennent souvent 24 à 26 acides aminés. Les LRR sont composés d'éléments de structures secondaires tels que des hélices α , de courtes polyproline II, des hélices 3_{10} , des coudes β et des brins β (figure 8).

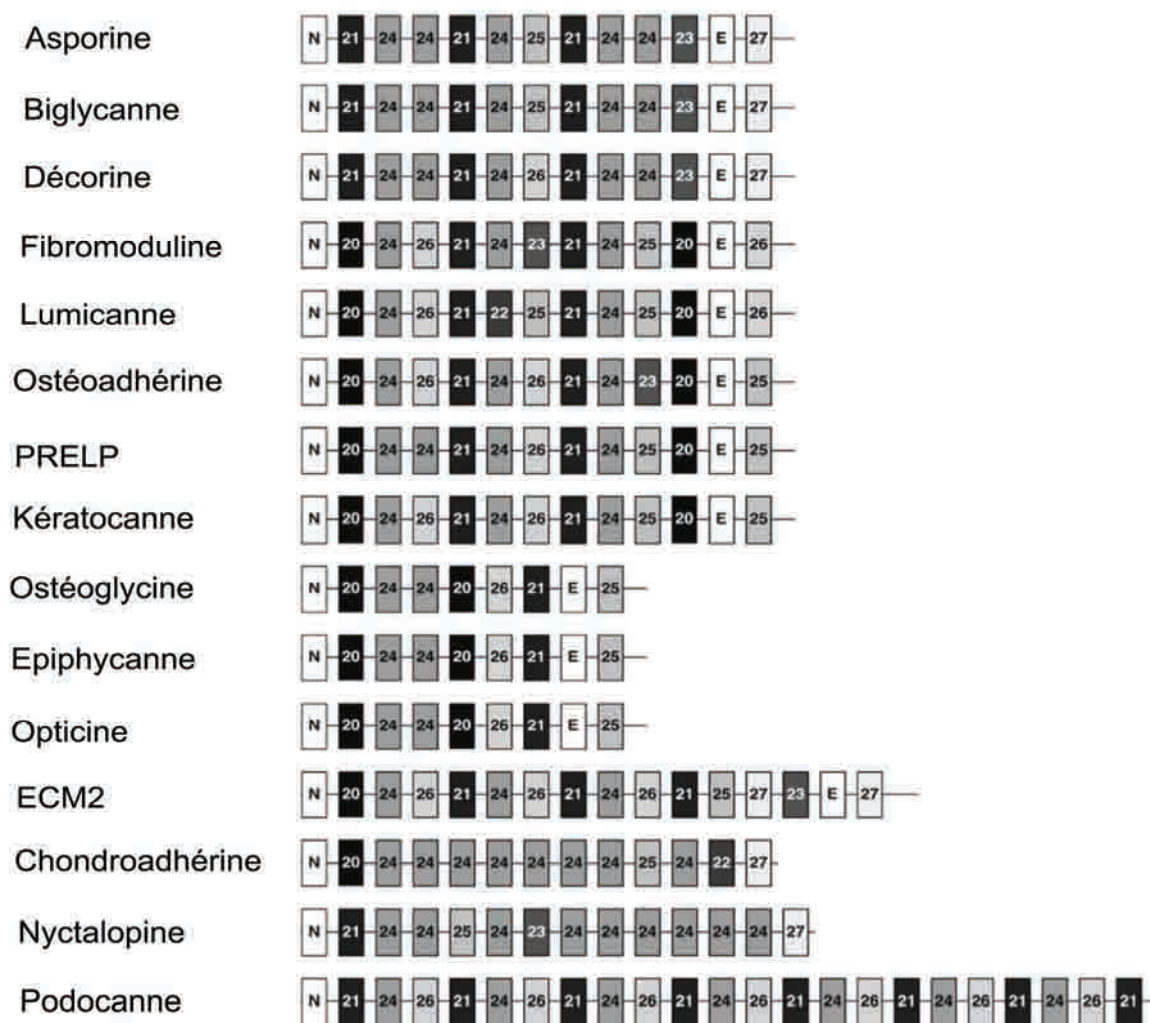


Figure 7 : Organisation des répétitions riches en leucine des SLRP. Chaque boîte représente un élément structural. N : partie N-terminale, E : « ear » (LRR 11). La numérotation correspond à la longueur en acide aminé de chaque LRR. (d'après McEwan et coll. 2006).

2.4.4.2.2- La partie N-terminale des SLRP

Le côté N-terminal des protéines riches en leucine comprend quatre cystéines conservées dont l'espacement ($Cx_m Cx Cx_n C$) diffère selon les classes. Ce motif va permettre la formation d'un brin β (β_0) qui est le seul brin antiparallèle de la protéine. La première cystéine se situe sur un coude précédent le brin β_0 , la seconde et la troisième sur le brin β_0 , et la quatrième sur le brin β du premier LRR (β_1). Deux ponts disulfures vont se former entre la cystéine 1 et 3 et la cystéine 2 et 4 (figure 9). Ce motif est uniquement retrouvé dans les protéines eucaryotes.

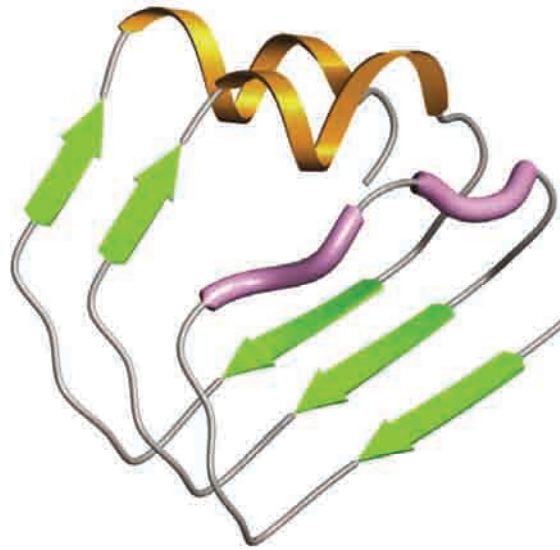


Figure 8 : Structures secondaires composant les SLRP. Le motif 21-24-24 de la décorine a été représenté. Flèches vertes : brins β , Tubes violets : segments d'hélice polyproline II, Ruban orange : courts segments continus de coudes β et de coudes en hélice 3_{10} . (d'après McEwan et coll. 2006).

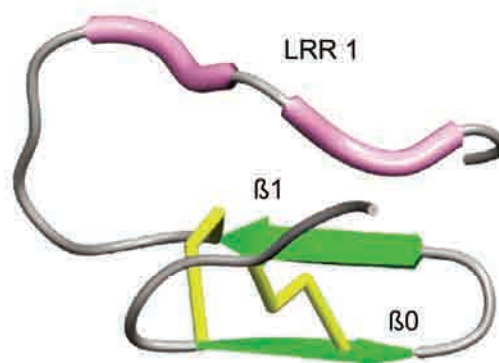


Figure 9 : Structure de la partie N-terminale des SLRP. Les éléments de structure secondaire sont détaillés dans la figure 8. Les segments jaunes correspondent aux ponts disulfures. (d'après McEwan et coll. 2006).

2.4.4.2.3- La partie C-terminale des SLRP

Le coté C-terminal des SLRP contient un pont disulfure formé entre une cystéine du LRR 11 et une cystéine du LRR 12. Le LRR 11 a la particularité d'être la séquence riche en leucine la plus longue de la protéine (29 à 39 acides aminés). Il en résulte une structure en forme d'oreille, appelé « *ear* », stabilisé au sein de la protéine par plusieurs liaisons hydrogènes. Cette structure est particulière des SLRP de la classe I à III. Il a été proposé qu'elle soit le motif de reconnaissance de cette famille, et donc que les SLRP de la classe IV et V ne devraient pas être considérés comme tels (McEwan et coll. 2006).

2.4.4.2.4- Structure tridimensionnelle des SLRP

La première structure cristallographique d'une protéine riche en leucine a été obtenue pour l'inhibiteur de la ribonucléase pancréatique (RNI), (Kobe et Deisenhofer 1993), connu sous le nom commercial de RNAsine. L'étude de la RNI montre une structure de type solénoïde, avec une morphologie en « fer à cheval » (figure 10), révélant une corrélation entre les LRR et la structure tridimensionnelle de la protéine. La structure cristallographique de la décorine et du biglycane (Scott et coll. 2004, Scott et coll. 2006) est également de type solénoïde, mais avec une conformation en « banane » (figure 11). La morphologie (courbure) des SLRP semble être déterminée par la longueur des LRR. La courbure des SLRP va permettre d'obtenir une face convexe et une face concave. Cette dernière est formée par des brins β , composés des motifs LxxLxLxxNxL. La face concave a été démontrée pour être impliquée dans l'interaction protéine-protéine des protéines riches en leucine. Les GAG et autres glycosylations sont localisés sur la face convexe.



Figure 10 : Structure de l'inhibiteur de la ribonucléase porcine (RNI) obtenue par étude cristallographique. PDB#2BNH. (d'après Kobe et Deisenhofer 1993).



Figure 11 : Structure d'un monomère de la décorine humaine obtenue par étude cristallographique de la forme dimérique. PDB#1XKU (Scott et coll. 2004).

2.4.4.3- Rôles physiologiques des SLRP

Les fonctions biologiques des SLRP ont été déterminées en partie par des maladies génétiques liées à ces protéines ou *via* des souris délétées d'un gène SLRP. Des mutations au niveau de la décorine, de la fibromoduline, de PRELP, de l'opticine, du kératocanne ou de la nyctalopine conduisent à des symptômes oculaires chez l'homme, caractérisés soit par une opacité de la cornée, une forte myopie ou encore une hypermétropie astigmatique (Pusch et coll. 2000, Pellegata et coll. 2000, Bredrup et coll. 2005, majava et coll. 2007). Les délétions de

gènes de SLRP chez la souris induisent diverses pathologies telles qu'une fragilité de la peau, l'ostéoporose et des maladies cardiaques (Corsi et coll. 2002, Reed et Iozzo 2002, Heegaard et coll. 2007).

La régulation de la fibrillogenèse du collagène est une fonction importante de plusieurs SLRP. Une altération de l'expression de la fibromoduline peut entraîner une architecture anormale du collagène. Il a été montré que la décorine fixe le collagène de type I *via* la séquence SYRIADTNIT situé au niveau du LRR 6 (Kalamajski et coll. 2007) et que la fibromoduline interagit avec le collagène à travers le LRR 11 (Kalamajski et Oldberg 2007).

La décorine, le biglycane, l'asporine et la fibromoduline sont capables d'interagir avec le TGF- β (transforming growth factor β), régulant l'activité du TGF- β en le séquestrant dans la matrice extracellulaire (Hildebrand et coll. 1994).

Tsukushi, un SLRP récemment décrit, est un inhibiteur du BMP (bone morphogenetic protein) qui forme un complexe ternaire avec le BMP et la chordine (Ohta et coll. 2006). Le biglycane et la fibromoduline sont également impliqués dans la régulation de la signalisation du BMP.

Les rôles biologiques du lumicane sont détaillés dans le paragraphe 2.4.5.3.

2.4.4.4- Rôle des SLRP dans le cancer

Certains SLRP sont retrouvés dans les pathologies tumorales. C'est le cas de la décorine, du biglycane, de la fibromoduline et du lumicane. Le rôle du lumicane au sein des cancers est présenté dans le paragraphe 2.4.5.3.3.

La décorine, qui est le SLRP le plus étudié dans la littérature, montre des propriétés anti-tumorales. Son expression est associée avec un faible taux de survie dans le cancer du sein invasif (Troup et coll. 2003). Dans un modèle de carcinome mammaire, un traitement avec la décorine réduit la croissance tumorale et élimine les métastases (Reed et coll. 2005, Araki et coll. 2009). De même, la décorine inhibe les métastases, issu d'ostéosarcome, dans le poumon (Shintani et coll. 2008-a). La décorine intervient également dans d'autres cancers comme le cancer pancréatique (Königer et coll. 2004) ou les tumeurs vasculaires bénignes (Salomäki et coll. 2008). L'activité anti-tumorale de la décorine peut s'exercer à travers l'interaction de ce SLRP avec les récepteurs à tyrosine kinase. Il a été montré que la décorine était capable de se fixer sur le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) des cellules tumorales (Santra et coll. 2002). Cette interaction va d'une part, induire la voie de signalisation des MAPK ERK 1,2, conduisant à la synthèse de p21^{WAF}, inhibiteur du cycle cellulaire, et d'autre part à l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses impliquant la

caspase-3. De plus, EGFR va être internalisé et dégradé au niveau des lysosome, inhibant ainsi les voies de transduction induites par l'EGF (Goldoni et Iozzo 2008) (figure 12). Par ailleurs, la décorine inhibe l'angiogenèse (Grant et coll. 2002, Sulochana et coll. 2005).

Le biglycane est capable d'inhiber le cycle cellulaire des cellules de cancer du pancréas. Une inhibition de l'activation de Ras et ERK a été observée en parallèle (Weber et coll. 2001).

La fibromoduline va contrôler la pression du fluide interstitiel, facteur de l'agressivité des cellules tumorales (Oldberg et coll. 2007).

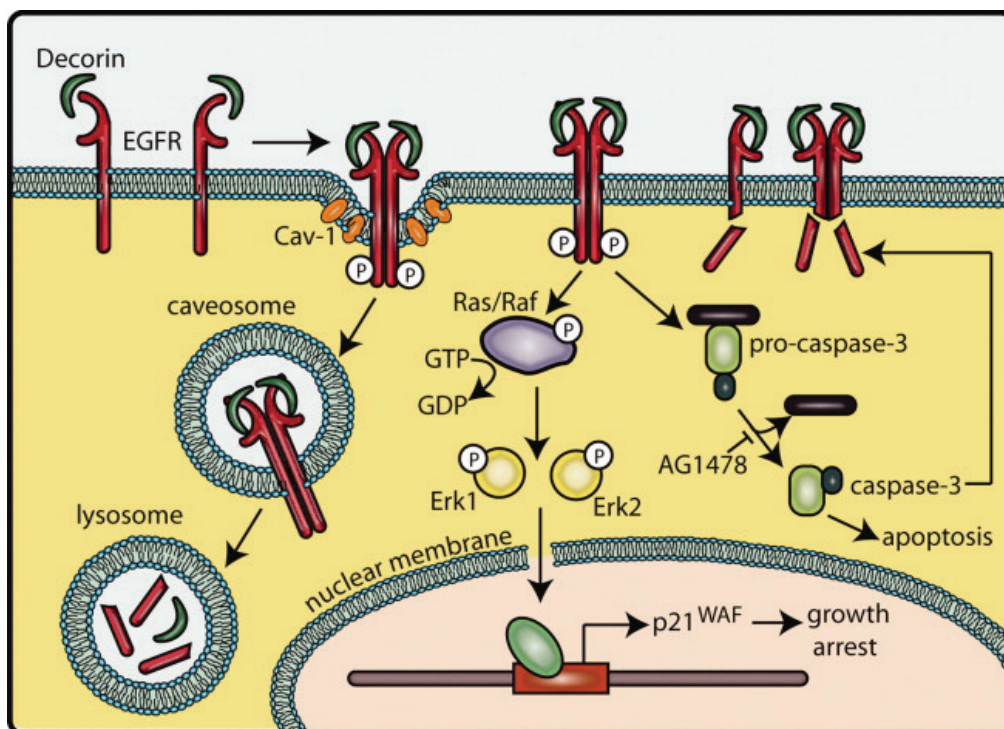


Figure 12 : Interaction de la décorine avec L'EGFR. La décorine va induire la dégradation de l'EGFR, l'activation de ERK 1,2 et de la voie apoptotique. (d'après Goldoni et Iozzo 2008).

2.4.4.5- Régulation de l'expression des SLRP

L'expression des SLRP peut être régulée par des facteurs de croissance comme le TGF- β ou des cytokines comme IL-1. La stimulation ou l'inhibition des SLRP dépend également du type cellulaire qui exprime ces protéines. Le tableau V montre les différentes régulations de l'expression de la décorine, du biglycane et du lumicanne au niveau des fibroblastes, kératocytes et chondrocytes.

Tableau V : Régulation de l'expression de la décorine, du biglycane et du lumicanne.

↑ : stimulation, ↓ : inhibition, = : aucun effet.

FIBROBLASTES									
	diploïde normal	peau humaine	poumon humain	gingival humain	myocarde ventriculaire gauche d'adulte normal	synoviocytes fibroblaste-like	ligament parodontal		
IGF-1			B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	
PDGF-BB				B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	
TGF-β1		B D L		B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	
TNF-α	B D L		B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	
IL-1β			B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	B D L	
IL-4		B D L			B D L	B D L	B D L	B D L	
EGF	B D L				B D L	B D L	B D L	B D L	

KERATOCYTES	
	primaires bovins
FGF-2	B D L
TGF-β1	B D L
FBS	B D L
Insuline	B D L

CHONDROCYTES	
	articulaire de lapin
IFN-γ	B D L
TNF-α	B D L
bFGF	B D L
TGF-β1	B D L
IL-1β	B D L
IGF-1	B D L

CHONDROCYTES	
	humain
IFN-γ	B D L
TNF-α	B D L
bFGF	B D L
TGF-β1	B D L
IL-1β	B D L
IGF-1	B D L

KERATOCYTES	
	stroma de cornée de lapin
FGF-2	B D L
TGF-β1	B D L
FBS	B D L
Insuline	B D L

CHONDROCYTES	
	Cellule musculaire lisse de l'aorte
IL-1β	B D L

B: biglycane
D: décorine
L: lumicanne

[1] Melching et coll. 1991
 [2] Kahari et coll. 1991
 [3] Edwards et coll. 1994
 [4] Mauviel et coll. 1995
 [5] Heimer et coll. 1995
 [6] Kuroda et coll. 1997
 [7] Dodge et coll. 1991
 [8] Navarrete Santos et coll. 1998
 [9] Demoor-Fossard et coll. 1998
 [10] Tufvesson et coll. 2000
 [11] Long et coll. 2000
 [12] Funderburgh et coll. 2001
 [13] Laine et coll. 2000
 [14] Haase et coll. 1998
 [15] Guerriero et coll. 2007

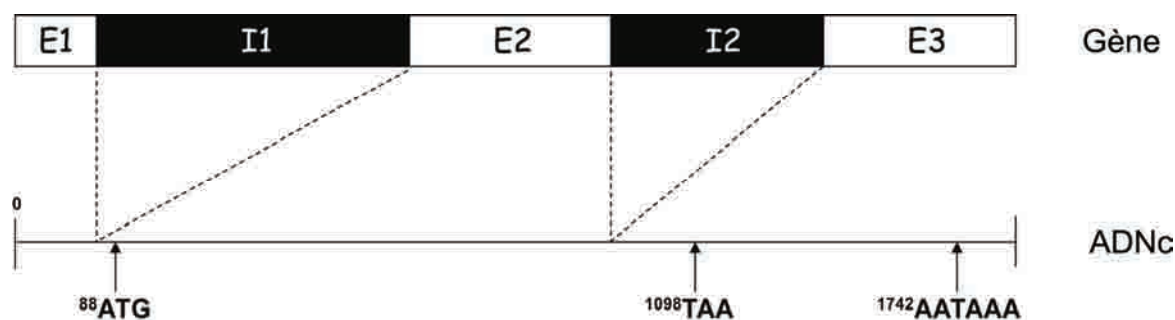
2.4.5- Le lumicanne

Le lumicanne a été identifié pour la première fois dans la cornée comme protéoglycane à kératane sulfate (Hassell et coll. 1980). Cependant, le lumicanne est exprimé comme glycoprotéine dans d'autres tissus, pouvant être substitué par des chaînes de polylactosamines peu ou non sulfatées. Ainsi, l'expression du lumicanne a été détectée entre autres dans le tissu artériel (Funderburgh et coll. 1991), la peau (Corpuz et coll. 1996), le poumon (Dolhnikoff et coll. 1998) et les os (Raouf et coll. 2002). Les formes du lumicanne dépendent non seulement du tissu dans lequel il est exprimé, mais également de l'âge : le lumicanne est sous forme protéoglycane dans le cartilage jeune, mais sous forme glycosylé dans le cartilage adulte (Grover et coll. 1995). De plus, les facteurs de croissance et les cytokines peuvent moduler la forme moléculaire du lumicanne (Melching et coll. 1999).

2.4.5.1- Gène et promoteur du lumicanne

Le gène du lumicanne a été cloné chez le bœuf (Funderburgh et coll. 1993), le poulet (Blochberger et coll. 1992), la souris (Funderburgh et coll. 1995) et l'humain (Chakravarti et coll. 1995). Chez l'homme, le gène du lumicanne (LUM) est présent sur le chromosome 12, sous-localisé au niveau de la région 12q21.3-q22 (Chakravarti et coll. 1995). Le gène, de 7 à 9 kpb (kilo-paires de bases) selon les espèces, est composé de trois exons et de deux introns. Les trois exons ont une taille respective de 74, 883 et 770 pb, codant un ARNm de 1,75 kb (Grover et coll. 1995 et 2000) (figure 13).

Le promoteur du gène du lumicanne a préalablement été étudié chez le poulet (Hassell et coll. 1998) et la souris (Ying et coll. 1997). Au niveau du promoteur humain, cinq boîtes TATAAA ont été localisées dans la région distale, mais celles-ci sont trop éloignées du site de départ de la transcription pour être impliquées dans la production d'un transcrit. Cependant, une séquence TATCA, responsable de la régulation de l'expression, est présente 41 pb en amont du site de transcription. De plus, une boîte GC est localisée 74 pb en amont du +1 de transcription. Ces deux séquences sont nécessaires pour initier la transcription du gène du lumicanne (Grover et coll. 2000). De même, le facteur de transcription Sp3 est essentiel à la transcription basale, par sa fixation sur la boîte GC. Une séquence de fixation de protéines GATA, située entre la région -390 et -385, est impliquée dans la répression de l'expression du lumicanne. La séquence du promoteur du gène du lumicanne et la position des différents éléments sont présentées sur la figure 14.



Exon 1: séquence 5'-non traduite

Exon 2: encode la séquence contenant les LRR 1 à 10

Exon 3: fin de la séquence codante + séquence 3'-non traduite

Figure 13 : Structure du gène du lumicanne humain. E1, E2 et E3 représente les exons, I1 et I2 les introns. Le codon initiateur de la traduction ATG, le codon stop TAA et le site de polyadénylation AATAA sont indiqués sur l'ADNc en fonction de leur localisation en paire de bases (nombre). (d'après Ying et coll. 1997).

```

- 1616      GTATATGGTTGCACAAGACTTTACAATGAGCTGGGTCCAATATAATGCATTGAGG
- 1560      CTGTTATAAATACCACAACACATGTATTGCTTTATAAAGAAAAATCTTAAGGAATGGATA
- 1500      GGTGGAGGTTTTCTAACAAGAGCTCAGATTATAGAATTTGATACACTCAAATTAATACA
- 1440      TAGCATTGTTTTAAGAATCCTCTTATAACAAGATCACTTAATTATATTCGATTGATTTGT
- 1380      CTCCTTCTCTTAATCCCTTATAAATTTATTCAGTTACTTTGTTGAAATGAGGCCATCA
- 1320      CTAATTTCCCTAAAATAATATTAGGTTTAAATGTTATGTTTATGAATCATCTTATAATTC
- 1260      ATTAGCTTACTTTCAAGAAGATTACTTTTTGTTTTTGAACACTGCTAATAAAAATAAG
- 1200      CCATTTATCTAATAGTCTTTTTTCGGACAAATGCTGTATTAGTCATGGAGTTAATTTTC
- 1140      CACAAGTCTCAGCTAAAATGTGATATAGTTATTTTTAAAGACAAAAATACCAATGTGA
- 1080      CAACTTATATCCAAAATATATTGTTGTAAGTTCTTATAAACATGAGGAAATGAACAT
- 1020      TTTAGAAAAAATCTCATAAATATATCGATAAAATCACAAAATCGCAAATAGCACAAAG
- 960      GATTTAAGTACATCTCTCATTGCTGAAACCATGCATCAGGAGCTGATAATGAAAGATAT
- 900      ATCCAGCCAGGCCCTTTGGGAGATTATAACTTTGAATAACTTTTAACTTTGAAAAAATT
- 840      ACTAGCATGCAATGAAAGATTCTTGCCTTGTGATACTTTTAGTATAAATTTATTTTTTTT
- 780      CTCTGTTCTTTTATGTTTTTTGGCATTAAAGCTATAGAATGCTCTCCCAAGTAAGGTTTT
- 720      GGTGAATTCCTAAACGAAATCCACAAAATAAAAAACAGGCAAGACTTTGCTGATTGGTT
- 660      CCAGACCTGAATAACATAAAATGAGTCTCCTTAGCATTAGAAGTAAACTGAAATGTTGA
- 600      TATTTATCATGTATCCAAGTGTATATGAAGCATATTTTATATTTTTTAAACTAATGT
- 540      AAGCTACCTCATGGCCAAAAAATTAAGTTAGTCCAAGTAAATCAATATTGATTTCAAAA
- 480      GTGATAGGCAAAGGATTCAATTCCTCTGAGTCTGTTTCATTTGCGTTTTCCGGAATTAT
- 420      TTGCCCTGCTTATGATTTCTGAGATCTTTAGATAAACATGATAGTTGGCTGAGCACATTG
- 360      CACTTAATPGTTGCCACAGCCACAGATGTAAAGAGGCTTTGTAAGAAAAATGTTCTCACA
- 300      GTGAGCTTCCTTATTTGAAGCAGGACTCAACTTCTTGGTTAAAAGCTATGGTATTGAGC
- 240      CTAGCTTCACACATATCTCTCTCCATTCCCATAGGGGAATGAGCTGGGCTGTCCTTTC
- 180      TCCCCACGTTACCTGCACCTTCGTTAGAGAGCAGTGTTCACATGCCACACCACAAGATCC
- 120      CCACAATGACATAACTCCATTTCAGAGACTGGCGTGACTGGGCTGGGCTCTCCCCACCCCT
- 60      CCCTTCAGCTCTTGATCACTCAGAATCTGGACGCCAGTTCCGCTCTGACAGAGTTTACA
+ 1      GCATATATTGGTGGATTCTTGTCCATAGTGCATCTGCTTTAAGAATTAACGAAAGCAGTG
+ 61      TCAAGACAGTAAGG

```

Figure 14 : Séquence du promoteur du gène du lumicanne humain. La région promotrice est numérotée de -1616 à -1 et le début de la séquence transcrite de +1 à +74. Les boîtes TATAAA sont indiquées en jaune, la boîte TATCA en rouge, la boîte GC en vert et les sites de fixation GATA en violet. (d'après Grover et coll. 2000).

2.4.5.2- Structure du lumicanne

Le transcrit de lumicanne humain de 1014 pb code une protéine de 338 acides aminés (Chakravarti et coll. 1995). Le lumicanne possède un peptide signal de 18 acides aminés (Grover et coll. 1995), permettant la sécrétion de cette protéine au sein de la matrice extracellulaire. Chakravarti et coll. (1995) ont décrit la présence de trois domaines au sein de la protéine cœur du lumicanne :

- Le domaine I comporte quatre cystéines, ainsi que des sites potentiels pour la sulfatation de tyrosines. (Ce domaine correspond à la partie N-terminale de la structure des SLRP décrite dans le paragraphe 2.4.4.2.2).
- Le domaine II contient neuf répétitions riches en leucine, présentant chacune un motif. Les répétitions peuvent être alignées en trois unités contenant chacun trois LRR. L'unité 1 est long de 71 acides aminés, l'unité 2 de 68 et l'unité 3 de 70. (Ce domaine correspond pratiquement au domaine LRR central défini par McEwan et coll. (2006)).
- Le domaine III, de 66 acides aminés, contient les deux dernières cystéines ainsi que deux répétitions riches en leucine. (Ce domaine correspond à la partie C-terminale des SLRP détaillée au paragraphe 2.4.4.2.3).

Ainsi, selon Chakravarti et coll. (1995), le lumicanne humain comporterait 11 répétitions riches en leucine, alors que McEwan et coll. (2006) décrivent une organisation de 12 LRR pour les SLRP de la classe I et II (voir figure 7). Cependant, le lumicanne comporte uniquement 11 motifs LxxLxLxxNxL.

Un alignement de séquence du lumicanne de différentes espèces montre que la partie centrale est très conservée (figure 15). C'est au niveau de ce domaine que la protéine cœur du lumicanne humain comporte quatre sites potentiels de N-glycosylation localisés aux niveaux des acides aminés 87, 126, 159 et 251. Une schématisation de ces sites est présentée sur la figure 16.

Les structures secondaires et tertiaires du lumicanne sont les mêmes que celles définies précédemment pour les SLRP (paragraphe 2.4.4.2.4).



Figure 16 : Localisation des sites potentiels de N-glycosylation sur la protéine cœur du lumicanne. Les motifs LxxLxLxxNxL sont représentés par des boîtes noires (consensus) et grises (consensus partiel) et numérotées du côté N-terminal vers le côté C-terminal. Les « Y » représentent les glycosylations possibles du lumicanne aux sites potentiels. Les chiffres aux pieds de chaque « Y » indiquent la position en acides aminés.

2.4.5.3- Rôles biologiques du lumicanne

2.4.5.3.1- Interaction du lumicanne avec le collagène

La plupart des SLRP, notamment de la classe I et II, sont connus pour interagir avec le collagène de la matrice extracellulaire. Kalamajski et coll. (2009) ont montré que le LRR 7 du lumicanne était impliqué dans sa fixation au collagène de type I. Le lumicanne joue un rôle important dans la régulation de la fibrillogenèse du collagène. Des souris *Lum*^{-/-} montrent ainsi un relâchement cutané et une opacification cornéenne (Chakravarti et coll. 1998). Chez ces souris, le diamètre des fibrilles de collagène apparaît irrégulier, anormalement épais. Ce phénomène a également été retrouvé au niveau des tendons, provoquant une fragilité de ce tissu (Jepsen et coll. 2002).

Le lumicanne protégerait également le collagène de la dégradation matricielle, en masquant les sites de clivage des collagénases comme la MMP1 et la MMP13 (Geng et coll. 2006).

2.4.5.3.2- Rôle du lumicanne dans la réponse immunitaire et l'inflammation

Des souris déficientes pour le lumicanne (*Lum*^{-/-}) sont moins sensibles à l'endotoxine bactérienne LPS (lipopolysaccharide). De plus, des macrophages *Lum*^{-/-} en culture produisent des bas niveaux de cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS (Wu et coll. 2007). Le lumicanne facilite la réponse immune innée en fixant le LPS et en se liant au CD14, une protéine qui transfère le signal LPS au TLR4 (Toll-like receptor 4). Il a été récemment montré que le lumicanne, via une interaction avec l'intégrine $\beta 2$, stimulait la migration des neutrophiles polymorphonucléaires (Lee et coll. 2009). Par ailleurs, le lumicanne est capable

de se fixer aux macrophages, pouvant ainsi réguler le processus d'inflammation (Funderburgh et coll. 1997).

2.4.5.3.3- Rôle du lumicanne dans le cancer

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'expression du lumicanne jouait un rôle dans les processus tumoraux. Ainsi, un faible taux d'expression du lumicanne au niveau du cancer du sein est corrélé à un mauvais pronostic (Troup et coll. 2003). Cependant, le lumicanne montre des effets opposés selon la tumeur à laquelle il est associé. Dans le cas des cancers colorectaux, pancréatiques et pulmonaires, le lumicanne semblerait être associé à une activité pro-tumorale.

Les mécanismes impliqués dans l'action du lumicanne ont commencé à être étudié essentiellement au niveau du mélanome. Le lumicanne inhibe la progression du mélanome *in vivo* en régulant la migration cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Vuillermoz et coll. 2004). Il a également été montré que les cellules de mélanome pouvaient adhérer au lumicanne, modifiant ainsi le cytosquelette de ces cellules (D'Onofrio et coll. 2008, Brézillon et coll. 2009-a). Une étude récente implique le lumicanne dans l'inhibition de métastases de poumon issues de mélanome (Brézillon et coll. 2009-b). Cette étude a aussi montré le rôle angiostatique du lumicanne. Albig et coll. (2007) avaient préalablement démontré une inhibition de l'angiogenèse par le lumicanne, dépendante de la lignée de cellules endothéliales.

3- Le mélanome

Les cancers de la peau représentent environ 60 000 nouveaux cas par an en France. Il est dénombré deux types de cancer de la peau : les carcinomes et les mélanomes. Les mélanomes sont les moins fréquents mais les plus graves. Ils se développent au dépens des mélanocytes, situés dans la partie basale de l'épiderme.

3.1- Incidence et mortalité

L'incidence du mélanome croît depuis plusieurs années. Depuis 50 ans, elle double tous les 10 ans à travers le monde. En 10 ans, le taux d'incidence a augmenté de 22% pour les hommes et de 17 % chez les femmes en Australie, ainsi que de 60 % (hommes) et 45 % (femmes) en Grande-Bretagne. Le taux de mortalité a également augmenté, bien que nous observons une baisse de 10 % chez les femmes en Grande-Bretagne (Thompson et coll. 2009). En France, entre 1980 et 2000, le taux d'incidence du mélanome a été multiplié par 3

pour les hommes et par 2,5 pour les femmes, portant ainsi à environ 7500 cas de mélanome par an. De même, le taux de mortalité a été multiplié par 2,8 en l'espace de trente ans (1969-1997) en France (Grange 2005). Récemment, une diminution de la mortalité attribuée au mélanome a été observée en Europe, vraisemblablement due aux campagnes massives de prévention.

3.2- Les facteurs de risque

3.2.1- Les facteurs génétiques

Cinq à dix pour cent des individus présentant un mélanome ont un contexte de mélanome familial. Environ un quart de ces familles a été lié aux mutations survenues dans le gène suppresseur de tumeur CDKN2A/p16 localisé sur le chromosome 9p21. Plusieurs gènes associés à une hérédité sont impliqués dans l'augmentation du risque d'avoir un mélanome (tableau VI).

Tableau VI : Gènes associés à un risque héréditaire de mélanome. (d'après Thompson et coll. 2009).

	Chromosome	Protéine	Fonction	Pénétrance	Fréquence de la mutation
Risque élevé					
CDKN2A	9p21	p16INK4A, p14ARF	Régulation du cycle cellulaire	Elevé	Faible
CDK4	12q14	Cyclin-dependent kinase 4	Régulation du cycle cellulaire	Elevé	Faible
Risque faible					
MC1R	16q24	Melanocortin 1 receptor	Pigmentation	Faible	Elevé
ASIP	20q11	Agouti signalling protein	Pigmentation	Faible	Elevé
TYR	11q14	Tyrosinase	Pigmentation	Faible	Elevé
TYRP1	9p23	Tyrosinase-related protein 1	Pigmentation	Faible	Elevé

3.2.2- La pigmentation de la peau

Les personnes à peau claire, avec une faible habilité à bronzer, ou présentant des tâches de rousseur avec ou sans cheveux roux, ont un risque double d'avoir un mélanome. Les polymorphismes du gène MC1R sont associés à ce risque. Le mélanome est rarement présent

chez les personnes n'ayant pas la peau blanche, avec une incidence 10 à 20 fois moins élevée (Bataille et de Vries 2008).

3.2.3- Les *naevi*

La présence de *naevi* est la donnée la plus importante pour prédire un risque de mélanome. Des études ont montré que la présence sur un individu de plus de 100 *naevi* communs ou plus de deux *naevi* atypiques augmente de 5 à 20 fois le risque d'avoir un mélanome (Gandini et coll. 2005). Les *naevi* atypiques sont de grande taille (> 6 mm), de forme et d'aspect irréguliers. Cependant comparé au mélanome, le *naevus* atypique est statique, la taille, la forme et la couleur étant constantes. Une autre étude suggère que les *naevi* sont sous contrôle génétique. Les *naevi* subissent la sénescence avec l'âge, avec une diminution de leur nombre entre 30 et 40 ans (Cho et coll. 2005).

3.2.4- Les facteurs hormonaux

Des études sur la mortalité ont montré que les femmes avaient des tumeurs moins importantes que les hommes et survivaient plus longtemps au mélanome, suggérant que des gènes liés au chromosome X ou que des facteurs hormonaux pouvaient affecter le taux de survie de personnes atteintes d'un mélanome (de Vries et coll. 2008).

3.2.5- L'exposition au soleil

Bien que l'exposition au soleil a longtemps été suspecté comme étant un facteur de risque du mélanome, la relation entre mélanome et exposition au soleil est complexe. Une méta-analyse sur des mélanomes montre que de brèves périodes de forte exposition au soleil durant l'enfance et de sévères coups de soleil sont les plus fortement associés au mélanome. Cependant, des expositions cumulatives semblent être protectrices dans certaines population à peau blanche. Il semblerait que la réponse de l'organisme aux rayonnements ultraviolets soit plus importante que la dose reçue par exposition au soleil.

3.3- Diagnostic clinique et pronostic

3.3.1- Diagnostic clinique

L'examen clinique diagnostique du mélanome peut faire appel à trois méthodes ; la règle ABCDE, la liste révisée des 7 points du groupe de Glasgow et une méthode cognitive visuelle :

- Selon la règle ABCDE, une lésion cutanée est susceptible d'être un mélanome lorsque celle-ci est Asymétrique (A), à Bords irréguliers (B), de Couleur inhomogène (C), de Diamètre supérieure à 6 mm (D) et Evolutive dans sa taille, sa couleur ou son épaisseur (E).
- La liste révisée des 7 points du groupe de Glasgow prend en compte 3 critères majeurs (le changement de la taille, de la forme et de la couleur d'une lésion connue) et 4 critères mineurs (diamètre > 7 mm, inflammation, ulcération, sensibilité de la lésion).
- La méthode cognitive visuelle est fondée sur une reconnaissance globale de l'image et le signe dit du « vilain petit canard ». Une lésion mélanocytaire sera considérée comme suspecte si elle est cliniquement différente des autres *naevi* de nature homogène du patient.

3.3.2- Critère du pronostic

Deux facteurs, qui évaluent le niveau d'envahissement cellulaire, interviennent dans l'appréciation du pronostic du mélanome : le niveau d'invasion selon Clark et Mihm et l'indice de Breslow.

Clark et Mihm (Clark et coll. 1969) a classé l'invasion du mélanome malin en cinq niveaux :

- niveau I : mélanome malin strictement intra-épidermique
- niveau II : envahissement du sommet des papilles dermiques
- niveau III : envahissement de la jonction réticulo-papillaire du derme
- niveau IV : rupture de la barrière réticulaire et envahissement du derme réticulaire
- niveau V : envahissement de l'hypoderme

L'indice de Breslow prend en compte l'épaisseur de la tumeur. La mesure effectuée est comprise entre les cellules superficielles de la couche granuleuse épidermique et la cellule maligne la plus profonde. Selon la classification de Breslow (Breslow 1970):

- Epaisseur (E) < 0,75 mm (Clark II) : survie globale à 5 ans (SG) = 96 %, métastases (M) = 2,6 %
- 0,76 < E < 1,5 mm (Clark III) : SG = 87 %, M = 24 %
- 1,51 < E < 4 mm (Clark IV) : SG = 66 %, M = 57 %
- E > 4 mm (Clark V) : SG = 44 %, M = 66 %

3.4- Classification anatomoclinique des mélanomes (figure 17)

- Le mélanome SSM (Superficial Spreading Melanoma) est la forme anatomoclinique la plus fréquente (60 à 70 % des mélanomes). Il est caractérisé par une prolifération de mélanocytes atypiques, dispersés sur toute la hauteur de l'épiderme. Ce type de mélanome est invasif.
- Le mélanome nodulaire représente 15 à 20 % des cas de mélanome. Ce type de mélanome ne présente pas de composante intra-épidermique adjacente. Il a d'emblée une croissance verticale (rapidement invasif), caractéristique de sa grande agressivité.
- Le mélanome acral lentigineux, 5 à 10 % des mélanomes, est caractérisé par des cellules mélanocytaires atypiques localisées à la base des crêtes épidermiques. Cette forme de mélanome est retrouvée sur la paume des mains, la plante des pieds et les extrémités digitales. Ce mélanome est également invasif.
- Le mélanome de Dubreuilh (5 à 10 %) fait suite à une mélanose de Dubreuilh. Les mélanocytes atypiques sont confinés aux assises inférieures de l'épiderme, dont l'invasion est plus discrète. L'épithélium des annexes est aussi envahi. La phase dite horizontale de ce mélanome est très longue (10 à 20 ans) et peut par la suite devenir invasif.

3.5- Traitement du mélanome métastatique

Les différents types de mélanome sont invasifs et donc possèdent un très grand potentiel métastatique. Les principales localisations de métastases issues de mélanome primaire sont pulmonaires, hépatiques et cérébrales (Thomas 2002). Le taux de survie à 10 ans des patients atteints d'un mélanome métastatique est moins de 10 %. La chimiothérapie avec un seul agent est bien tolérée, mais associée à un taux de réponse de seulement 5 à 20 %. La combinaison entre la chimiothérapie et la bio-chimiothérapie permet d'augmenter la réponse, mais pas le taux de survie, et est accompagné d'une grande toxicité. Les approches immuno-thérapeutiques comme les doses élevées d'IL-2 sont associées avec une réponse durable chez un petit nombre de patients (Bhatia et coll. 2009). Ainsi, à l'heure actuelle, les traitements contre les métastases mélanocytaires sont encore peu efficaces.

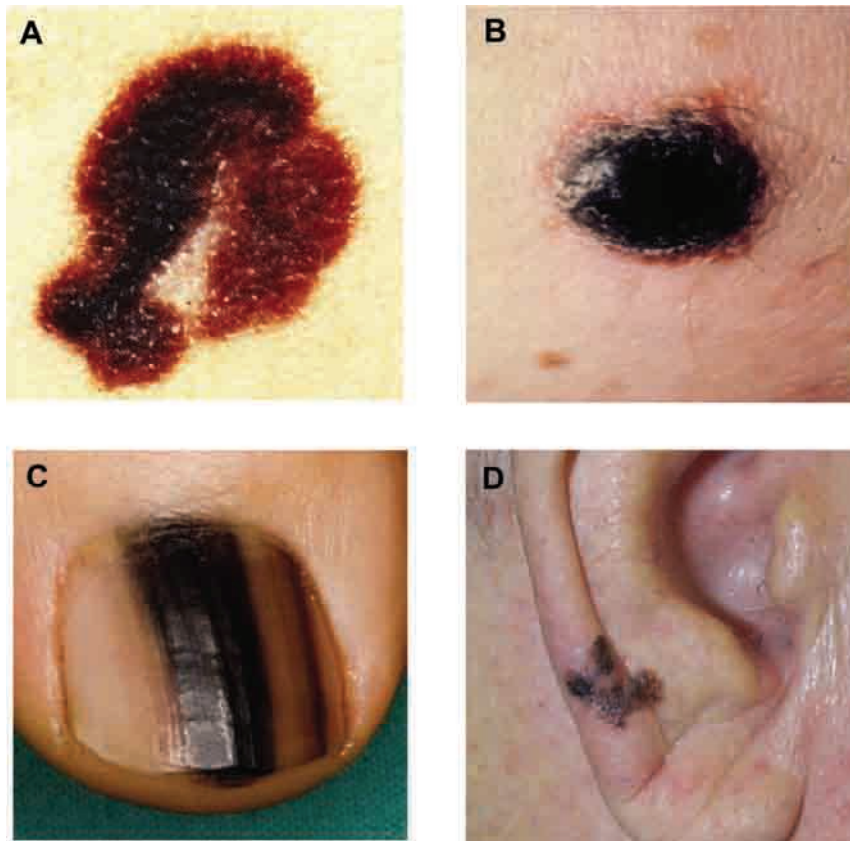


Figure 17 : Les différentes formes anatomocliniques de mélanome. A : mélanome SSM, B : mélanome nodulaire, C : mélanome acral lentigineux, D : mélanome de Dubreuilh. (disponible sur A : <http://www.health-res.com/superficial-spreading-malignant-melanoma>; B : <http://www.syndicatdermatos.org/pathologies-dermatologiques/cancers-de-la-peau-91.html>; C : Chamberlain et Ng 2009; D: <http://www.drvarlet.fr/ENCAPSULES/naevus-modifications-ad.html>).

CHAPITRE II : LA MIGRATION CELLULAIRE

1- Introduction

La migration cellulaire joue un rôle central dans une grande variété de phénomènes biologiques. Durant l'embryogenèse, la migration cellulaire orchestre le processus de morphogenèse, de la gastrulation au développement du système nerveux central (Gilbert 2003). La migration est aussi importante chez l'organisme adulte, dans les conditions physiologiques et pathologiques. La migration des cellules endothéliales et des fibroblastes est essentielle lors du processus de cicatrisation. Dans la réponse inflammatoire, les leucocytes migrent de la circulation sanguine vers les tissus environnants afin de détruire les microorganismes envahisseurs et les cellules infectées. La migration cellulaire est cependant impliquée dans les maladies vasculaires, l'ostéoporose, l'arthrite rhumatoïde et le cancer où dans ce cas-ci les cellules quittent la tumeur primaire pour aller coloniser un nouveau site.

Les cellules migrent le plus souvent en réponse à des *stimuli* externes, comme les facteurs de croissance, chimiokines ou les composants de la matrice extracellulaire. La migration est composée de plusieurs étapes que la cellule doit intégrer et coordonner. La première réponse de la cellule à un stimulus est de se polariser et de produire des protrusions dans le sens de la migration. Ces protrusions vont se stabiliser par leur adhésion à la matrice extracellulaire et vont servir de sites de traction pour la migration de la cellule, dont l'arrière va se détacher (figure 18). Lors de la migration, ces étapes vont être répétées plusieurs fois, nous permettant de définir ce phénomène comme un processus cyclique.

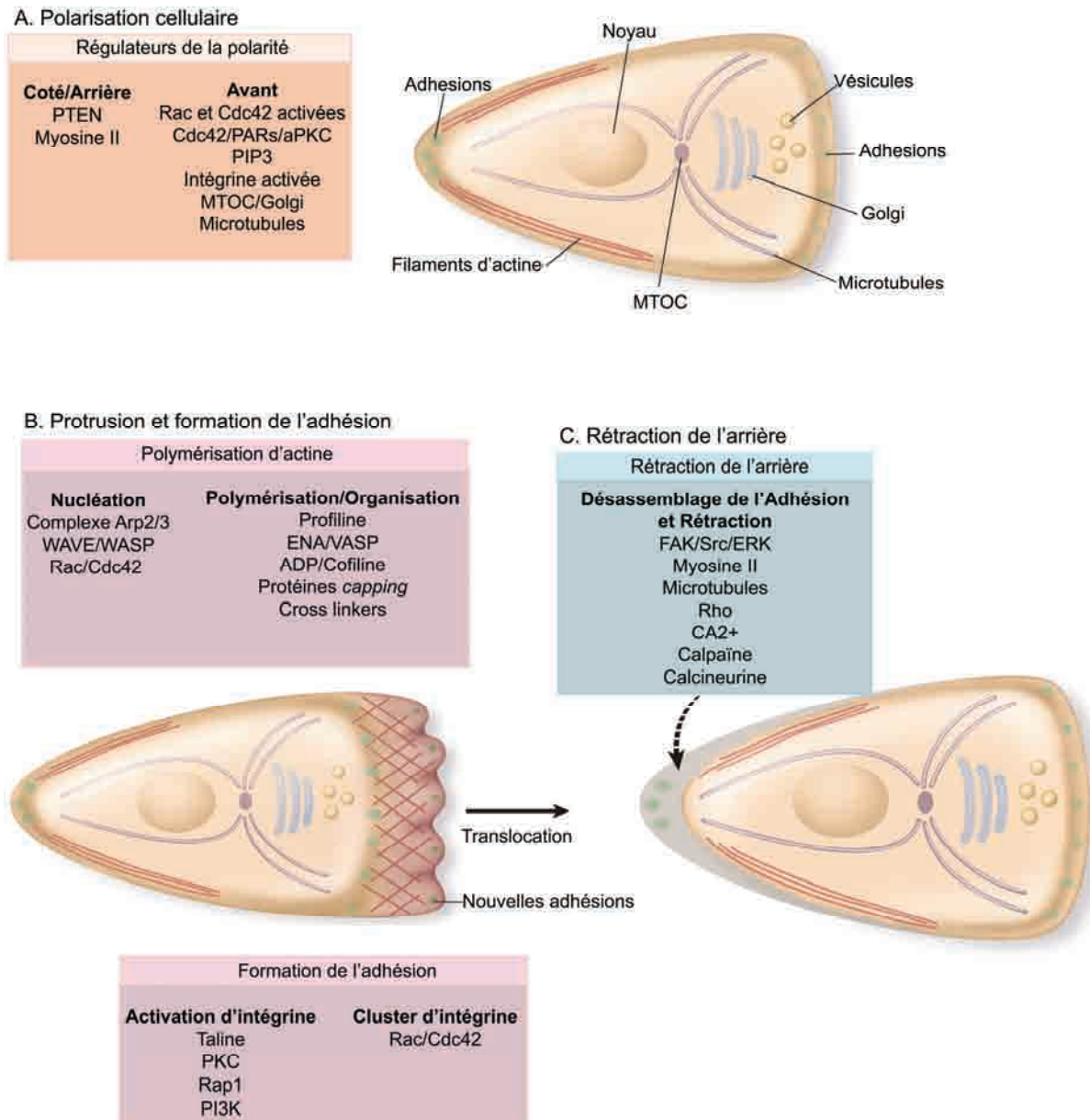


Figure 18 : Etapes de la migration cellulaire. Le cycle de la migration cellulaire est divisé en trois étapes : La polarisation cellulaire (paragraphe 2.2), la protrusion et la formation de l'adhésion (paragraphe 3) et le détachement de l'arrière de la cellule (paragraphe 5). (d'après Ridley et coll. 2003). MTOC : centre organisateur de microtubules.

2- Le cycle de migration cellulaire

2.1- La famille des Rho GTPases

La famille des Rho GTPases joue un rôle important dans les différentes phases du cycle de la migration cellulaire. Chez les mammifères, les Rho GTPases comprennent 23 membres, pouvant être classés en sous-famille sur la base de la similarité de séquence (figure 19). Les trois membres les mieux caractérisés sont Rho, Rac et Cdc42. Toutes les Rho GTPases sont prénylées à leur extrémité C-terminale, modification indispensable à leur fonctionnement.

Ces protéines alternent entre une conformation active (protéine-GTP) et une conformation inactive (protéine-GDP) (figure 20). Quand elles fixent le GTP, elles deviennent actives et peuvent induire une signalisation en interagissant avec une des 60 protéines effectrices, incluant les protéines kinases, les enzymes modificateuses de lipide et les activateurs du complexe Arp2/3 (Etienne-Manneville et Hall 2002). L'alternance entre les deux formes est régulée par trois classes de protéine : Les protéines GEF (guanine nucleotide exchange factors), les protéines GAP (GTPase-activating proteins) et les protéines GDI (guanine nucleotide exchange inhibitors). Les protéines GEF catalysent l'échange nucléotidique et induisent ainsi l'activation des Rho GTPases. Il y a 79 protéines GEF identifiées chez les mammifères pour la famille des Rho GTPases. Les protéines GAP stimulent l'hydrolyse du GTP en GDP, conduisant à l'inactivation des Rho GTPases. Nous dénombrons 65 protéines GAP chez la souris. Les trois protéines GDI peuvent se fixer au groupement lipidique de la partie C-terminale des Rho GTPases, inhibant leur fixation à la membrane et les maintenant dans un état inactif (Tybulewicz et Henderson 2009). Les protéines GEF et GAP possèdent un site catalytique et un domaine d'interaction protéine-protéine. Le fait que les protéines régulatrices soient si nombreuses n'est pas connu, mais suggère une spécificité en rapport aux diverses voies de signalisation pouvant être impliquées par les Rho GTPases.

Rho, Rac et Cdc42 vont influencer et réguler la polarité cellulaire, la dynamique des microtubules, ainsi que d'autres phénomènes extérieures au processus migratoire, à travers des voies de transduction du signal différentes.

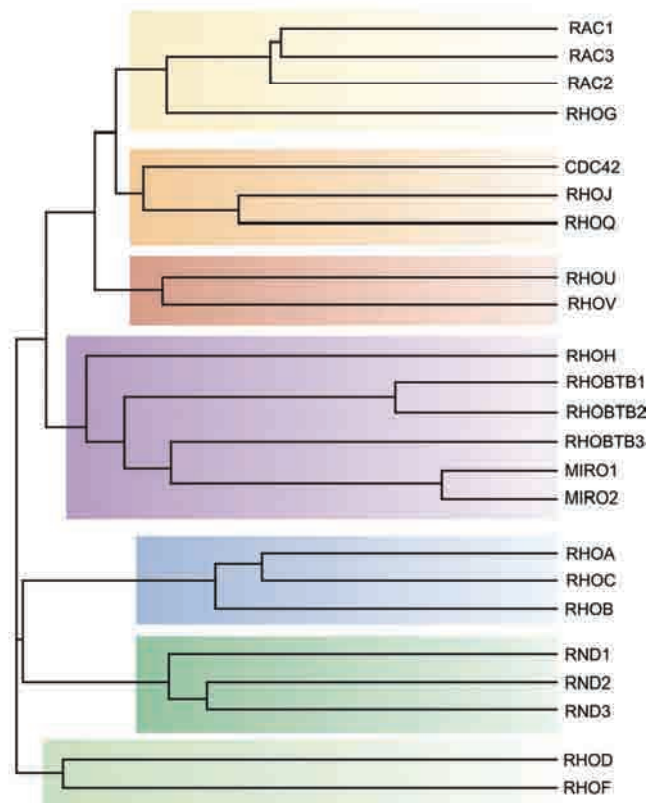


Figure 19 : Les membres de la famille des Rho GTPases. Arbre phylogénétique des 23 membres des Rho GTPases. (d'après Tybulewicz et Henderson 2009).

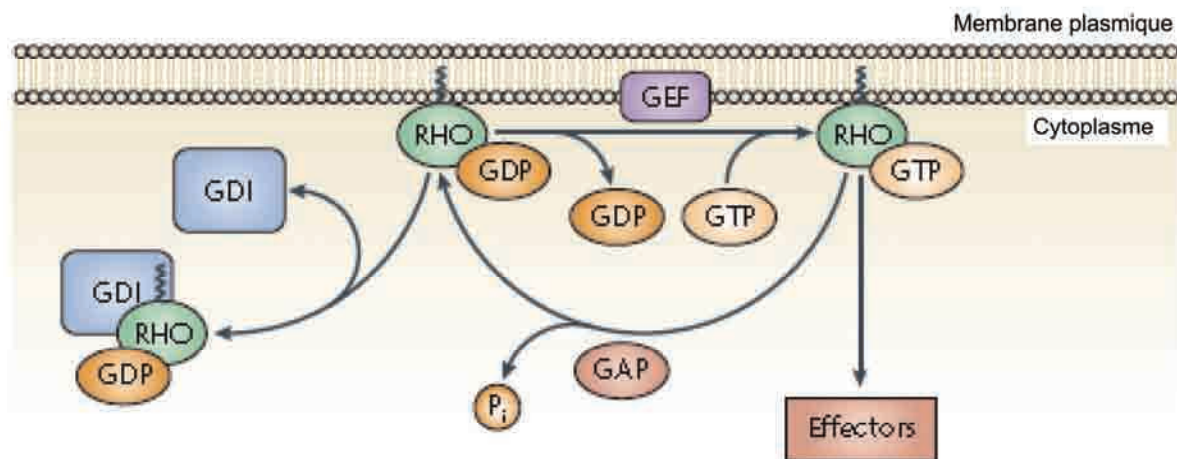


Figure 20 : Le cycle des Rho GTPases. Les Rho GTPases liées au GDP sont activées par les protéines GEF et les Rho GTPases liées au GTP sont désactivées par les protéines GAP. Les Rho GTPases activées peuvent interagir avec des protéines effectrices. (d'après Tybulewicz et Henderson 2009).

2.2- La polarisation de la cellule

Dans le but de migrer, une cellule doit acquérir une asymétrie spatiale, qui lui permette de générer des forces pour la translocation du corps cellulaire. La manifestation de cette asymétrie est une morphologie polarisée, où les processus moléculaires à l'avant et à l'arrière de la cellule sont différents. Il est important de distinguer la migration cellulaire aléatoire, dans laquelle les cellules migrent dans toutes les directions sans coordination, de la migration dirigée, dans laquelle les cellules migrent dans une direction donnée (chimiotactisme). Dans les deux cas, la formation d'un axe avant-arrière de la cellule est requise (figure 21). La polarité de la cellule est établie et maintenue par une série de boucles de rétrocontrôle positif, qui sont reliées entre elles et qui impliquent la famille des Rho GTPases, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), les intégrines, les microtubules et les vésicules de transport.

2.2.1- La protéine Cdc42

Cdc42, de la famille des Rho GTPases, est une protéine maîtresse dans la régulation de la polarité cellulaire. Elle est active vers l'avant des cellules en migration. Bien que Cdc42 participe à l'activité protrusive de la cellule, elle est directement impliquée dans l'orientation de la cellule durant la migration dirigée, en réponse à un stimulus chimiotactique. La migration dirigée nécessite une orientation précise de l'axe avant-arrière de la cellule d'après la détection de la direction. Détecter la direction dans laquelle la cellule doit migrer est la fonction essentielle de Cdc42. L'altération de l'expression de Cdc42 conduit à une migration aléatoire : les cellules peuvent former l'axe avant-arrière, mais sont incapables de s'orienter selon un gradient chimiotactique (Allen et coll. 1998). Une protéine cible de Cdc42, la kinase PAK1, est capable de médier l'activation de Cdc42 en aval des récepteurs couplés aux protéines G, qui sont activés par des chimioattractants. Cette boucle de rétrocontrôle positive conduit à une activité élevée de Cdc42 à l'avant de la cellule. Cdc42 peut influencer la polarité de la cellule en relocalisant le centre organisateur de microtubules (MTOC) et l'appareil de Golgi devant le noyau, orienté vers l'avant de la cellule. L'orientation du MTOC contribue à la polarisation de la migration en facilitant la croissance des microtubules dans les lamellipodes et le transport des vésicules, dérivées de l'appareil de Golgi, vers l'avant de la cellule afin de fournir les molécules nécessaires à la protrusion. En l'absence de Cdc42, la réorientation du MTOC et du Golgi ne se fait pas, alors qu'une expression constitutive de Cdc42 perturbe l'orientation de ces composants intracellulaires. Ces données suggèrent que l'activation mais aussi une localisation spatiale restreinte de Cdc42 sont requises pour une

polarisation correcte de la cellule. La polarisation de la cellule fait également intervenir d'autres protéines, les complexes de polarité, qui vont interagir avec Cdc42.

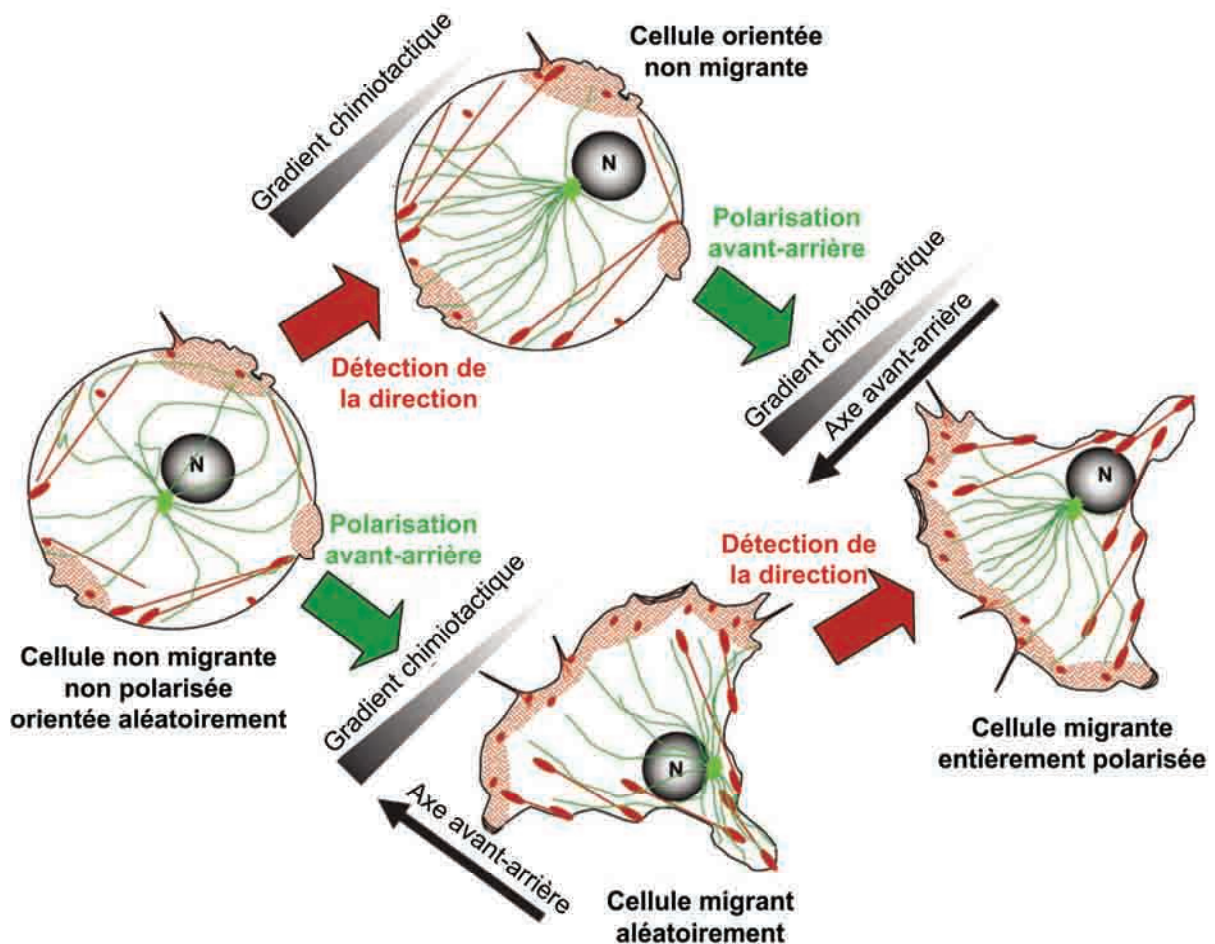


Figure 21 : La polarité des cellules en migration. En réponse à un gradient chimioattractant, la polarisation avant-arrière (flèches vertes) et la détection de la direction (flèches rouges) doivent avoir lieu pour transformer une cellule orientée aléatoirement et non polarisée (dessin de gauche) en une cellule migrante entièrement polarisée (dessin de droite). La formation de l'axe avant-arrière est requise pour la migration, mais pas suffisante pour la chimiotaxie (dessin du bas). Dans ce cas la cellule subie une migration aléatoire. L'orientation cellulaire est cruciale pour la migration dirigée, mais n'est pas suffisante pour induire cette migration (dessin du haut). N : noyau. (d'après Etienne-Manneville 2008).

2.2.2- Les complexes de polarité

Trois groupes de protéines vont participer à la formation et au maintien de la polarisation de la cellule : le complexe Par, le complexe Scrib et le complexe Crb (Etienne-Manneville 2008).

Le complexe Par, qui inclut les protéines Par et l'aPKC (protéine kinase C atypique), est le premier complexe de polarité identifié pour son implication dans la polarité des cellules en migration. Cdc42 fixe Par6 et Par3 et promeut l'activation de aPKC. L'activation localisée de aPKC est cruciale pour l'organisation polarisée des microtubules et l'orientation de la cellule. Par6 est également capable de réguler RhoA. Une fois localisé à l'avant de la cellule, Par6 recrute Smurf1, qui peut initier la dégradation locale de RhoA. Par6 participe ainsi à la formation de l'axe avant-arrière en favorisant l'activité protrusive à l'avant de la cellule. Par3 peut se complexer avec Tiam-1 et induire une migration dirigée par la stabilisation des microtubules à travers la régulation et la localisation de Par6 et aPKC. LKB1/Par4 est également impliquée dans la polarisation cellulaire (Partanen et coll. 2009). LKB1 a été montré pour interagir avec la protéine Cdc42 active afin de la maintenir à l'avant de la cellule en migration.

Le complexe Scrib est formé des protéines Scrib, Dlg et Lgl. Scrib est requis pour l'activation et la localisation de Cdc42 à la membrane plasmique à l'avant de la cellule. Durant la migration, Scrib interagit avec β PIX, qui est aussi recruté à l'avant de la cellule dans le but de promouvoir d'une part l'activation de Cdc42 et l'orientation cellulaire et d'autre part la localisation de Rac à l'avant de la cellule. Scrib semble être requis pour la migration dirigée en maintenant l'activité protrusive. Dlg a un rôle important dans la régulation du réseau de microtubules. Son recrutement dépend de Scrib, Cdc42, Par6 et aPKC. La protéine Lgl est phosphorylée par aPKC, suggérant qu'elle puisse être impliquée dans le contrôle de l'orientation cellulaire.

Le complexe Crb est composé des protéines Crb, PALS1 et PATJ. PATJ est recruté à l'avant de la cellule en migration et contrôle la localisation de Par3 et aPKC vraisemblablement à travers PALS1 et Par6. Crb ne semble pas être impliqué dans ce phénomène.

Bien que seulement quelques protéines de ces complexes ont été directement impliquées dans la polarisation avant-arrière de la cellule, elles sont toutes essentielles à l'orientation cellulaire.

3- Formation des protrusions et de l'adhésion

3.1- Formation des protrusions

Les filaments d'actine (figure 22) sont intrinsèquement polarisés avec une croissance rapide de l'extrémité « barbelée » (ou plus) et une croissance lente de l'extrémité « pointue » (ou moins). Cette polarité de l'actine va être utilisée pour former les protrusions membranaires. Il y a deux types de protrusion : les lamellipodes, qui sont des structures larges et plates, où les filaments d'actine forment un réseau dendritique ramifié, et les filopodes, qui sont fines et cylindriques, où l'actine est organisée en longs faisceaux parallèles. Les organites cytoplasmiques sont exclus de ces structures (Lauffenburger et Horwitz 1996). Les Rho GTPases Rac et Cdc42 sont requises pour la protrusion des lamellipodes et des filopodes en ciblant les protéines de la famille WASP/WAVE (Kurisu et Takenawa 2009). L'activation localisée de Rac à l'avant de la cellule va initier la protrusion. Une fois que la protéine Rac est active, plusieurs boucles de rétrocontrôle sont capables d'aider au maintien de la protrusion. Rac stimule l'extension des lamellipodes par l'activation des protéines WAVE à la membrane, alors que Cdc42 interagit avec les protéines WASP. Dans les deux cas, cela conduit à l'activation localisée du complexe Arp2/3 qui va induire la polymérisation de l'actine en réseau dendritique. Cependant, l'interaction Cdc42-WASP n'intervient pas dans la formation des filopodes. Les protéines WASP/WAVE peuvent également réguler l'activité de Rac et Cdc42 en se fixant aux protéines GAP et GEF.

Plusieurs protéines se fixant à l'actine régulent le taux et l'organisation de la polymérisation de l'actine dans les protrusions, en affectant la disponibilité des monomères et des extrémités libres. Les protéines *capping* forment la coiffe qui termine l'élongation des filaments, limitant ainsi la polymérisation de nouveaux filaments à proximité de la membrane. La profiline se fixe aux monomères d'actine et les cible à l'extrémité « barbelée ». Les protéines de la famille ADF/cofiline vont permettre le désassemblage de l'actine à l'extrémité « pointue », dont la cellule a besoin pour générer des monomères d'actine utile à la polymérisation. D'autres protéines jouent un rôle de support dans le réseau d'actine dendritique des lamellipodes comme la cortactine, la filamine A et l' α -actinine.

Dans les filopodes, les filaments d'actine s'allongent en faisceau aux extrémités « barbelées », et les monomères d'actine sont relâchés aux extrémités « pointues ». Plusieurs protéines sont enrichies à la pointe des filopodes (figure 23). Les formines catalysent la nucléation et l'élongation des filaments d'actine linéaires par l'insertion des monomères à l'extrémité « barbelée ». La formine la plus importante impliquée dans l'assemblage des

filopodes est mDia2/Drf3, protéine effectrice de Cdc42. Les protéines Ena/VASP, retrouvées à la pointe des filopodes, participent au développement de l'élongation et à l'attache des filaments à la périphérie cellulaire. Ces protéines permettent une élongation continue des filaments en empêchant la coiffe et les ramifications. Les protéines IRSp53 participent également à la formation des filopodes (Faix et coll. 2009).

La RhoGTPase Rho est localisée à l'arrière de la cellule où elle supprime l'activité de Rac et la contraint à l'avant de la cellule, prévenant ainsi la formation de protrusion à l'arrière.

Les lamellipodes, à travers l'activation localisée du complexe Arp2/3, peuvent croître dans une direction particulière, fournissant la base de la migration dirigée. A l'inverse, les filopodes, avec leur organisation en faisceaux parallèles, sont désignés comme sondes pour l'exploration de l'environnement local. Les filopodes ne sont pas essentiels à la chimiotaxie.



Figure 22 : Filament d'actine. Les filaments d'actine se polymérisent par addition des monomères d'actine à l'extrémité « barbelée » (ou +) et par dissociation de ces monomères à l'extrémité « pointue » (ou -).

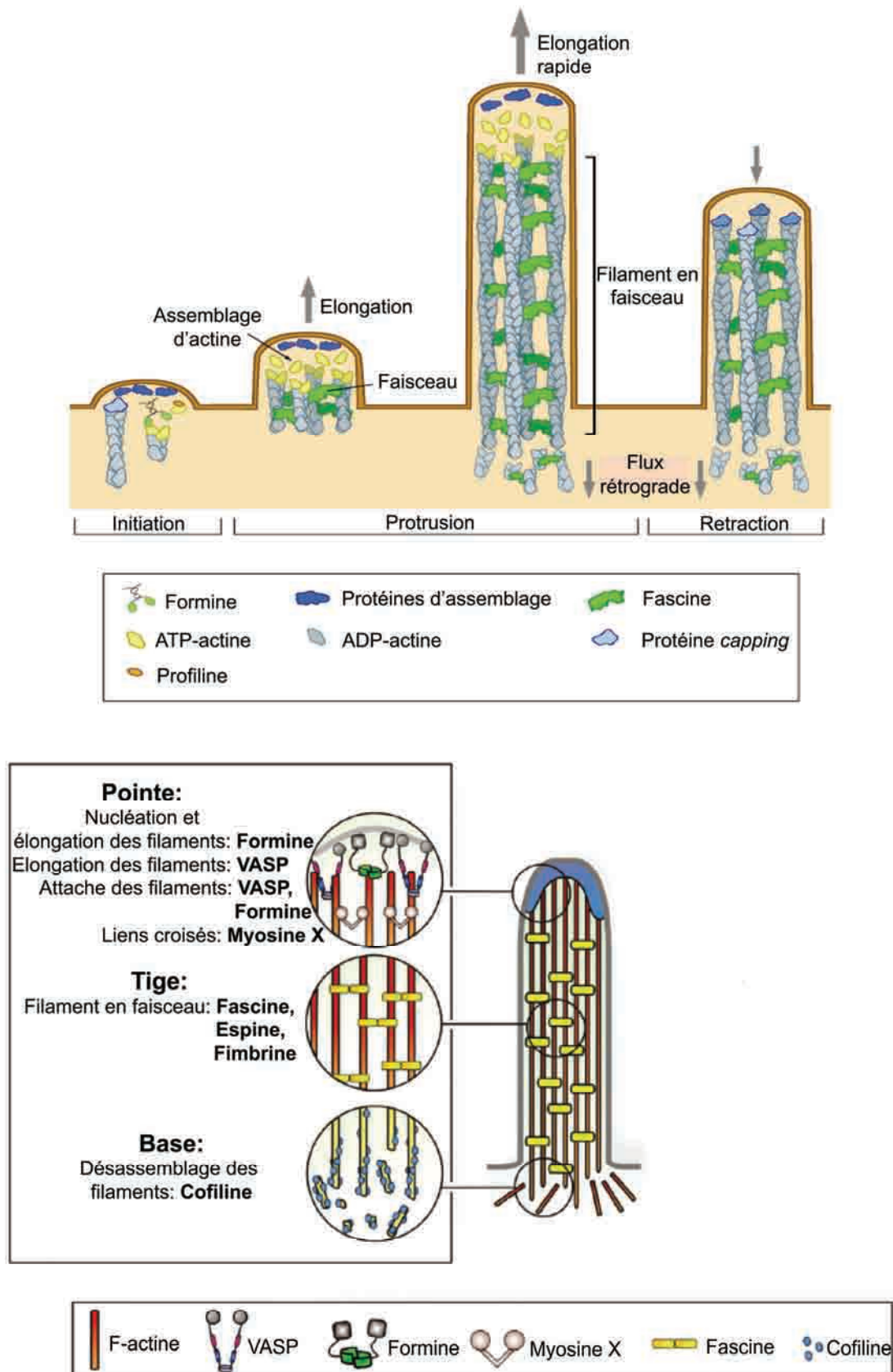


Figure 23 : Activité protéique requise pour l'initiation des filopodes et des protrusions. (d'après Faix et coll. 2009).

3.2- Formation de l'adhésion

Lors de la migration, une protrusion doit se former et être ensuite stabilisée par son attachement au milieu environnemental. Bien que différents récepteurs soient impliqués dans la migration, les intégrines en sont les principaux. Ces récepteurs agissent comme les « pieds » de la migration cellulaire en supportant l'adhésion à la matrice extracellulaire et en étant liés aux filaments d'actine par des protéines adaptatrices à l'intérieur de la cellule.

3.2.1- Les intégrines

Les intégrines sont une famille de récepteurs hétérodimériques composés de deux sous-unités transmembranaires, α (120 à 180 kDa) et β (90 à 110 kDa), liées de manière non covalente. Les deux sous-unités composant une intégrine sont constituées d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire, et d'un court domaine cytoplasmique de 20 à 50 acides aminés (figure 24), excepté pour la sous-unité $\beta 4$ dont la queue cytoplasmique a une taille de plus de 1000 acides aminés. Chez l'homme, il a été dénombré 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui peuvent s'associer de façon hétérodimérique pour former au moins 24 récepteurs différents (tableau VII). De nombreuses intégrines sont capables d'interagir avec le motif RGD (Arg-Gly-Asp) présent au sein de protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la vitronectine. Le domaine extracellulaire de 9 sous-unités α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αD , αE , αL , αM et αX) est formé d'un domaine I qui est le site de fixation du ligand. Ces domaines I contiennent un site d'adhésion dépendant des ions métalliques (MIDAS), qui fait partie intégrante de la poche de liaison au ligand. Certaines sous-unités β contiennent également un domaine I-like capable de lier le ligand et de pallier ainsi à l'absence de domaine I de sous-unités α (Kuphal et coll. 2005, Luo et coll. 2007). Les courts domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β ne possèdent pas d'activité catalytique. Elles transduisent un signal en fixant diverses protéines effectrices, qui peuvent être associées directement ou indirectement au cytosquelette d'actine (tableau VIII, figure 25).

La fixation d'un ligand au niveau de la partie extracellulaire de l'intégrine va conduire à des changements conformationnels du récepteur par modification des interactions entre les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β (signalisation « inside-out »), et par regroupement des intégrines (cluster d'intégrines). Cela va initier des signaux intracellulaires (signalisation « outside-in ») tels la phosphorylation de tyrosines de certaines protéines ou l'activation de petites GTPases, qui vont réguler la formation et la force des sites d'adhésion, l'organisation et la dynamique du cytosquelette, et la polarisation cellulaire durant la

migration. Les intégrines actives sont essentiellement localisées à l'avant de la cellule, où se forment de nouveaux sites d'adhésion. L'affinité de l'intégrine est régulée en partie par l'altération de la conformation. L'activation de la GTPase Rap1 ou de la PKC va augmenter l'affinité de l'intégrine pour son ligand. A l'inverse, l'activation de Raf-1 supprime souvent l'activation de l'intégrine. La protéine intracellulaire taline promeut l'activation de l'intégrine en se fixant à la queue de la sous-unité β et en dissociant l'interaction des domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β . La signalisation des intégrines peut être modifiée par des modifications post-traductionnelles des domaines cytoplasmiques comme la phosphorylation de la sous-unité d'intégrine $\alpha4$ qui est requise dans le maintien des lamellipodes des cellules en migration.

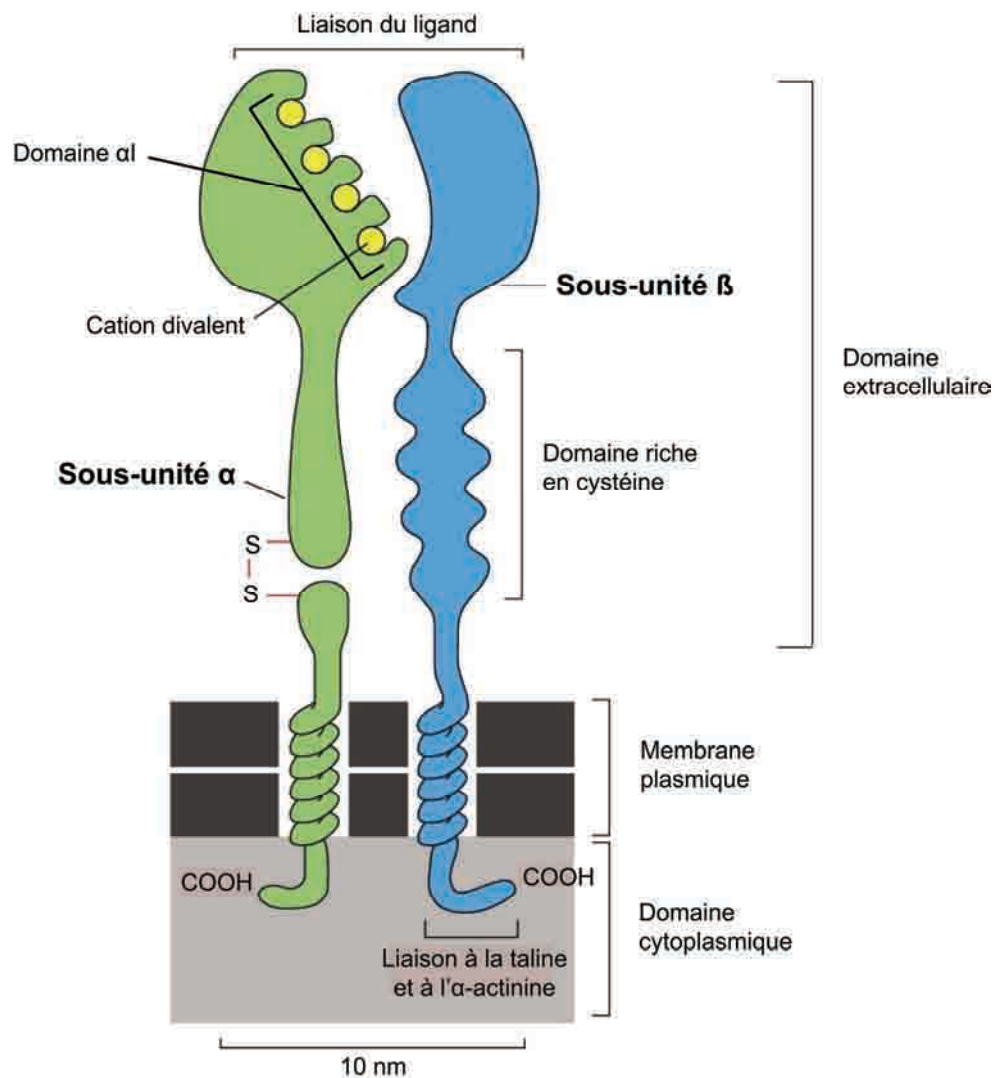


Figure 24 : Représentation schématique de la structure d'une intégrine hétérodimérique.

Tableau VII : Classement des intégrines selon leur relation avec leur principal ligand.
(d'après Wiesner et coll. 2005).

$\beta 1$			$\beta 7$		$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 5,6,8$	$\beta 4$
RGD	Laminine	Collagène	RGD	cellule-cellule	cellule-cellule	RGD	RGD	Laminine
$\alpha 5\beta 1$								
$\alpha 8\beta 1$		$\alpha 1\beta 1$			$\alpha D\beta 2$		$\alpha V\beta 5$	
	$\alpha 3\beta 1$	$\alpha 2\beta 1$			$\alpha L\beta 2$	$\alpha V\beta 3$		
$\alpha V\beta 1$			$\alpha 4\beta 7$	$\alpha E\beta 7$			$\alpha V\beta 6$	$\alpha 6\beta 4$
	$\alpha 6\beta 1$	$\alpha 10\beta 1$			$\alpha M\beta 2$	$\alpha IIb\beta 3$		
$\alpha 4\beta 1$							$\alpha V\beta 8$	
	$\alpha 7\beta 1$				$\alpha X\beta 2$			
$\alpha 9\beta 1$		$\alpha 11\beta 1$						

Tableau VIII : Ligands du domaine cytoplasmique de la sous-unité d'intégrine β .
(d'après Wiesner et coll. 2005).

Protéine	Intégrine	Partenaire d'interaction
Taline	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$ αIIb	FAK, vinculine F-actine PIP(4,5)2, PIPKI γ
Paxilline	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$ $\alpha 4, \alpha 9$	FAK, ILK, vinculine, α -parvine PKL, PAK Git, PAG LIM kinase
FAK	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	Paxilline, taline p130Cas, Src PI3K, PLC γ GRAF, ASAP p190RhoGEF N-WASP
ILK	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	Paxilline PINCH, parvine ILKAP PIP3
α -actinine	$\beta 1, \beta 2, \beta 3$	Vinculine, zyxine, β -parvine F-actine Erk1/2
Filamine	$\beta 1, \beta 2, \beta 7$	F-actine Trio migfiline
Tensine		
Myosine-X	$\beta 1, \beta 3, \beta 5$	

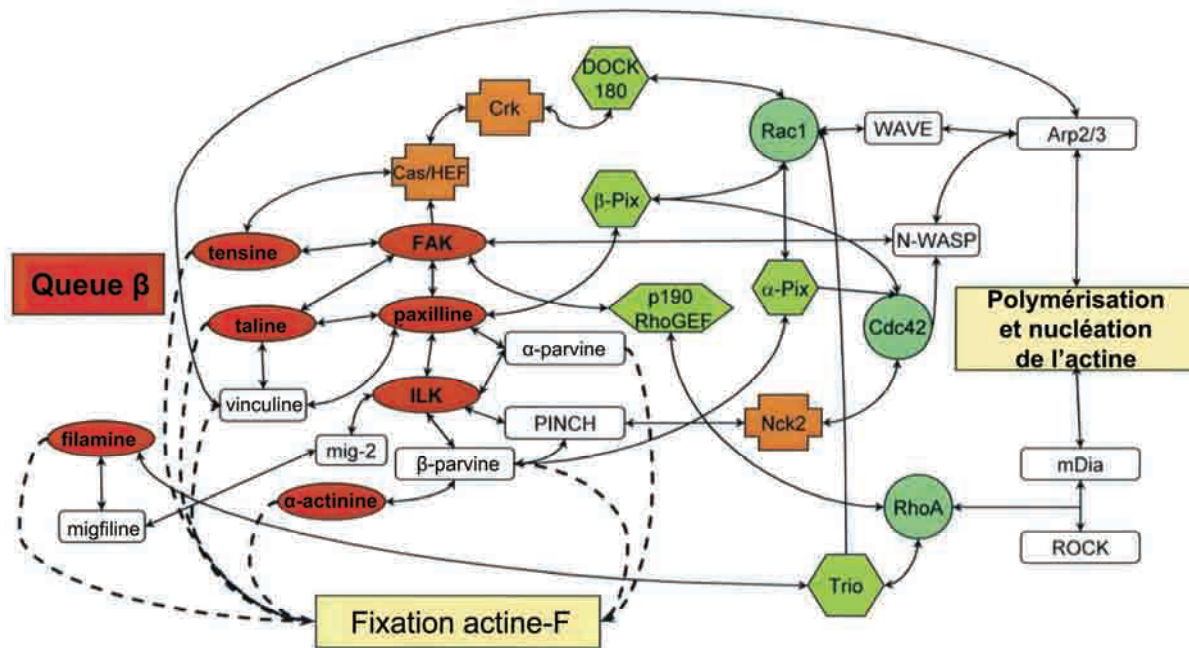


Figure 25 : Schématisation des interactions à proximité des intégrines entre les différentes protéines impliquées dans la migration. La queue cytoplasmique de l'intégrine β et ses ligands directs sont représentés en rouge, les protéines GEF en vert, les Rho GTPases en turquoise, et les adaptateurs SH3/SH2 en orange. (d'après Wiesner et coll. 2005).

3.2.2- Assemblage de l'adhésion – Protéines des complexes focaux

Les mécanismes de l'assemblage de l'adhésion au cours de la migration sont encore mal connus. Il semblerait que l'adhésion débute par des regroupements d'intégrine à petite échelle, du à la nature variée des composants de la matrice extracellulaire, sur lesquels la cellule adhère. Les cellules qui migrent rapidement comme les leucocytes présentent peu de clusters d'intégrine visibles. Dans les autres cellules, de petites adhésions (≈ 100 nm) connues sous le nom de complexes focaux peuvent être observées à l'avant de la cellule. Ces structures sont dynamiques et nécessitent un renouvellement constant. La formation de ces adhésions dépend de Rac et Cdc42. Cependant, l'adhésion focale, présentant de larges clusters d'intégrine, est caractéristique des cellules fortement adhérentes et non-migrantes ou alors qui bougent très lentement. L'assemblage des complexes focaux implique Rho ainsi que d'autres protéines comme la taline, la kinase de l'adhésion focale (FAK) ou la protéine Scr (Wiesner et coll. 2005).

3.2.2.1- La taline et la vinculine

La taline est une protéine de 270 kDa qui fixe l'actine-F et qui joue un rôle central dans l'activation des intégrines, la formation de l'adhésion et le lien des intégrines au cytosquelette d'actine. La dégradation de la taline est une étape clé dans le renouvellement des adhésions focales.

La vinculine peut promouvoir et stabiliser le cluster d'intégrine initial en liant de nouvelles actines-F au complexe focal naissant. Cependant, la vinculine joue un rôle de régulateur négatif dans le renouvellement de l'adhésion à la matrice, puisque des fibroblastes *vinculine* *-/-* migrent deux fois plus vite que des fibroblastes qui expriment cette protéine. La vinculine est essentiellement localisée au niveau de l'adhésion focale mature (Mierke 2009).

3.2.2.2- Les protéines FAK et Src

FAK est une protéine kinase de 125 kDa capable de phosphoryler les tyrosines de certaines protéines et qui joue un rôle dans la signalisation des intégrines. Plusieurs protéines de signalisation ont été montrées pour interagir directement avec FAK (figure 26). L'activation de FAK, en réponse à l'activation des intégrines, conduit à l'autophosphorylation de la tyrosine 397, créant ainsi un site de fixation de haute affinité pour les protéines Src. La fixation de Src (60 kDa) sur la Tyr397 de FAK va induire la phosphorylation des autres tyrosines de FAK. L'interaction entre la protéine FAK et Src va médier différentes voies de signalisation impliquées dans la migration (figure 27). Ces protéines jouent un rôle important dans le renouvellement des complexes focaux, étape clé de la migration (Schlaepfer et coll. 1999, Playford et Schaller 2004). Ainsi, la protéine FAK est requise pour le recrutement de calpaïne, une famille de protéases à cystéine dépendant du calcium, au niveau de l'adhésion focale, ce qui va conduire à un désassemblage de cette adhésion par protéolyse et permettre ainsi la rétraction de l'arrière de la cellule (voir paragraphe 5).

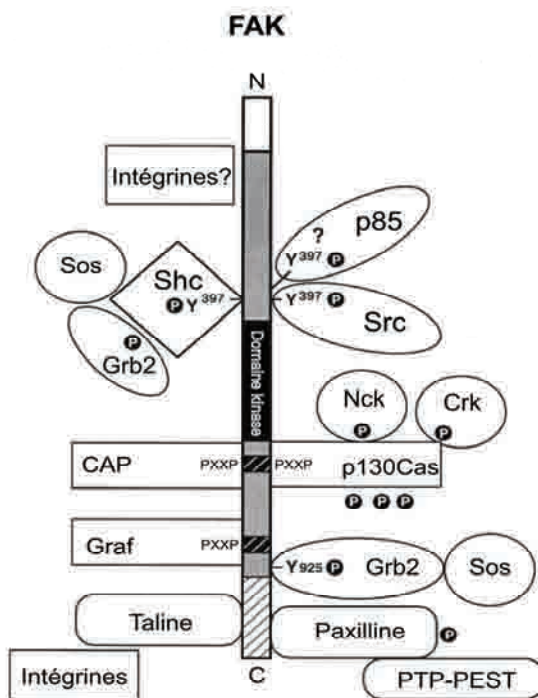


Figure 26 : Les protéines associées à FAK. (d'après Schlaepfer et coll. 1999).

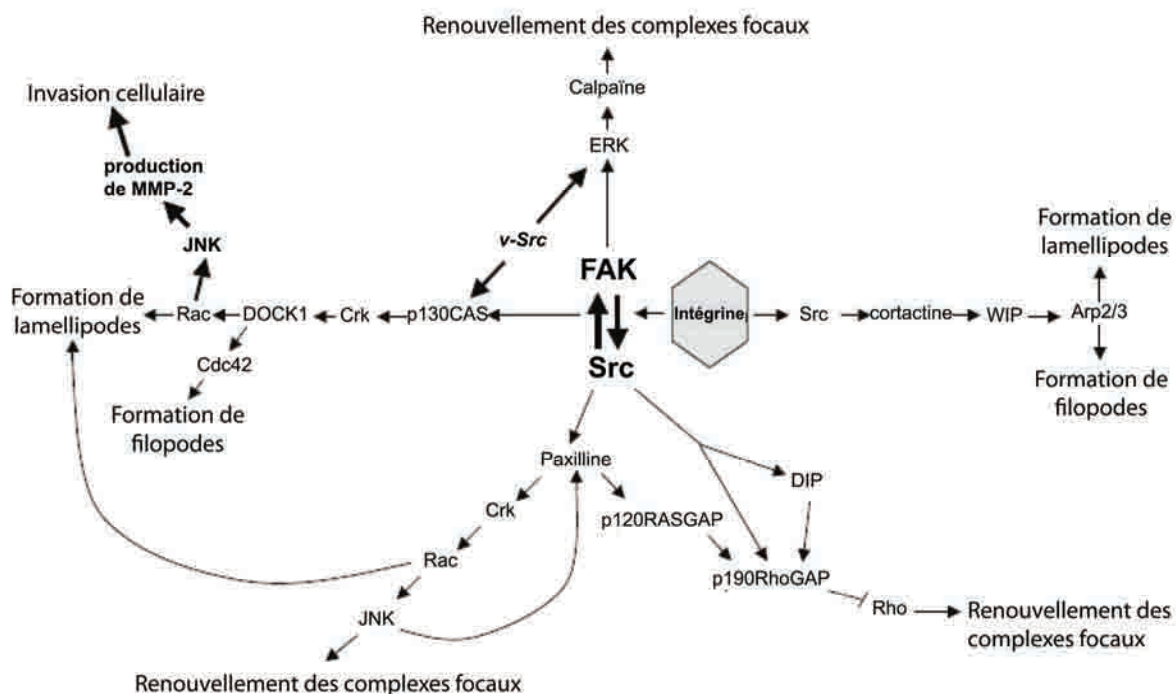


Figure 27 : Les protéines FAK et Src dans la signalisation de la migration cellulaire. (d'après Playford et Schaller 2004).

3.2.2.3- La paxilline

La paxilline est une protéine adaptatrice modulaire qui a d'importantes fonctions dans l'assemblage de l'adhésion, le renouvellement et la signalisation. Cette protéine est l'une des premières à être recrutée au niveau des complexes focaux naissants. La paxilline est capable de réguler l'activation de Rac et Cdc42 en se fixant à β PIX, une protéine GEF. Elle a également un rôle important dans le renouvellement des complexes focaux.

4- Les forces de traction et de contraction

Au moins deux types distinctes de force doivent être générés indépendamment par une cellule en migration. La première est la force protrusive nécessaire à l'extension membranaire dans la formation des lamellipodes et filopodes. Cette force est fournie par la polymérisation de l'actine et son organisation comme décrit dans les paragraphes précédents (3.1). La seconde force est une force contractile, nécessaire au mouvement du corps de la cellule vers l'avant. La figure 28 illustre ces différentes forces. Par la connexion entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette intracellulaire, les intégrines servent de sites de traction. La force d'attachement cellulaire est déterminée par la densité de ligands accessibles, le nombre de récepteurs d'adhésion, et l'affinité des récepteurs pour les ligands.

La force transmise aux sites d'adhésion dérive de l'interaction entre la myosine II et les filaments d'actine, qui sont attachés à ces sites. La myosine II va contracter les filaments d'actines, contractant ainsi le corps cellulaire, ce qui va permettre le mouvement de la cellule. L'activité de la myosine II est régulée par la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC), qui est soit régulée positivement (activée) par la MLC kinase (MLCK) ou par la Rho kinase (ROCK), ou soit négativement régulée (inhibée) par la MLC phosphatase, qui est elle-même phosphorylée et inhibée par ROCK. MLCK est régulée par la concentration de calcium intracellulaire et par phosphorylation. ROCK est quant à elle régulée par fixation à RhoGTP.

Dans les cellules en migration, les forces les plus importantes sont transmises au niveau des complexes focaux de l'avant et de la région rétractrice arrière de la cellule.

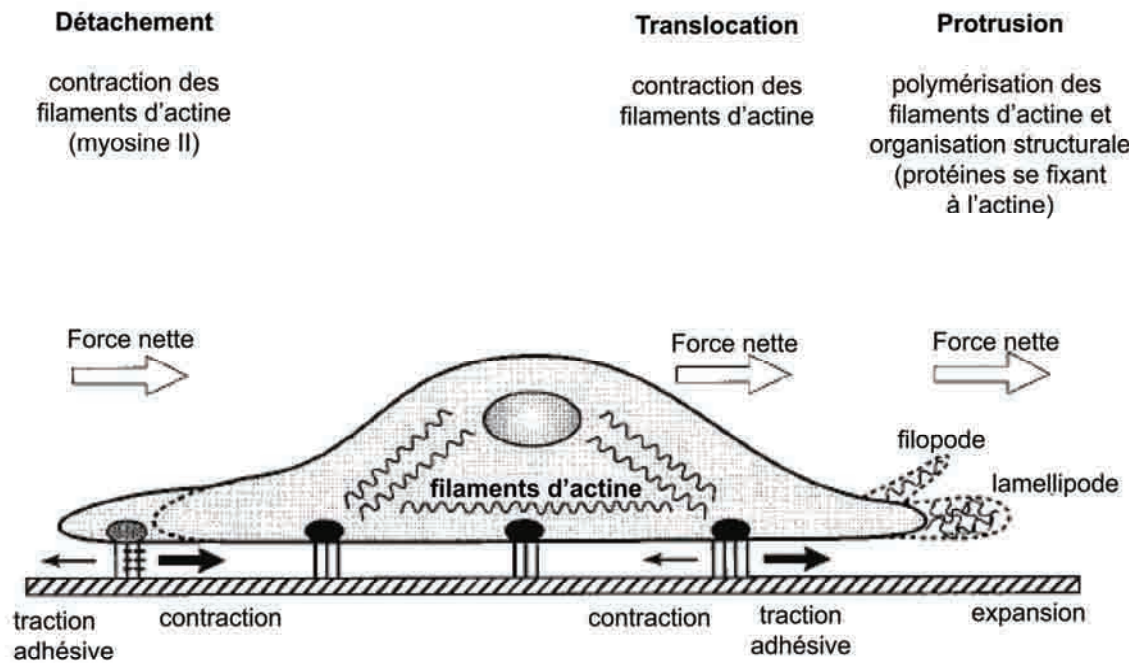


Figure 28 : Illustration des différentes forces impliquées dans la migration cellulaire. (d'après Lauffenburger et Horwitz 1996).

5- Désassemblage de l'adhésion et rétraction à l'arrière de la cellule

Les cellules en migration ont besoin de désassembler l'adhésion se trouvant dans leur partie arrière pour avancer. Les fortes tensions exercées sur l'adhésion de l'arrière de la cellule, par la contraction induite par la myosine II, contribuent au détachement. Dans les fibroblastes, l'adhésion de l'arrière de la cellule au substrat de la matrice extracellulaire étant forte, la tension exercée peut rompre physiquement le lien entre l'intégrine et le cytosquelette d'actine. Il en résulte alors un abandon des intégrines sur le substrat tandis que la cellule continue de migrer. Les molécules associées au cytosquelette comme la taline et la vinculine ne sont pas présentes sur cette membrane abandonnée, mais ont plutôt tendance à s'accumuler à l'arrière de la cellule en rétraction. Les intégrines restant à la surface cellulaire sont soit redispersées pour être utilisées dans de nouvelles adhésions ou soit endocytées dans des vésicules et accumulées dans le corps cellulaire (Lauffenburger et Horwitz 1996). Bien que la rétraction contribue au mouvement des cellules en migration, elle peut aussi contribuer à la polarité, puisque le désassemblage de l'adhésion à l'arrière de la cellule est couplé à une

augmentation de l'activité protrusive à l'avant. Les protéines FAK, Src et la paxilline sont impliquées dans le renouvellement de l'adhésion à l'arrière de la cellule. Les niveaux de calcium intracellulaire sont également impliqués dans le désassemblage de l'adhésion. Le calcium est capable d'activer la protéase calpaïne, qui peut aussi être activée par ERK, et qui a le potentiel de cliver plusieurs protéines des complexes focaux tels que les intégrines, la taline, la vinculine et la protéine FAK.

Matériel
Et
Méthodes

CHAPITRE I : MATERIEL BIOLOGIQUE

1- Souche cellulaires

- A375 (ATCC®#CRL-1619™) : Cellules de mélanome humain hautement métastatiques, adhérentes.
- HT144 (ATCC®#HTB-63™) : Cellules de mélanome humain métastatiques, adhérentes.
- B16F1 (ATCC®#CRL-6323™) : Cellules de mélanome murin faiblement métastatiques, adhérentes.
- CHO (ATCC®#CCL-61™) : Cellules dérivées d'ovaires de hamster chinois, adhérentes. Les cellules ont été obtenues par le Dr. C. Franz (Université de Karlsruhe, Karlsruhe, Allemagne).
- HEK-293 (ATCC®#CRL-1573™) : Cellules humaines dérivées de tissu épithélial de rein embryonnaire, adhérentes. Les cellules ont été obtenues par le Dr. R. Wagener (Université de Cologne, Medical Faculty, Cologne, Allemagne).
- MRC5 (ATCC®#CCL-171™) : Cellules fibroblastiques humaines dérivées de tissu de poumon normal fœtal, adhérentes.
- HUVEC (ATCC®#CRL-1730™) : Cellules endothéliales humaines dérivées de la veine ombilicale, adhérentes. Les cellules ont été obtenues chez Promocell.
- Fibroblastes dermiques : Cellules humaines issues d'un prépuce âgé d'1 an, adhérentes.
- CSM : Cellules souches mésenchymateuses multipotentes issues de la moelle osseuse, adhérente.

La morphologie des différents types cellulaires est représentée en figure 29.

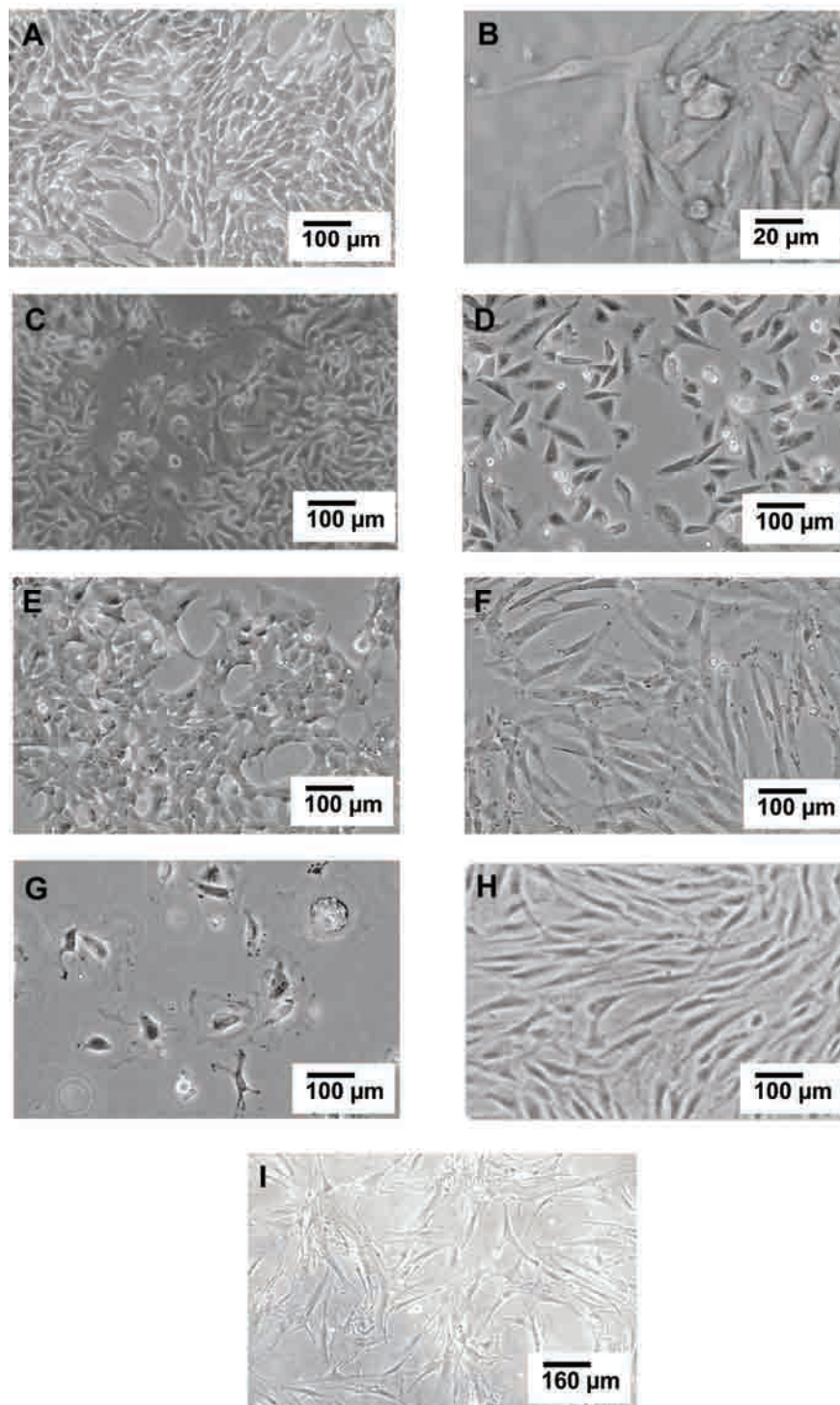


Figure 29 : Observation des différents types cellulaire au microscope à contraste de phase. A : A375, B : HT144, C : B16F1, D : CHO, E : HEK-293, F : MRC5, G : HUVEC, H : Fibroblastes dermiques, I : CSM.

2- Protéines de la MEC

- Les formes de lumicanne Hlum 37, Hlum 57 et Hlum 87 et les fragments dérivés L 1-6 et L 1-9 ont été obtenu au laboratoire comme décrit dans le chapitre Méthodes.
- Le collagène de type I a été obtenu au laboratoire à partir de queues de rat par extraction avec 0,1 M d'acide acétique.
- La fibronectine humaine a été obtenue chez Millipore.

3- Peptides synthétiques

Les peptides synthétiques dérivés du lumicanne et de la fibromoduline ont été synthétisés par la société GenScript Corporation. Les peptides ont été purifiés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) phase inverse.

Peptides dérivés du lumicanne

Peptide 5 : LQHNRLKEDAVS

Peptide 7 : VSLLTLYLDNKNKISNIP

Peptide 8 : NALQYLRLSHNELADSG

Peptide 9 (lumcorin) : SSLVELDLSYNKLKNIP

Peptide 9 scramble (SCR) : LPSVSILEKLYNNLSKD

Peptide 11 : SYSKIKHLRLDGNRISE

Peptide L9F : SFNVSSLV

Peptide L9M : ELDLSYNKLK

Peptide L9R : LKNIPTVNEN

Peptides dérivés de la fibromoduline

Peptide FmodLRR9 : SSLLELDLSYNQLQKIP

Peptide F9M : DLSYNQLQK

Les peptides sont solubilisés dans de l'acide acétique 18 mM, excepté le peptide FmodLRR9 qui est dissous dans un tampon salin (PBS) additionné de NH₄OH.

4- Anticorps

4.1- Anticorps primaires

- Les anticorps anti-lumicanne dirigés contre la séquence de 17 acides aminés YLDNNKISNIPDEYFKR ou la protéine cœur du lumicanne entier ont été obtenus au laboratoire comme décrit dans le paragraphe 2.2.3 du chapitre méthodes.
- L'anticorps anti-kératane sulfate a été obtenu chez Calbiochem. C'est un anticorps monoclonal (clone 5-D-4) fabriqué chez la souris.
- Les anticorps anti-FAK et anti-p FAK (Tyr 397)-R ont été obtenus chez Santa Cruz Biotechnology. Les deux anticorps sont polyclonaux et fabriqués chez le lapin. Le premier épitope correspond aux acides aminés 903-1052 de la protéine FAK de souris et le deuxième à la tyrosine 397 phosphorylée de FAK de l'humain.
- Les anticorps monoclonaux anti-intégrine humaine (α 1 (FB12), α 2 (P1E6), α 3 (P1B5), α 5 (P1D6) ou β 1 (6S6)) ont été obtenus chez Chemicon.

4.2- Anticorps secondaires

- L'anticorps anti-IgG1 de lapin et anti-IgG1 de souris couplés à la peroxidase ont été obtenus chez Amersham Biosciences.
- L'anticorps anti-IgG de souris couplé à l' Alexa Fluor[®] 488 a été obtenu chez Invitrogen. L' Alexa Fluor[®] 488 absorbe à 496 nm et émet une fluorescence à 519 nm.

5- Plasmides

5.1- pQE30-Hlum

Le plasmide pQE30-Hlum (figure 30) a été obtenu comme précédemment décrit (Vuillermoz et coll. 2004). Les plasmides pQE30-L 1-6 et pQE30-L 1-9 ainsi que pQE30-Hlum(K265A) et pQE30-Hlum(K267A) dérivent de cette construction.

5.2- pCEP4-Hlum

Le plasmide pCEP4-Hlum contenant l'ADNc du lumicanne humain a été obtenu par le Dr. P.J. Roughley (Genetics unit, McGill University, Montreal). Le plasmide est représenté en figure 31.

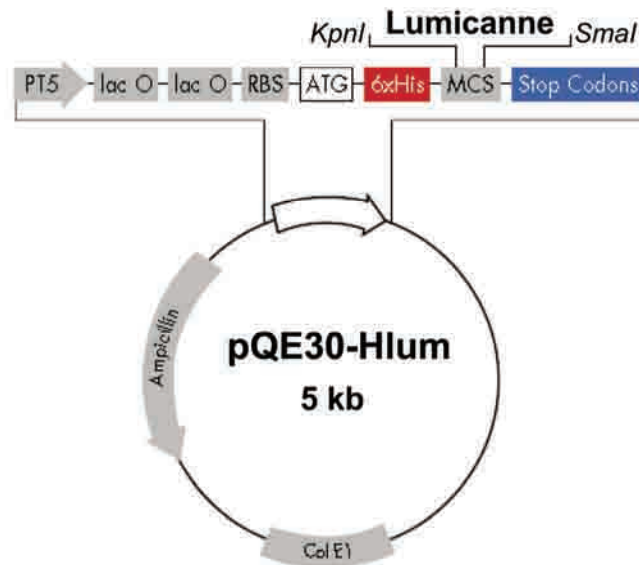


Figure 30 : Schématisation du plasmide pQE30-Hlum. PT5 : promoteur T5, Lac O : opéron lactose, RBS : site de fixation des ribosomes, MSC : site multiple de clonage.

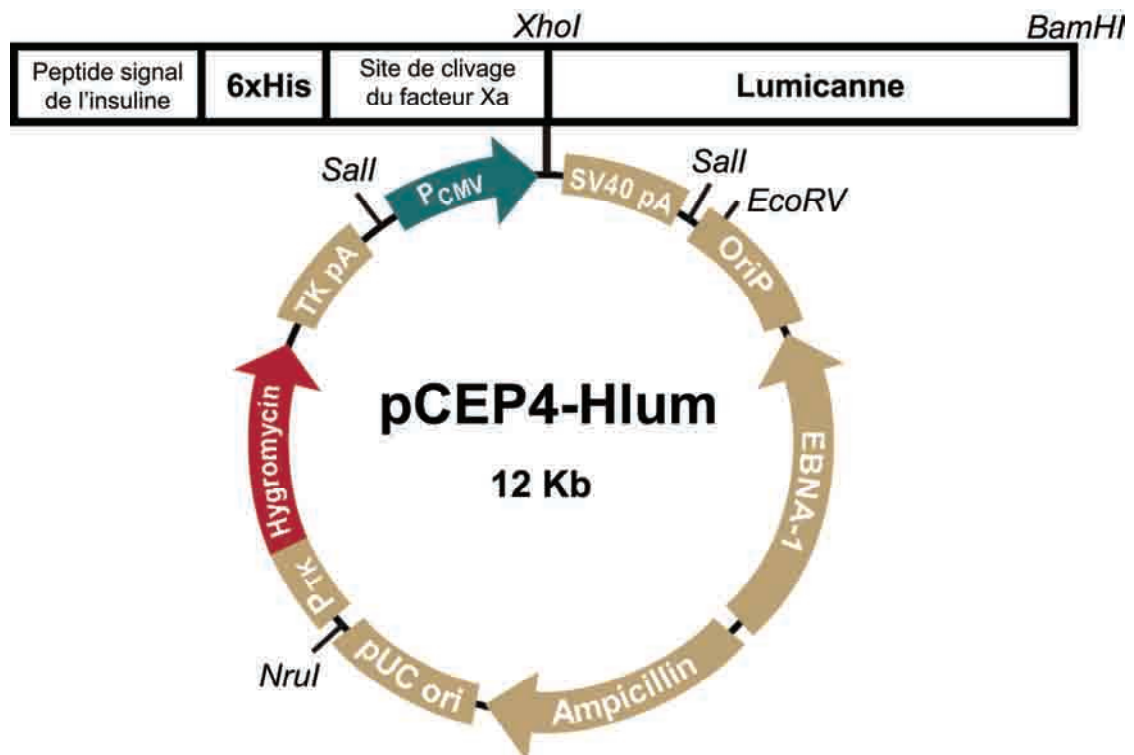


Figure 31 : Schématisation du plasmide pCEP4-Hlum. P_{CMV} : promoteur du cytomégalo virus, TK pA et sv40 pA : signal de polyadénylation, P_{TK} : promoteur de la thymidine kinase, pUC ori et OriP : origines de réplication.

6- siRNA

Afin d'invalider le gène ITGA2 (codant la protéine intégrine $\alpha 2$, GeneID#3673), nous avons utilisé un mélange de siRNA synthétisé par Dharmacon (SMARTpool® ITGA2). Ce pool est constitué de quatre siRNA, chacun ciblant une séquence spécifique de l'ARNm de l'intégrine $\alpha 2$:

1^{er} siRNA, séquence cible : GAACGGGACUUUCGCAUCA

2^{ème} siRNA, séquence cible : GAAACGCCCUUGAUACUAA

3^{ème} siRNA, séquence cible : GUUCAGACCUACUAAGCAA

4^{ème} siRNA, séquence cible : AAACAAGGCUGAUAAUUUG

CHAPITRE II : METHODES

1- Méthodes de Biologie Moléculaire

1.1- Extraction des plasmides à partir de bactéries

L'extraction des plasmides est réalisée grâce au kit Plasmid Maxi (Qiagen). Les cultures bactériennes sont centrifugées (6000 g, 15 min) et le culot bactérien est repris dans 10 ml de tampon de solubilisation (Tris 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8 et contenant 100 µg/mL de Rnase A) auxquels sont ajoutés 10 mL d'une solution de lyse cellulaire (NaOH 200 mM, 1% SDS). Le mélange est laissé 5 minutes à température ambiante. L'ADN bactérien, les protéines et les débris cellulaires sont ensuite précipités par ajout de 10 mL d'une solution d'acétate de potassium 3 M à pH 5,5. Le mélange est incubé 20 minutes sur glace, puis centrifugé (20 000 g, 30 min, 4°C). Le surnageant est prélevé et déposé sur une colonne QIAGEN-tip 500, préalablement équilibré avec un tampon NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, pH 7, isopropanol 15 %, Triton[®] X-100 0,15 %. La colonne est ensuite lavée par 2 fois 30 mL de tampon de lavage (NaCl 1 M, MOPS 50 mM, pH 7, isopropanol 15 %). L'ADN plasmidique est alors élué (NaCl 1,25 M, Tris 50 mM, pH 8,5, isopropanol 15 %), puis précipité par 0,7 volumes d'isopropanol. Après centrifugation (15 000 g, 10 min), le culot est lavé par 5 mL d'éthanol 70 % température ambiante. Le culot plasmidique est alors solubilisé dans un volume adéquat d'eau distillée.

1.2- sous-clonage du lumicanne et des fragments L 1-6 et L 1-9 recombinants

Le sous-clonage du lumicanne recombinant dans le vecteur pQE30 a précédemment été décrit (Vuillermoz et coll. 2004).

1.2.1- Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-6

1.2.1.1- Amplification de la cassette L 1-6

La cassette L 1-6, comprenant l'ADNc du lumicanne des nucléotides G₁₂₃ à T₆₉₈ ainsi que les sites de restriction des enzymes Kpn I et Hind III, a été obtenue par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) à partir d'amorces que nous avons conçues :

L 1-6 Sens : 5'- gag ctc ggt acc agt ggc cag tac tat -3'

L 1-6 Anti-sens : 5'- tgg tga aag ctt aga gag agg gag acc aga -3'

L'amorce L 1-6 Sens contient le site de restriction Kpn I et L 1-6 Anti-sens le site Hind III (nucléotides soulignés). La matrice utilisée est le plasmide d'expression pQE30-Hlum. La température d'hybridation des amorces utilisée en PCR est de 63°C, et le temps d'élongation de 30 secondes, 32 cycles.

Après électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % contenant du bromure d'éthidium (BET), la bande d'intérêt correspondant à l'amplification de la cassette L 1-6 est excisée. Le fragment de gel est ensuite transféré dans un Eluta Tube™ (Fermentas). La cassette est ensuite purifiée par électroélution (100 volt, 20 minutes).

1.2.1.2- Digestion enzymatique de la cassette L 1-6 et du vecteur pQE30

Le vecteur pQE30 et la cassette L 1-6 ont été séparément digérés par les enzymes de restriction Kpn I et Hind III (Invitrogen). La digestion a opéré, à 37°C pendant 1 heure, dans un volume réactionnel de 20 µL, contenant 1 µg du vecteur ou de la cassette, 30U de Kpn I + 30U de Hind III, et 1 µL de tampon REact®2 (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, pH 8) + 1 µL de tampon REact®4 (20 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 7,4).

Le vecteur pQE30 et la cassette L 1-6 digérés sont purifiés par électroélution.

1.2.1.3- Ligation du plasmide pQE30-L 1-6 et transformation bactérienne

La ligation entre le vecteur pQE30 et la cassette L 1-6 digérés est réalisée avec le kit Rapid DNA ligation (Roche). Nous avons utilisé un rapport insert/vecteur de 2,5, soit 250 ng d'insert L 1-6 et 100 ng de vecteur mis en présence avec 5U de ligase. Le volume réactionnel de ligation de 20 µL contient également un tampon de dilution 1X et de ligation 2X. La réaction se déroule à température ambiante durant 20 minutes.

Le produit de ligation est ensuite mis en contact avec des bactéries JM109(DE3) compétentes. Après une incubation de 30 minutes sur glace, le mélange plasmides/bactéries subit un choc thermique de 90 secondes à 42°C, suivi d'un refroidissement sur glace de 2 minutes. Le mélange est pré-incubé 1 heure à 37°C sous forte agitation dans 750 µL de milieu SOC (Invitrogen), puis concentré par centrifugation. Enfin, 100 µL de culture sont étalés sur boîte de Pétri contenant 10 mL de LB à 1,5 % d'Agar et 100 µg/mL d'ampicilline. Les boîtes de Pétriensemencées sont incubées 16 heures à 37°C. Les colonies obtenues sont prélevées et

incubées dans 500 µL de LB à 100 µg/mL d'ampicilline pendant 3 heures. La présence du plasmide pQE30-L 1-6 dans les bactéries JM109(DE3) est vérifiée par PCR. L'insert du fragment L 1-6 contenu dans le plasmide a été séquencé par la société Cogenics.

1.2.2- Construction du plasmide d'expression pQE30-L 1-9

La digestion enzymatique du plasmide pQE30-Hlum a été effectuée dans un volume final de 20 µL, contenant 2 µL de tampon REact[®]4 et 20 U de l'enzyme Hind III. Cette réaction se fait à 37°C pendant 90 minutes. Après électrophorèse en gel d'agarose 1 % contenant du BET, le plasmide ouvert est purifié par électroélution.

Le plasmide est repris par 10 µL de tampon de dilution 1X du kit de ligation Rapid DNA auxquels sont ajoutés 10 µL de tampon de ligation 2X et 1 µL de ligase. La réaction de ligation est réalisée à température ambiante pendant 20 minutes.

La transformation bactérienne par le plasmide pQE30-L 1-9 est réalisée de façon similaire à celle décrite dans le paragraphe 1.2.1.3.

1.3- Mutagenèse dirigée

La technique de mutagenèse dirigée a été utilisée afin de muter, dans le lumicanne humain, deux lysines en alanines (K265A et K267A). Pour chaque mutation, il était nécessaire de muter deux nucléotides. La mutagenèse dirigée a été réalisée avec le kit QuickChange[®] II Site-Directed Mutagenesis de Stratagène (figure 32).

1.3.1- Synthèse des amorces mutagènes

Pour chaque mutation, les deux amorces mutagènes doivent contenir la mutation désirée et s'hybrider sur la même séquence des brins opposés du plasmide. La mutation doit se situer au centre de l'amorce avec de chaque côté ~20-25 bases de séquence correcte. La température de fusion (T_m) des amorces doit être $\geq 78^\circ\text{C}$. Le T_m a été estimé en utilisant la formule suivante : $T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) - 675/N - \% \text{ de nucléotides mutés}$ (Où N est la longueur en base de l'amorce).

Mutation K265A (AA→GC) 42 bases, $T_m = 78,3^\circ\text{C}$

K265A Sens : 5'- ctg gat ctg tcc tat aac gcg ctt aaa aac ata cca act gtc -3'

K265A Anti-sens : 5'- gac agt tgg tat gtt ttt aag cgc gtt ata gga cag atc cag -3'

Mutation K267A (AA→GC) 45 bases, $T_m = 77,5^\circ\text{C}$

K267A Sens : 5'- gat ctg tcc tat aac aag ctt gca aac ata cca act gtc aat gaa -3'

K267A Anti-sens : 5'- ttc att gac agt tgg tat gtt tgc aag ctt gtt ata gga cag atc -3'

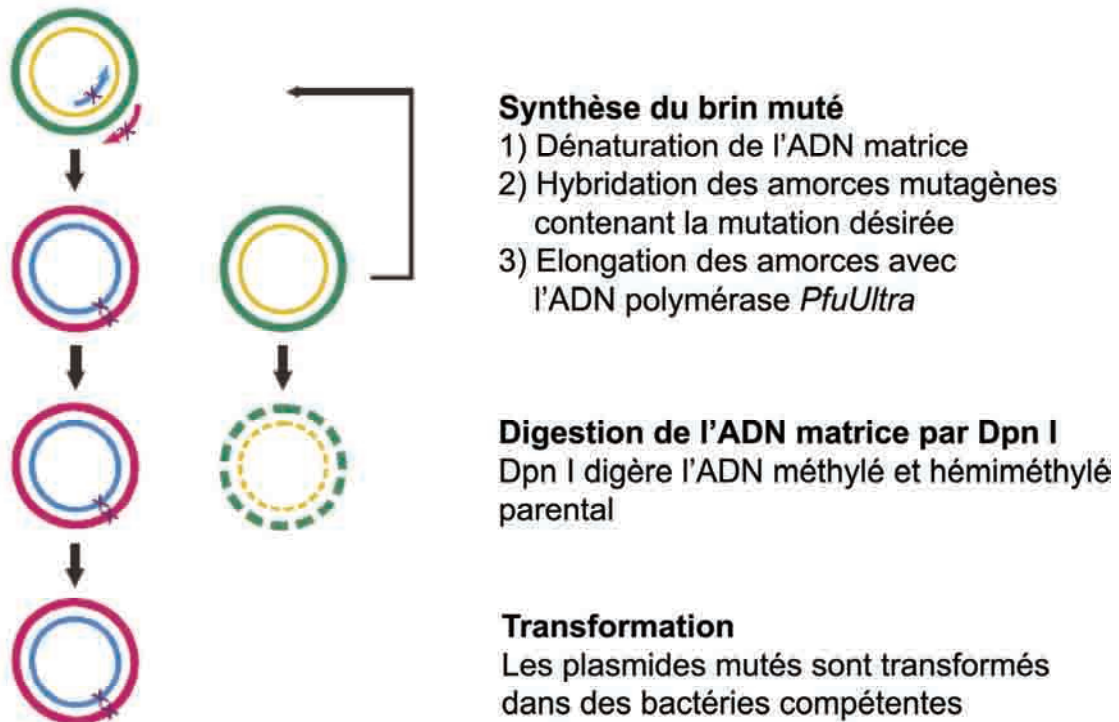


Figure 32 : Représentation de la méthode de mutagenèse dirigée QuickChange® II. Les plasmides vert et jaune représentent l'ADN matrice et les plasmides rose et bleu représentent l'ADN muté. Les croix indiquent les sites de mutation désirés.

1.3.2- Synthèse des brins mutés

Il est nécessaire que la matrice d'ADN (plasmide contenant le gène de la protéine à muter) utilisée soit isolée d'une souche *E. coli* dam^+ , c'est à dire que le plasmide soit méthylé. Le milieu de réaction a un volume final de 50 μL et contient pour chaque mutation à effectuer:

5 μL de tampon de réaction 10X, 50 ng de matrice d'ADN (pQE30-Hlum isolé à partir de souche *E. coli* JM109), 125 ng d'amorce Sens, 125 ng d'amorce Anti-sens, 1 μL de dNTP, H_2O qsp 50 μL et 2,5 U d'ADN polymérase haute fidélité *PfuUltra*.

Le milieu réactionnel est ensuite placé dans un appareil à PCR avec le programme suivant :

1 cycle de 30 sec à 95°C, puis 18 cycles, chaque cycle comprenant 30 sec à 95°C, 1 min à 55°C puis 1 min/kb du plasmide (ici, 5 min) à 68°C.

1.3.3- Sélection des plasmides mutés

Pour discriminer les plasmides comportant la mutation de ceux qui ne l'ont pas, le milieu réactionnel va être digéré par l'enzyme de restriction Dpn I. En effet, cette enzyme digère uniquement l'ADN méthylé et hémiméthylé. Or seul les plasmides extraits de souche bactérienne *dam*⁺ sont méthylés (matrice d'ADN), les plasmides néosynthétisés (comportant la mutation) ne le sont pas. La réaction de digestion débute par l'ajout de 10 U de Dpn I et continue pendant 1 heure à 37°C.

Les bactéries compétentes XL1-Blue sont alors transformées avec le produit de digestion pareillement à la transformation décrite au paragraphe 4.1.4. Les colonies obtenues sont prélevées et incubées dans 500 µL de LB à 100 µg/mL d'ampicilline pendant 3 heures. La présence du plasmide pQE30-Hlum muté (K265A et K267A) dans les bactéries XL1-Blue est vérifiée par PCR. Les plasmides pQE30-Hlum(K265A) et pQE30-Hlum(K267A) ont été extraits (4.1.1) puis séquencés par la société Cogenics, afin de vérifier la présence de la mutation au sein du gène du lumicanne humain.

1.4- RT-PCR

1.4.1- Transcription inverse des ARN (RT)

L'extraction des ARN a été réalisée grâce au kit Rneasy Plus mini (Qiagen). La quantité d'ARN extrait est mesurée par lecture de l'absorbance à 260 nm. Les ARN sont ensuite dénaturés pendant 3 minutes à 90°C et conservés sur glace jusqu'à la création du milieu réactionnel RT. Celui-ci contient (par tube) : 2 µL de tampon 10X (Tris 200 mM, KCl 500 mM, pH 8,4), 2 µL de MgCl₂ 50 mM, 8 µL d'un mélange des quatre dNTP, 10 U de Rnasine, 2 µL de DTT (dithiothréitol), 25 µM de Random Hexamer, 25 U de transcriptase inverse et 1 µg d'ARN extrait.

Les tubes sont ensuite placés dans un appareil à PCR à 42°C pendant 45 minutes.

1.4.2- Amplification du milieu RT par PCR

Les ARNm de l'intégrine $\alpha 2$, contenus dans le milieu RT, sont amplifiés par PCR à l'aide des amorces suivantes:

Alpha 2 Sens : 5'- gac gtg ctc ttg gta ggt gca -3'

Alpha 2 Anti-sens : 5'- gac cag agt tga acc act tg -3'

L'ARN ribosomique 18S a été utilisé comme gène de ménage :

18S Sens : 5'- gtg gag cga ttt gtc tgg tt -3'

18S Anti-sens : 5'- cgc tga gcc agt cag tgt ag -3'

Pour 2,5 μ L de milieu RT, nous ajoutons (par tube) : 10,92 μ L d'eau distillée, 2,25 μ L de tampon 10X, 0,75 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 1 μ L d'un mélange des quatre dNTP, 1,25 μ L de DMSO, 1,125 μ L de W-1 (stabilisateur de la polymérase), 5 μ L d'amorce et 1 U de Taq polymérase.

Les tubes sont placés dans un appareil à PCR. La température d'hybridation des amorces utilisée en PCR est de 57°C, et le temps d'élongation de 30 secondes, 21 cycles. Le résultat de la PCR est visualisé et quantifié, après migration par électrophorèse en gel d'agarose 1,5 % contenant du BET des produits de PCR, à l'aide du logiciel analyseur d'image Bioprofil (Vilbert-lourmat). L'intensité des bandes obtenue pour l'intégrine $\alpha 2$ est rapportée à celle obtenue pour L'ARNr 18S dans chaque condition.

2- Méthodes de Biochimie

2.1- Chromatographie

2.1.1- Chromatographie échangeuse d'ion

2.1.1.1- Préparation de la résine DEAE-Sephadex A50

La résine DEAE-Sephadex A50 (Pharmacia Biotech) est une résine échangeuse d'anion. 1 g de résine est suspendu dans 40 mL d'un « tampon de fixation » (NaCl 0,15 M, Tris 0,05 M, pH 6,8). Le mélange est placé à 100°C pendant 2 heures pour permettre le gonflement de la résine. Le mélange est ensuite dégazé et stocké à 4°C. Avant son utilisation, la résine est reprise par du « tampon de fixation » avec un ratio résine / tampon de 75 % / 25 %.

2.1.1.2- Préparation des échantillons

Le milieu de culture de cellules MRC5 est concentré par deux fois et la quantité protéique est déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford 1976). Le milieu concentré sur Vivaspin (Sartorius stedim biotech) est ensuite dialysé contre du tampon de fixation à 4°C. Le milieu est dégazé avant son passage sur la colonne.

2.1.1.3- Chromatographie

La résine (4 mL) est déposée dans une colonne de 1 cm de diamètre. La colonne est reliée à une pompe péristaltique et à un collecteur de fraction. L'arrivée des différents tampons se fait donc en continu, et tous les tampons ont été dégazés. Le débit de la colonne est de 0,4 mL / min, et l'éluat est recueilli par fractions de 2 mL. La résine est d'abord lavée par 1 volume de colonne (10,5 mL) de « tampon de fixation », puis le milieu de culture concentré des cellules MRC5 est injecté, suivi par un lavage de 2 volumes de colonne du « tampon de fixation ». Les protéines retenues sur la résine sont éluées par un gradient en palier de NaCl (2 volumes de colonne par élution) : la première élution est réalisée à l'aide d'un tampon contenant 0,2 M de NaCl (Tris 0,05 M, pH 6,8), la deuxième avec un tampon contenant 0,5 M de NaCl et la troisième par un tampon contenant 1,15 M de NaCl.

L'absorbance des fractions collectées (70 fractions) est mesurée à 280 nm. Les fractions intéressantes sont mises en dialyse contre de l'eau, puis lyophilisées. Ces fractions ont été analysées par un Western immunoblotting.

2.1.2- Chromatographie d'immuno-affinité

2.1.2.1- Immobilisation des anticorps anti-lumicanne sur la résine Sépharose 4B activé au CnBr

Les anticorps utilisés sont des anticorps polyclonaux anti-lumicanne dirigé contre le peptide synthétique du lumicanne humain de 17 acides aminés. Pour l'immobilisation des anticorps sur la résine, 5 à 10 mg de protéines / mL de résine sont nécessaires. Les différents aliquots d'anticorps ont été dosés selon la méthode de Bradford et rassemblés de façon à obtenir une quantité d'anticorps de 50 mg.

Afin d'obtenir un volume final de résine de 10 mL, 2,85 g de résine Sépharose 4B activé au CnBr (Amersham Biosciences) ont été mélangés avec 50 mL de HCl 1mM pendant 2 heures à 4°C, permettant ainsi le gonflement de la résine. La résine est ensuite

abondamment lavée avec 300 mL de la même solution. La résine est par la suite mise en solution dans 20 mL d'un « tampon de couplage » (NaHCO_3 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3). La fraction d'anticorps, précédemment dialysée contre du « tampon de couplage », est ajoutée à la résine et l'ensemble est mis à incuber toute une nuit à 4°C sous agitation. La résine est ensuite lavée par 50 mL de « tampon de couplage ». Les groupes actifs n'ayant pas réagi sont bloqués par un tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8 pendant 2 heures à 4°C. La résine est alors lavée trois fois en alternance avec un tampon d'acétate de sodium (acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4) et un tampon Tris (Tris 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8). La résine est enfin lavée sur filtre Büchner avec un tampon Tris 0,5 M, pH 7,4 contenant du NEM (N-éthylmaléimide) 2 mM, de la benzamidine 1 mM, du PMSF 2 mM et de l'azide 0,1 %, dégazée et stockée à 4°C. Nous pouvons estimer à 90 %, le taux d'anticorps immobilisé sur la résine, un dosage protéique par la méthode de Bradford ayant été réalisé après chaque étape.

2.1.2.2- préparation des échantillons

Le milieu de culture des cellules MRC5 est concentré par six fois et les protéines totales sont dosées selon la méthode de Bradford. Le milieu concentré est ensuite dialysé contre un « tampon de fixation » (Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4), puis dégazé.

2.1.2.3- Chromatographie

La résine est incubée toute une nuit avec le milieu de culture concentré à 4°C. La résine (6 mL) est ensuite déposée dans une colonne de 1 cm de diamètre, reliée à une pompe péristaltique et à un collecteur de fraction. Le débit appliqué à la colonne est de 0,3 mL / min et l'éluat est recueilli par fractions de 1 mL. La résine est lavée par 2 volumes de colonne avec du « tampon de fixation ». Le lumiscane complexé à son anticorps est élué avec un tampon glycine 0,1 M, pH 3. Le pH est directement neutralisé par ajout de 25 μL d'un « tampon de neutralisation » (Tris 1 M, pH 9,5) dans chaque fraction collectée, afin d'obtenir un pH de 7,2. L'absorbance de chaque fraction (80 fractions) est mesurée à 280 nm. Les fractions d'intérêt sont mises en dialyse contre de l'eau, puis lyophilisées. Ces fractions ont été analysées par un Western immunoblotting.

2.1.3- Purification par chromatographie d'ion métal-affinité sur colonne Ni-NTA Superflow

2.1.3.1- Purification des protéines humaines recombinantes produites en système procaryote : lumicanne, L 1-6, L 1-9, Hlum (K265A) et Hlum (K267A)

2.1.3.1.1- Culture bactérienne

Les bactéries JM109(DE3) transformées par le plasmide d'expression pQE30-protéine recombinante, comportant L'ADNc d'une protéine recombinante (lumicanne, L 1-6, L 1-9, Hlum (K265A) ou Hlum (K267A)) couplé à une séquence 6xHis du côté N-terminal, sontensemencées dans 25 mL de milieu LB contenant 100 µg d'ampicilline / mL. La pré-culture est incubée à 37°C sous agitation pour la nuit. La pré-culture est ensuite diluée dans 100 mL de LB à 50 µg d'ampicilline / mL de manière à obtenir une culture dont l'absorbance à 600 nm est de 0,15. La culture est alors incubée à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une absorbance (600 nm) d'environ 0,6.

L'induction de la synthèse de protéines recombinantes est réalisée par ajout de 0,4 mM final d'IPTG. Après 4 heures d'induction, la suspension bactérienne 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 peut être soit conservée à -80°C soit soniquée directement.

2.1.3.1.2- Extraction des protéines recombinantes des corps d'inclusion

Les bactéries sont lysées par sonication sur glace (3 fois 15 sec avec 1 min d'arrêt entre chaque sonication, 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 de nouveau centrifugée, puis le culot est repris dans 2 mL de tampon d'extraction (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, 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.

2.1.3.1.3- Chromatographie

La résine Ni-NTA Superflow (Qiagen) est équilibrée par trois lavages à l'eau distillée, suivis de trois lavages par le tampon d'extraction.

Le surnageant précédemment obtenu est mélangé à 1 mL de résine équilibrée, et agité pendant une heure à température ambiante. Après dépôt dans une colonne (diamètre de 5

mm), ce mélange est lavé successivement par 4 mL de tampon (NaH_2PO_4 100 mM, Tris 10 mM, urée 8M) à pH 6,3 et 5,9. Les protéines recombinantes sont éluées par le même tampon à pH 4,5. L'éluat, contenant la protéine recombinante, est dialysé contre de l'eau distillée pendant 3 jours à 4°C (avec renouvellement de l'eau 3 fois par jour) pour éliminer l'urée. Les protéines recombinantes sont lyophilisées puis conservées à -20°C. Elles seront solubilisées dans une solution d'acide acétique 18 mM avant leur utilisation.

2.1.3.2- Purification du lumicanne produit par les cellules HEK-Hlum

Le milieu de culture des cellules HEK-Hlum est dialysé contre un « tampon phosphate » (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,3 M, pH 8) toute une nuit à 4°C. La résine Ni-NTA Superflow est équilibrée par trois lavages à l'eau distillée, suivis de trois lavages par le « tampon phosphate ». De l'imidazole, à une concentration de 10 mM, est ajouté au milieu de culture après dialyse, et le pH est ajusté à 8. La résine et le milieu sont alors mélangés et incubés pendant 45 min à température ambiante sous agitation. Le mélange est déposé dans une colonne de 5 mm de diamètre et la fraction contenant les protéines non fixées est récupérée. La résine est lavée par 2 x 2 mL de « tampon phosphate » (NaH_2PO_4 20 mM, NaCl 0,3 M, pH 8) contenant 20 mM d'imidazole. Le lumicanne est élué par 250 mM d'imidazole.

La fraction d'éluat, dans laquelle se trouve le lumicanne, est dialysée contre un « tampon salin » (NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4). La fraction dialysée est ensuite concentrée environ 15 fois sur Vivaspin et stockée à -20°C. Les fractions ont été analysées par un Western immunoblotting.

2.2- Electrophorèse SDS-PAGE et Western immunoblotting

2.2.1- Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)

La concentration de polyacrylamide dans le gel de séparation varie de 7,5 % à 15 % (m/v) selon les protéines à séparer. En revanche, la concentration dans le gel de compression est constante, soit 4 % (m/v) de polyacrylamide. Il y a présence de 0,1 % (m/v) de dodécyl sulfate de sodium (SDS) dans les deux gels, permettant ainsi la séparation des protéines uniquement selon leur masse moléculaire. Les échantillons sont additionnés soit de tampon échantillon 2X (Tris 0,5 M, SDS 4 % (m/v), glycérol 20 % (v/v), pH 6,8, bleu de bromophénol 0,002 % (m/v)) ou soit de tampon échantillon 5X (Tris 1,25 M, SDS 10 % (m/v), sucrose 20 % (m/v), pH 6,8, bleu de bromophénol 0,005 % (m/v)), selon le volume des

échantillons. Les échantillons sont réduits par ajout de 3 % de β -mercaptoéthanol et dénaturés par chauffage (5 minutes à 90°C). La migration s'effectue pendant environ 90 minutes, d'abord à 10 mA/gel pour la concentration des échantillons, puis à 20 mA/gel pour la séparation, dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,5 % (m/v), pH 8,6).

Après migration, le gel peut-être coloré pour révéler les protéines par du Bleu de Coomassie R-250 (Bleu de Coomassie R-250 0,0 % (m/v), acide acétique 10 % (v/v), isopropanol 25 % (v/v)) pendant 20 minutes sous agitation, puis décoloré dans de l'acide acétique 10 %. Lors d'un Western immunoblotting, le gel n'est pas coloré et les protéines sont électrotransférées et immuno-révélees.

2.2.2- Electrotransfert et immuno-révélation des protéines (Western immunoblotting)

Après migration, le gel est équilibré 30 secondes dans du tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 7,5 % (v/v), pH 8,3). En parallèle, une membrane de nitrocellulose est activée 15 secondes dans du méthanol, puis équilibrée 5 minutes dans le tampon de transfert. Les protéines du gel sont alors transférées sur la membrane de nitrocellulose pendant 45 minutes sous une tension de 100 volts (intensité 10 mA/gel). La membrane est ensuite saturée pendant 2 heures sous agitation dans un tampon TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4, Tween-20 0,05 %) contenant soit 5 % (m/v) de BSA ou 5 % (m/v) de BLOTTO (lait déshydraté non gras) selon l'anticorps primaire utilisé. La membrane est lavée par du TBS-T, puis incubée pendant 16 heures à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué du TBS-T à 1 % (m/v) de BSA ou BLOTTO. Après trois lavages de 10 minutes au TBS-T, la membrane est incubée pendant 45 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué au 1/10000^{ème} dans du TBS-T à 1 % de BSA ou BLOTTO. La membrane est de nouveau lavée 3 x 10 minutes avec du TBS-T, puis 5 minutes avec du TBS (Tris 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4).

La révélation se fait par chimioluminescence, réalisée grâce au kit de détection Amersham™ ECL ou ECL Plus (GE Healthcare), celui-ci étant plus sensible. La membrane est alors exposée sur un film photographique. La membrane peut être ensuite colorée au Bleu de Coomassie R-250, puis décolorée dans une solution de 50 % méthanol et 7 % acide acétique.

2.2.3- Anticorps primaires

Anti-kératane sulfate: utilisé au 1/1000^{ème}

Anti-lumicanne : utilisé au 1/200^{ème}

Anti-p FAK (Tyr 397)-R : utilisé au 1/200^{ème}

Anti-FAK : utilisé au 1/1000^{ème}

L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le peptide synthétique du lumicanne humain, utilisé dans ces travaux, ne reconnaît pas le fragment du lumicanne L 1-6. Ainsi, du sérum immunoréactif dirigé contre le lumicanne humain a été préparé après trois injections intradermiques de la protéine cœur du lumicanne humain, toutes les trois semaines chez le lapin. La première injection contenait de l'adjuvant de Freund complet et les injections de stimulation, de l'adjuvant de Freund incomplet. Le sérum a été purifié sur une colonne DEAE-Affigel Blue gel (Bio-rad laboratories). La spécificité du sérum purifié a été testée et comparée au précédent anticorps anti-lumicanne par Western immunoblotting. Ce nouvel anticorps a été utilisé à une dilution au 1/500^{ème}.

2.3- Digestion du lumicanne par l'enzyme N-glycosidase F

Les protéines présentes dans le milieu de culture des cellules HEK-Hlum et MRC5 sont dosées puis précipitées par l'ajout de 3 volumes d'éthanol 100 % et 1/100^{ème} de volume d'acide acétique 10 %. Le précipité est repris par un tampon Tris 100 mM, SDS 1%, pH 7,4 afin d'obtenir une concentration finale pour chaque échantillon de 500 ng/ μ L en protéine. L'ensemble est chauffé à 100°C, puis dilué au 1/10 par l'ajout d'un tampon Tris 100 mM, nonidet P40 0,6%, pH 7,4. Trois unités de l'enzyme N-glycosidase F (Roche) sont ajoutées aux échantillons, qui sont incubés pendant 16 heures à 37°C. Après digestion, les échantillons sont analysés par la technique de Western immunoblotting.

2.4- Analyse de la phosphorylation sur résidu tyrosine

Les cellules HT144 (5×10^5 cellules/puits) sontensemencées sur une plaque 6 puits. Le lendemain, l'effecteur est ajouté aux cellules, dans un milieu sans sérum. La stimulation cellulaire est stoppée sur glace par ajout dans le milieu de culture d'un tampon PBS pH 7,4 additionné d'orthovanadate (Na_3VO_4) 50 mM. Le milieu est ensuite aspiré et les cellules sont lavées par deux fois avec le même tampon PBS. Dans chaque puits, 400 μ L de tampon de lyse (PBS, pH 7,4, Triton X-100 0,5 %, β -glycerophosphate 80 mM, EGTA 50 mM, MgCl_2 15 mM, Na_3VO_4 1mM, cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche)) sont ajoutés et la couche

cellulaire est grattée. Les cellules sont alors soniquées, trois fois dix secondes, puis laissées sur glace pendant 20 minutes. Après centrifugation (20 000 g, 30 min à 4°C), le surnageant est prélevé et les protéines sont dosées par l'acide bicinchonique. L'analyse des phosphorylations sur tyrosine est effectuée par Western immunoblotting (paragraphe 2.2) avec un anticorps primaire anti-p FAK (Tyr 397). La phosphorylation sur tyrosine a été quantifiée à l'aide du logiciel analyseur d'image Bioprofil (Vilbert-lourmat). L'intensité des bandes obtenue pour pFAK 397 est rapportée à celle obtenue pour FAK dans chaque condition.

2.5- Test de fixation du lumicanne au domaine $\alpha 2\text{I}$ en phase solide

2.5.1- Interaction lumicanne – $\alpha 2\beta 1$

Ce test a été réalisé comme précédemment décrit (Eble et coll. 2001). Une plaque de microtitration a été recouverte par 10 $\mu\text{g/mL}$ de lumicanne recombinant ou de BSA dilués dans du TBS/MgCl₂ ou de collagène de type I dilué dans 0,1 M d'acide acétique, et incubée 16 heures à 4°C. Les sites non spécifiques ont été bloqués par de la BSA/TBS/MgCl₂. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ soluble, à une concentration de 15 $\mu\text{g/mL}$ diluée dans de la BSA/TBS/MgCl₂, est mise au contact des différents substrats pendant 2 heures à température ambiante, en présence de 1 mM de Mn²⁺ ou de 10 mM d'EDTA. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ non fixée est éliminée par lavage des puits avec un tampon HEPES (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ayant interagit avec les substrats est fixée par 2,5 % de glutaraldéhyde/HEPES. Après lavage de la plaque, la quantité d'intégrine $\alpha 2\beta 1$ fixée est mesurée par un test ELISA avec un anticorps anti-intégrine $\beta 1$ (dilution 1/300) comme anticorps primaire et un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (dilution 1/600). Des tablettes de *p*-nitrophénylphosphate (Sigma) sont utilisées comme substrat de la phosphatase alcaline pour la détection du signal. La réaction de couleur jaune est mesurée à 405 nm par un lecteur de plaque ELISA.

2.5.2- Interaction lumicanne - $\alpha 2\text{I}$

Ce test en phase solide a été réalisé comme précédemment décrit (Käpylä et coll. 2004). Le lumicanne recombinant (16,4 $\mu\text{g/mL}$), dilué dans de la PBS, a été *coaté* à l'intérieur des puits d'une plaque de microtitration et incubé pendant 16 heures. Les sites non spécifiques des puits sont bloqués avec du Delfia® Diluent II (PerkinElmer) contenant de la BSA. Ce tampon a également été utilisé pour mesurer la fixation non spécifique. Le domaine

d'intégrine $\alpha 2I$ couplé à une protéine GST, dilué dans le tampon Delfia® assay (Perkin Elmer), est ajouté à différentes concentrations dans les puits pour une heure, en présence de 2 mM de $MgCl_2$. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec le tampon Delfia® assay et la détection du signal est réalisé avec un anticorps anti-GST marqué Delfia® Europium et une solution Delfia® enhancement (Perkin Elmer). Le signal est mesuré en utilisant un spectrophotomètre à fluorescence à résolution temporelle (Victor3 multilabel counter, PerkinElmer). L'estimation de la constante de dissociation a été obtenu en utilisant l'équation d'hyperbole : mesure de fixation = fixation maximum / (1 + $K_d/[I]$), où K_d est la constante de dissociation apparente.

3- Méthodes de Biologie Cellulaire

3.1- Culture cellulaire

- Les cellules A375 sont cultivées dans du DMEM à 4,5 g/L de glucose (Gibco) supplémenté par 10 % (v/v) de SVF.
- Les cellules HT144 sont cultivées dans du milieu Mc Coy's 5A (Gibco) + 10 % de SVF.
- Les cellules B16F1 sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco) contenant 10 % de SVF.
- Les fibroblastes dermiques sont cultivés dans du DMEM à 1 g/L de glucose (Gibco) + 10 % de sérum.
- Les cellules CHO-WT et CHO-A2 sont cultivées dans un milieu α MEM supplémenté en désoxyribonucléosides et ribonucléosides (Gibco) et 10 % de SVF.
- Les cellules HUVEC sont cultivées dans un milieu EBCM2 contenant 2 % de SVF, 0,5 ng/mL de VEGF, 5ng/mL d'EGF, 10ng/mL de bFGF, 20ng/mL d'IGF, 22,5 μ g/mL d'héparine, 1 μ g/mL d'acide ascorbique et 0,2 μ g/mL d'hydrocortisone (Promocell).
- Les cellules CSM sont cultivées dans un milieu α MEM (Lonza) + 10 % de sérum.

Les cellules sont conservées congelées dans l'azote liquide. Pour la congélation, les milieux de culture contiennent 20 % de SVF et 10 % (v/v) de DMSO, excepté pour les cellules endothéliales qui sont congelés dans un milieu Cryo-SFM (Promocell), sans sérum.

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 25 ou 75 cm² à 37°C sous atmosphère humide et contenant 5 % de CO₂. Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont détachées par 0,25 % (v/v) de trypsine-EDTA (Gibco), excepté pour les cellules endothéliales et CSM qui sont détachées par une solution de trypsine/EDTA à 0,04 %/0,03 % (Promocell). Chaque trypsinisation correspond à un passage. Lors des expérimentations, les cellules normales (fibroblastes dermiques et HUVEC) sont utilisées entre les passages 1 et 5.

Les cellules MRC5 sont cultivées dans du milieu DMEM (4,5 g de glucose) supplémenté par 10 % de SVF. Les cellules sontensemencées dans une boîte de culture de 175 cm² de surface. A confluence, les cellules sont privées de sérum pendant 72 h. Le milieu de culture est ensuite collecté et centrifugé (400 g, 3 min à température ambiante), puis stocké à -80°C.

Les cellules HEK-293 EBNA (Epstein-Barr virus nuclear antigen) sont cultivées dans du milieu DMEM / F12 (Gibco) en présence de 10 % de sérum. Les cellules HEK-Hlum, contenant le plasmide pCEP4-Hlum, sont amplifiées jusqu'à obtenir 6 boîtes de culture, de 175 cm² de surface, confluentes. Les cellules sont alors privées de sérum sur 12 jours, le milieu de culture étant récolté et changé tous les trois jours. Le milieu récolté est centrifugé (400 g, 3 min à 4°C) puis stocké à -80°C.

3.1.1- Transfection cellulaire

3.1.1.1- Transfection des cellules HEK-293 EBNA

Les cellules sont transfectées par le plasmide pCEP4-Hlum lorsqu'elles atteignent 90 % de confluence. La lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) a été utilisée comme agent lipotransfectant. Le plasmide est mélangé à la lipofectamine dans un ratio 1 / 2,5 (µg / µL) et incubé 20 min à température ambiante avant la mise en présence avec les cellules. Lors de la transfection, les cellules sont privées de sérum. 24 heures après la transfection, de l'hygromycine B (InvivoGen) à une concentration de 200 µg / mL est ajouté dans le milieu de culture dans le but de sélectionner les cellules transfectées par le plasmide (HEK-Hlum) de celles qui ne le sont pas.

3.1.1.2- Transfection des siRNA

Les cellules A375 sontensemencées dans une plaque 24 puits de manière à obtenir une confluence de 30-50 % en 24 heures. Les siRNA ont été transfectées à l'aide de la

lipofectamine™ 2000. Le mélange de siRNA (20 pmol/puits), combiné à la lipofectamine™ 2000 (1 µL/puits), est dilué dans le milieu de culture dépourvu de sérum et d'antibiotique. Le mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante afin de permettre la formation des complexes oligomères-lipofectamine. Le mélange est ensuite placé dans chaque puits de la plaque contenant les cellules. L'efficacité de l'inactivation de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ a été mesurée par RT-PCR (paragraphe 1.4), pour les ARN, à 24, 48 et 72 heures après transfection. L'expression de la protéine a été observée par microscopie confocale (paragraphe 3.4) et par cytométrie en flux (paragraphe 3.5), 72 heures après transfection. Lors des tests de migration, les cellules sont utilisées 72 heures après transfection. Les cellules non transfectées avec les siRNA servent de contrôle.

3.1.2- Mesure de viabilité cellulaire

La toxicité du peptide 9 a été mesurée par le test MTT. Le MTT (3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltetrazolium bromide) est réduit par les succinates déshydrogénases mitochondriales en cristaux pourpres de MTT-formazan, solubles dans le DMSO.

Les cellules ($1,5 \times 10^4$ cellules/puits) sontensemencées sur une plaque 96 puits et incubées 24 heures à 37°C. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans sérum, contenant l'effecteur à tester (peptide 9 et 9 SCR, 100 µM). Du milieu sans effecteurs est utilisé comme contrôle. La plaque est de nouveau incubée 24 heures à 37°C. Le milieu de culture est ensuite remplacé par un milieu additionné par $1/10^{\text{ème}}$ d'une solution de MTT à 2,5 mg/mL. Les cellules sont alors placées à 37°C pendant trois heures. Le milieu est alors remplacé par du DMSO et l'absorbance est lue à 560 nm.

3.2- Adhésion cellulaire

3.2.1- Préparation des plaques 96 puits

Des plaques 96 puits, non traitées pour la culture cellulaire, sont recouvertes soit par 10 µg de lumican, soit par une quantité équimolaire de BSA (contrôle), soit par 10 µg de collagène de type I ou soit par 10 µg de fibromoduline, dissous dans l'acide acétique 18 mM. Le revêtement protéique est réalisé par dépôt au centre de chaque puits d'une goutte de 10 µL contenant la quantité de protéine sus-décrite. Après séchage du revêtement protéique, les sites de fixation non spécifique sont bloqués par 1 % de BSA diluée dans la PBS pendant 30 minutes à température ambiante.

3.2.2- Test d'adhésion cellulaire

Les cellules sont détachées par 5 mM d'EDTA/PBS, afin de ne pas dégrader les récepteurs cellulaires, et resuspendues dans le milieu d'adhésion (milieu de culture, 1 % BSA). Les cellules (5×10^4 cellules/puits) sont alorsensemencées dans une plaque 96 puits préalablement recouverte d'un revêtement protéique. La plaque est incubée 2 heures à 37°C, permettant l'adhésion des cellules. Les cellules sont ensuite lavées par 3 fois sous agitation avec de la PBS avant d'être fixées dans 1,1 % (v/v) de glutaraldéhyde/PBS pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées par 3 fois avec de l'eau distillée, puis colorées au violet cristal (HEPES 0,2 M, pH 6, violet cristal 0,1 % (m/v)) pendant 30 minutes. Les cellules sont de nouveau lavées à l'eau distillée jusqu'à élimination de l'excès de colorant, puis la plaque est séchée. Le colorant est élué par 10 % (v/v) d'acide acétique et l'absorbance est mesurée à 560 nm.

3.2.3- Test de compétition pour l'adhésion cellulaire

Pour le test de compétition pour l'adhésion, Les cellules ont été préincubées pendant 1 heure à 37°C dans le milieu d'adhésion contenant soit le peptide 9 (100 μ M) ou Hlum 57 (10 μ g). Les cellules sont ensuiteensemencées sur une plaque 96 puits, recouverte par du lumicanne, du collagène de type I ou de la BSA (contrôle), et incubées pendant 2 heures à 37°C.

3.3- Migration cellulaire

3.3.1- Migration en chambre de Boyden (Transwell®)

La migration cellulaire stimulée par un gradient de sérum a été réalisé dans des chambres de Transwell® (Greiner Bio-one). Les chambres de Transwell® sont introduites dans les puits d'une plaque 24 puits. La face supérieure des membranes de Transwell® a été recouverte soit par 10 μ g de lumicanne (normale ou muté), soit par une quantité équimolaire de BSA (contrôle) ou soit par 10 μ g de collagène de type I, dissous dans l'acide acétique 18 mM. Les membranes sont ensuite réhydratées par 100 μ L de milieu de culture.

Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell®), en suspension dans 100 μ L de milieu supplémenté avec 0,2 % de BSA, sont placées dans la partie supérieure des chambres de Transwell®. Six cent cinquante microlitres de milieu contenant 10 % de sérum et 2 % de BSA sont placés dans la partie inférieure des chambres.

Pour tester l'effet des différents peptides synthétiques, les cellules ont été préincubées pendant deux heures avec les peptides 5, 7, 8, 9, 9 SCR, 11, L9F, L9M, L9R, FmodLRR9 ou F9M (100 μ M) avant d'êtreensemencées dans la partie supérieure des chambres de Transwell® non recouverte de protéine.

Après 24 heures d'incubation, les cellules de la face supérieure (cellules qui n'ont pas migré) et celles de la face inférieures (cellules qui ont migré) sont lavées deux fois par de la PBS, puis fixées dans du méthanol pendant 30 minutes. Elles sont ensuite lavées avec de l'eau distillée, puis colorées au violet cristal pendant 30 minutes. Les cellules sont de nouveau lavées à l'eau distillée jusqu'à élimination de l'excès de colorant, puis les chambres sont séchées. La face supérieure de la membrane est ensuite nettoyée à l'aide d'une tige cotonnée de façon à éliminer les cellules qui n'ont pas migré. Les cellules qui ont migré sont photographiées *via* un microscope optique (Axiovert25, Zeiss) équipé d'un appareil photo numérique. Cinq champs par membrane sont photographiés au grossissement x 81. Les cellules sont ensuite comptées dans chacun des champs à l'aide de l'extension *Cell Counter* du logiciel ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2008).

3.3.2- Migration en vidéomicroscopie

La migration cellulaire aléatoire et la migration en modèle de blessure/cicatrisation ont été visualisées en vidéomicroscopie, à l'aide d'un microscope inversé (Axiovert 200M, Zeiss) équipé d'une petite chambre de culture transparente (Climabox, Zeiss) permettant une température constante de 37°C et 5 % de CO₂ dans l'air. Le microscope est dirigé par le logiciel Metamorph (Roper Scientific) et les images sont enregistrées *via* une caméra CCD (CoolsnapHQ, Roper Scientific). La migration cellulaire est quantifiée par un logiciel de suivi de la migration (Zahm et coll., 1997).

3.3.2.1- Migration cellulaire aléatoire

Les cellules (5×10^3 cellules/puits) sontensemencées sur une plaque 12 puits, recouverte ou non avec 120 μ g/puits de lumicanne. La plaque est placée dans la chambre de culture, reliée au vidéomicroscope, 24 heures après l'ensemencement. La migration cellulaire est observée sur 24 heures, une photographie étant prise toutes les 30 minutes avec la caméra CCD, et traitée comme décrit ci-dessus.

3.3.2.2- Migration cellulaire en modèle de blessure/cicatrisation

Des inserts de culture en silicone (Ibidi) sont insérés dans les puits d'une plaque 12 puits. Ces inserts comportent deux chambres séparées d'une cloison de 400 μM de largeur. Les cellules (2×10^4 - 5×10^4 cellules/chambre) sontensemencées dans chacune des deux chambres composant les inserts et incubées pendant 24 heures à 37°C afin de permettre l'adhésion des cellules sur la plaque. Les inserts sont alors retirés de la plaque, laissant dans chaque puits, deux monocouches cellulaires distantes de 400 μm . Le milieu contenant les effecteurs à tester est ajouté afin de recouvrir les cellules. La migration cellulaire, c'est à dire la capacité des cellules à combler l'espace de 400 μm qui les sépare, est observée sur 24 ou 48 heures, une photographie étant prise toutes les 30 minutes avec la caméra CCD.

3.4- Microscopie laser confocale

Les cellules (10^4 cellules/puits) sontensemencées sur des lamelles en verre stériles (\emptyset 12 mm), déposées dans les puits d'une plaque 24 puits. Les cellules sont transfectées avec les siRNA comme décrit dans le paragraphe 17.1. Soixante-douze heures après transfection, les cellules sont lavées 2 fois par de la PBS, puis fixées dans une solution à 4 % de paraformaldéhyde/PBS, pH 7,2, pendant 10 minutes. 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 d'une solution de 3 % BSA/PBS contenant les anticorps anti-intégrines ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ ou $\beta 1$), dilués au 1/100^{ème}. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois 5 minutes au PBS et incubées avec un anticorps secondaires anti-IgG de souris Alexa Fluor[®] 488, dilué au 1/200^{ème}. 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 μL de cytofluor (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 *via* un microscope à balayage laser confocal Olympus FV500.

3.5- Cytométrie en flux

Les cellules sont détachées avec 5 mM d'EDTA pour ne pas endommager les récepteurs cellulaires, 72 heures après transfection. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 g, 5 minutes à température ambiante. Le culot cellulaire est ensuite repris dans de la PBS

afin d'obtenir une concentration cellulaire de 10^6 cellules/mL. Un volume correspondant à 10^5 cellules a été utilisé. L'anticorps primaire anti-intégrine $\alpha 2$ ou $\beta 1$, dilué au $1/10^{\text{ème}}$, est ajouté à ce volume et le tout est incubé pendant 16 heures à 4°C . Le mélange cellules-anticorps est centrifugé, et le culot cellulaire lavé par deux fois avec de la PBS. Le nouveau culot cellulaire qui en résulte est repris par 100 μL de PBS contenant l'anticorps secondaire couplé à un Alexa Fluor[®] 488, dilué au $1/10^{\text{ème}}$, et incubé 1 heure à 4°C et à l'obscurité. Le mélange cellules-anticorps est centrifugé, le culot cellulaire lavé deux fois avec de la PBS, et resuspendu dans 200 μL de PBS. L'omission de l'anticorps primaire ou l'utilisation d'IgG non immune ont servi de contrôles négatifs. L'analyse de chaque échantillon a été effectuée avec un cytomètre FACS Calibur (BD Biosciences).

4- Méthodes de bioinformatique et d'analyse statistique

4.1- Structure du lumicanne par homologie

La structure tri-dimensionnelle du lumicanne a été obtenue à partir de la structure cristallographique de la décorine (PDB # 1xku) et du biglycane (PDB # 2ft3) en utilisant le logiciel Swiss-Pdb Viewer (Guex et Peitsch 1997, <http://www.expasy.org/spdbv/>).

4.2- Analyse statistique des résultats obtenus

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata 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, en comparant les différents groupes au groupe control. Les niveaux de probabilité sont schématisés de la manière suivante : NS, non significatif ; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Résultats

CHAPITRE I: EXPRESSION DE DIFFERENTES FORMES DU LUMICANNE HUMAIN – ETUDE FONCTIONNELLE DE LA PROTEINE COEUR ET DE LA FORME GLYCOSYLEE.

Le lumicanne est exprimé dans le tissu dermique comme glycoprotéine, pouvant arborer ou non des chaînes de kératane peu sulfatées (polylactosamines). Les kératane sulfate du lumicanne sont synthétisés sur des résidus asparagines, comme les substitutions oligosaccharidiques des glycoprotéines. Les études *in vitro* menées précédemment au laboratoire, ont été réalisées avec la protéine cœur du lumicanne, dépourvue de glycosylation. Ainsi, pour d'une part nous approcher des conditions physiologiques et d'autre part pour tester une potentielle interférence de la glycosylation avec les propriétés de la protéine cœur, nous avons recherché à exprimer le lumicanne sous une forme glycosylée.

1- Expression du lumicanne par les cellules humaines MRC5 et HEK-Hlum

Le lumicanne exprimé par les cellules de mammifères peut être soit endogène ou soit recombinant, c'est-à-dire exprimé à partir d'un gène transfecté dans une cellule. Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à ces deux systèmes et nous avons cherché à déterminer lequel donnait un meilleur rendement.

Les cellules HEK-293 EBNA (dérivées de cellules humaines embryonnaires de rein) sont largement utilisées pour l'expression de protéines recombinantes natives. Ces cellules sont transfectées de façon stable avec le gène codant la protéine EBNA-1, ce qui permet une répllication plus importante des plasmides comportant un OriP, et ainsi une plus grande expression de protéine recombinante. Nous avons transfecté les cellules HEK-293 EBNA avec le plasmide pCEP4-Hlum, comportant l'ADNc du lumicanne humain. Nous avons appelé HEK-Hlum, les cellules ainsi transfectées. Le profil d'expression du lumicanne sécrété par ces cellules a été effectué par Western immunoblotting en utilisant un anticorps polyclonal anti-lumicanne. La masse moléculaire relative (Mr) apparente observée pour cette forme glycosylée du lumicanne (Hlum 57) est approximativement de 57 000 (figure 33A, colonne 2), alors que la Mr de la protéine cœur synthétisée en système procaryote (Hlum 37) est de 37 000 (figure 33A, colonne 1).

Les cellules MRC5 (fibroblastes embryonnaires humains de poumon) ont été choisies pour leur production importante de lumicanne naturel. Le lumicanne sécrété par ces cellules (Hlum 87) présente une Mr approximative de 87 000 (figure 33A, colonne 4).

Le lumicanne produit par les cellules HEK-Hlum et les cellules MRC5 a été soumis à l'action de la N-glycosydase F, enzyme qui clive les chaînes glycosylées en position N. Une bande d'une Mr de 37 000, correspondant à la taille de la protéine cœur, a été obtenue pour chacune des digestions (figure 33A, colonne 3 et 5, respectivement).

La présence ou non de chaînes de kératane sulfate a été mise en évidence par Western immunoblotting à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-kératane sulfate. Aucune forme de kératane sulfate n'a été détectée dans le milieu de culture des cellules HEK-Hlum (figure 33B, colonne 2). En revanche, à partir du milieu de culture des cellules MRC5, une bande d'une Mr de 87 000 de la même taille que le lumicanne secrété par ces cellules a été décelée (figure 33B, colonne 3).

La glycosylation du lumicanne diffère selon qu'il s'agisse d'une production naturelle ou recombinante. Ainsi, le lumicanne produit par les cellules MRC5 porte des chaînes de kératane sulfate, alors que le lumicanne exprimé par les cellules HEK-Hlum porte des chaînes oligosaccharidiques non sulfatées. Il est probable que les cellules HEK-293 n'expriment pas les transférases nécessaires à la synthèse de polylectosamines.

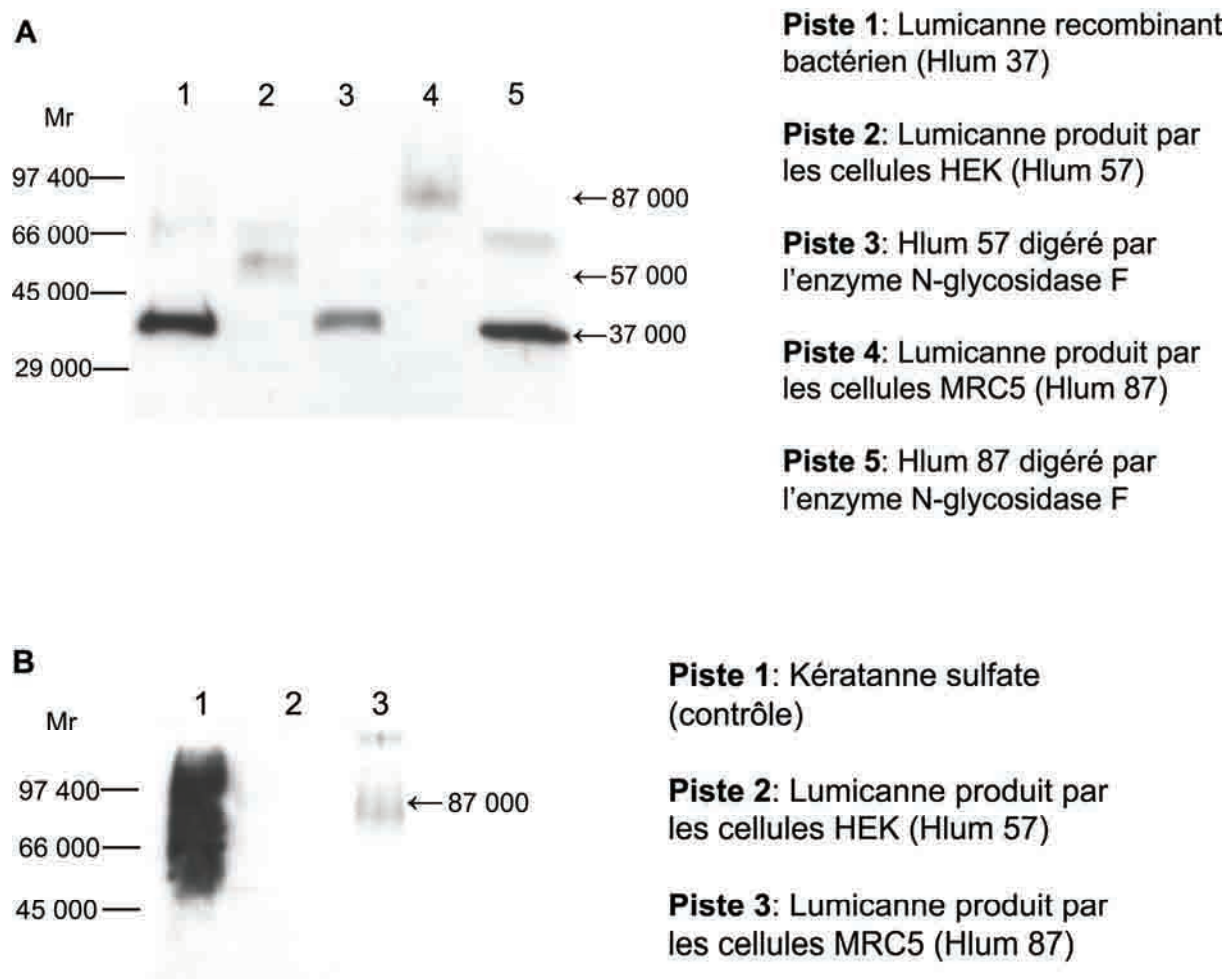


Figure 33 : (A) Analyse par Western immunoblotting de la digestion par l'enzyme N-glycosidase F, du lumicanne produit par les cellules HEK et MRC5. Le milieu de culture des cellules HEK et MRC5 est prélevé et concentré, puis digéré par l'enzyme N-glycosidase F. Les échantillons sont ensuite soumis à une électrophorèse SDS-PAGE, transférés sur une membrane de nitrocellulose, puis révélés avec un anticorps anti-lumicanne. (B) Analyse par western immunoblotting des chaînes de kératanne sulfate. Les mêmes échantillons utilisés en (A) sont révélés avec un anticorps anti-kératanne sulfate.

2- Purification du lumicanne exprimé par les cellules MRC5

2.1- Purification par chromatographie échangeuse d'ion

Le lumicanne d'une Mr de 87 000 produit par les cellules MRC5 possède des chaînes de kératane sulfate, chargées négativement. Ce lumicanne peut ainsi être purifié sur une colonne échangeuse d'anion. Le milieu de culture des cellules MRC5, après avoir été concentré deux fois (500 µg de protéines totales), est passé sur une colonne DEAE sépharose. Les protéines sont éluées par un gradient de NaCl (0,2 M à 1,15 M). Le profil d'éluion a été obtenu par mesure de l'absorbance à 280 nm de chaque fraction (figure 34A). Le premier pic correspond aux molécules non retenues sur la colonne, le deuxième et troisième pic étant les molécules éluées par 0,2 et 0,5 M de NaCl respectivement. Les fractions correspondantes à chacun des trois pics ont été regroupées en trois fractions et analysées par Western immunoblotting à la recherche de la présence de lumicanne (figure 34B). Le lumicanne est révélé uniquement dans la troisième fraction.

La chromatographie échangeuse d'ion a permis d'obtenir un enrichissement en lumicanne secrété par les cellules MRC5.

2.2- Purification par chromatographie d'immunoaffinité

Des anticorps anti-lumicanne ont été immobilisés sur une résine Sépharose 4B activé au CnBr. Le milieu de culture de cellules MRC5, concentré six fois (1,3 mg de protéines totales), est incubé 16 heures à 4°C avec cette résine. Après un lavage de la colonne, les protéines retenues sur la colonne sont éluées avec un « tampon glycine » 0,1 M à pH 3. L'éluat a été immédiatement neutralisé par addition Tris 1 M à pH 9,5. Le profil d'éluion de la chromatographie a été obtenu par lecture de l'absorbance à 280 nm des différentes fractions recueillies (figure 35A). Le premier pic correspond aux fractions non retenues et le deuxième aux fractions éluées par le tampon glycine. Les fractions correspondantes à chacun des deux pics ont été regroupées en deux fractions et analysées par Western immunoblotting pour détecter la présence de lumicanne (figure 35B). Le lumicanne d'une Mr de 87 000 est uniquement révélé dans la fraction éluee par le tampon glycine, ce qui indique que ce lumicanne a bien été purifié sur la colonne d'affinité. Cependant, une bande d'une Mr approximative de 57 000, non présente dans la fraction brute, a également été révélée dans cette même fraction. Il semble donc y avoir soit une dégradation partielle des chaînes de kératane sulfate du lumicanne, ou soit un enrichissement de la forme Mr 57 000 dans cette fraction.

2.3- Rendement de production

La quantité de lumicanne purifié sur la colonne d'immunoaffinité a été mesurée selon la méthode de Bradford. Nous avons obtenu 20 µg de lumicanne pour 35 mL de milieu de culture de cellules MRC5 soit 571 µg/L, ce qui représente 1,5 % des protéines totales contenues dans ce milieu. Le rendement de production de Hlum 87 est de ≈11 fg/h/cellule.

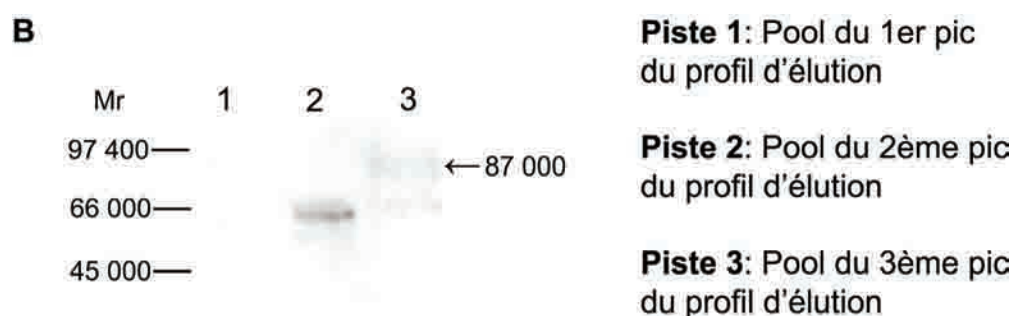
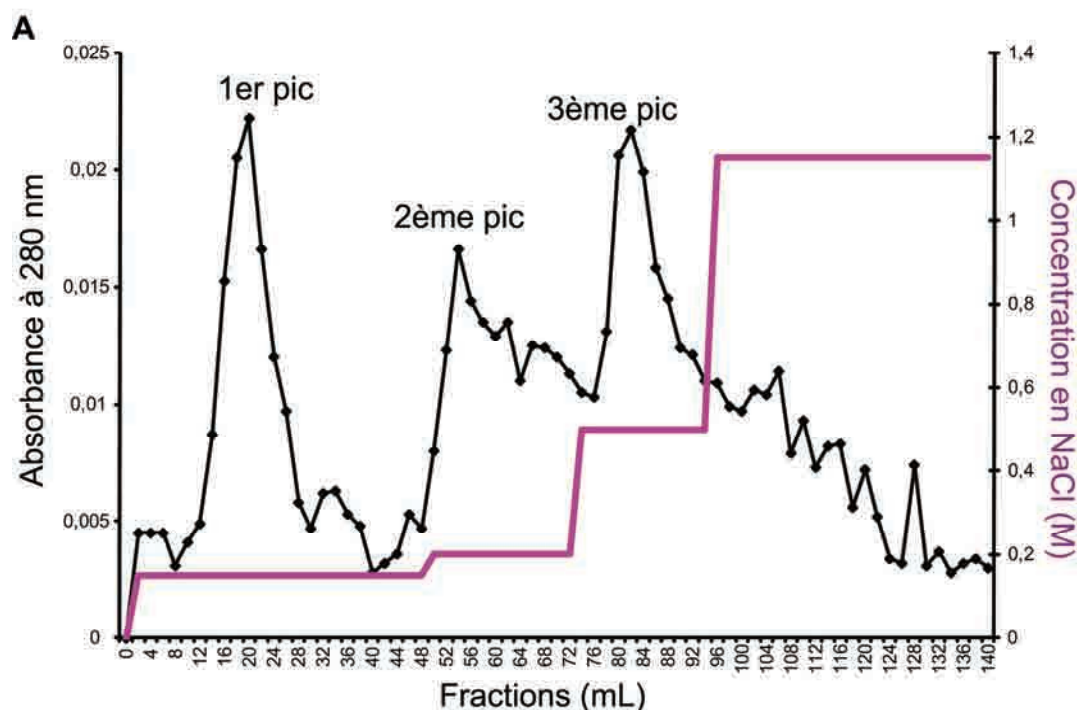
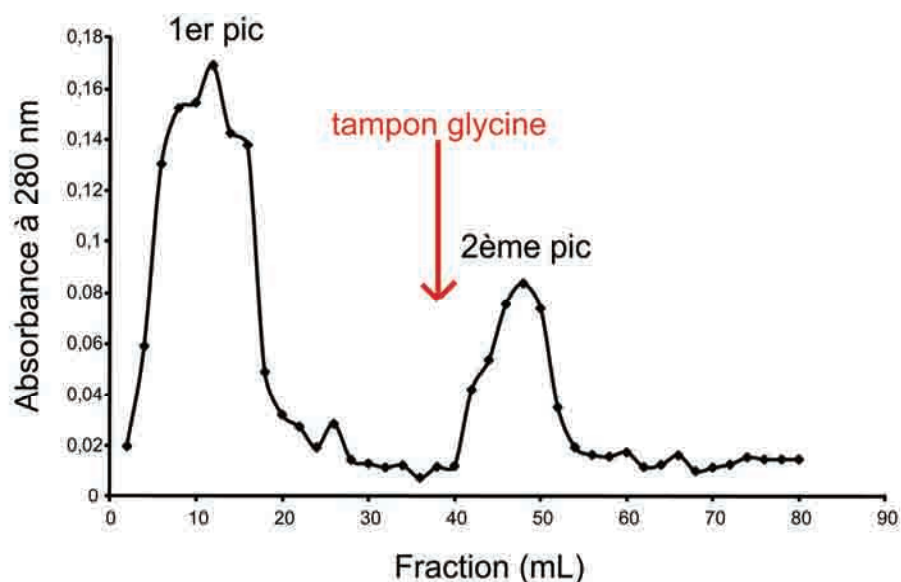


Figure 34 : (A) Profil d'élution de la purification du lumicanne en chromatographie échangeuse d'ion. Le milieu de culture concentré des cellules MRC5 est passé sur une colonne DEAE sépharose (h=5cm, Ø=1cm). Le lumicanne est élué par un gradient en palier de NaCl, et l'absorbance des fractions est lue à 280 nm. L'absorbance à 280 nm est indiquée à la gauche du graphique, et la concentration en NaCl sur la droite. (B) Analyse des fractions d'élution par Western immunoblotting. Les fractions éluées sont révélées avec un anticorps anti-lumicanne.

A



B



Piste 1: Milieu de culture concentré des cellules MRC5 avant passage sur colonne

Piste 2: Pool du 1er pic du profil d'élution

Piste 3: Pool du 2ème pic du profil d'élution

Figure 35 : (A) Profil d'élution de la purification du lumicanne en chromatographie d'immunoafinité. Le milieu de culture concentré des cellules MRC5 est passé sur une colonne sépharose 4B couplé à des anticorps anti-lumicanne (h=7,5 cm, Ø=1 cm). Après un lavage de la colonne, le lumicanne est élué par un tampon glycine 0,1 M, pH3, et l'absorbance des fractions est lue à 280 nm. (B) Analyse des fractions d'élution par Western immunoblotting. Les fractions éluées sont révélées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-lumicanne.

3- Purification du lumicanne glycosylé recombinant exprimé par les cellules HEK-Hlum

3.1- Purification par chromatographie d'ion métal-affinité

Le lumicanne produit par les cellules HEK-Hlum possède un peptide signal, ce qui lui permet d'être sécrété dans le milieu de culture, et un tag six histidines (6xHis), greffés à l'extrémité N-terminale de la protéine, à la suite du peptide signal (figure 31). Ce lumicanne a été purifié par chromatographie de métal-affinité sur résine de Ni-NTA Superflow. Cette résine composée d'acide nitrilotriacétique (NTA) chélate les ions nickel Ni^{2+} , lesquels vont interagir avec le tag 6xHis. Le lumicanne retenu sur la colonne est élué par 250 mM d'imidazole. Les différents éluats recueillis sont analysés par Western immunoblotting (figure 36). Le lumicanne est uniquement présent dans la fraction éluee par 250 mM d'imidazole.

3.2- Rendement de production

Comme précédemment, la quantité de lumicanne purifié a été mesurée selon la méthode de Bradford. Nous avons obtenu 100 μ g de lumicanne à partir de 40 mL de milieu de culture soit 2,5 mg/L. Le lumicanne produit par les cellules HEK-Hlum représente environ 5% des protéines totales du milieu de culture de ces cellules. Le rendement de production de Hlum 57 est de \approx 55 fg/h/cellule.

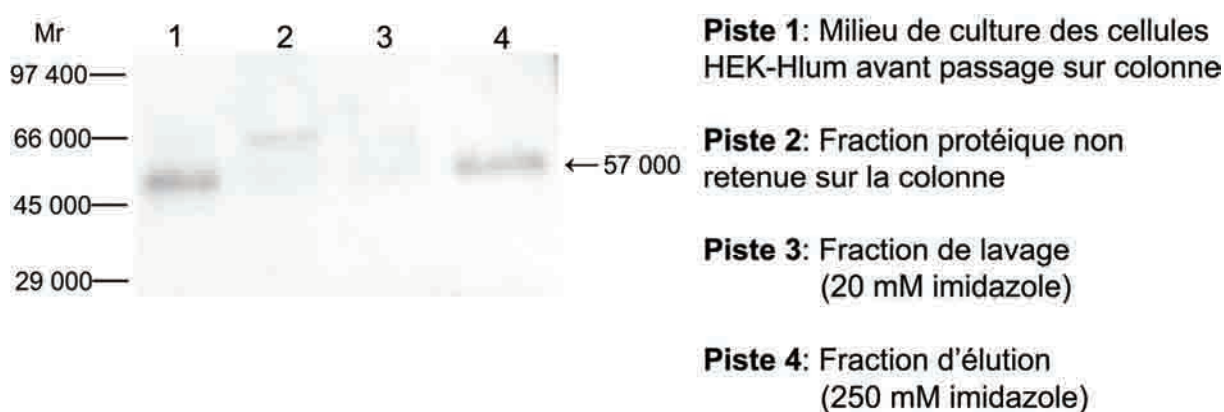


Figure 36 : Purification du lumicanne glycosylé par chromatographie d'ion métal-affinité - Analyse des fractions éluées par Western immunoblotting. Le milieu de culture des cellules HEK-Hlum est passé sur une colonne Ni-NTA Superflow. Le lumicanne est élué par 250 mM d'imidazole. Les fractions éluées sont déposées sur un gel SDS-PAGE, transférées sur membrane et révélées par un anticorps polyclonal de lapin anti-lumicanne.

4- Etude fonctionnelle comparative entre la protéine cœur et la forme glycosylée du lumicanne

La protéine cœur du lumicanne présente une activité anti-tumorale, en inhibant la migration des cellules de mélanome. Nous avons regardé l'effet du lumicanne Hlum 37 sur les cellules A375, HT144 et B16F1. Les cellules A375 et HT144 sont des lignées humaines de mélanome alors que les cellules B16F1 sont une lignée murine. Les résultats du test de migration sont montrés dans la figure 37. Le lumicanne inhibe significativement et de façon similaire, la migration des trois lignées de mélanome (-60 %, $p < 0,001$). Par ailleurs, lorsque les cellules ne sont plus en contact avec le lumicanne, la migration de celles-ci n'est plus affectée (figure 38). Ainsi l'effet du lumicanne est un phénomène réversible. Nous avons également démontré précédemment que les cellules A375 étaient capables d'adhérer sur la protéine cœur du lumicanne (D'Onofrio et coll. 2008). Afin de déterminer si les glycosylations portées par le lumicanne pouvaient interférer avec cette activité anti-tumorale, nous avons comparé l'effet du lumicanne produit par des cellules humaines et de la protéine cœur du lumicanne (Hlum 37) sur l'adhésion et la migration des cellules de mélanome A375. La production de lumicanne par les cellules MRC5 (Hlum 87) étant insuffisante, nous avons utilisé le lumicanne Hlum 57 lors des tests fonctionnels comparatifs.

4.1- Effet du lumicanne glycosylé sur l'adhésion des cellules A375

L'adhésion des cellules A375 sur Hlum 57 a été comparée avec l'adhésion de ces cellules sur Hlum 37, mais également sur d'autres substrats de la MEC comme le collagène de type I et la fibronectine. Nous avons tout d'abord réalisé une cinétique d'étalement des cellules sur 2 heures en vidéomicroscopie (vidéo 1 à 5). Après 2 heures, les cellules A375 se sont étalées sur la fibronectine (vidéo 1) et ont commencé à s'étaler sur le collagène de type I (vidéo 2). Sur les supports BSA (vidéo 3), Hlum 37 (vidéo 4) et Hlum 57 (vidéo 5), les cellules ont adhéré, mais restent rondes. En effectuant un test d'adhésion cellulaire, nous pouvons voir une différence dans la force d'adhésion des cellules A375 sur les différents substrats (figure 39). Les cellules A375 adhèrent plus fortement sur le lumicanne que sur la BSA, indépendamment de l'état glycosylé du lumicanne, mais cette adhésion est environ trois fois moindre comparée à celle sur collagène ou fibronectine. La différence d'adhésion sur fibronectine, collagène et lumicanne peut s'expliquer par une différence dans la cinétique d'étalement de la cellule observée dans les vidéo 1 à 5.

Les chaînes glycaniques portées par le lumicanne n'altèrent donc pas l'adhésion des cellules de mélanome A375 sur cette protéine.

4.2- Effet du lumicanne glycosylé sur la migration des cellules A375

Les cellules sontensemencées sur les membranes de polycarbonate des Transwell[®], recouvertes soit avec de la BSA (contrôle), soit avec la protéine cœur du lumicanne (Hlum 37) ou soit avec le lumicanne glycosylé (Hlum 57). Après 24 heures d'incubation, les cellules sont colorées au violet cristal. Le nombre de cellules ayant migré au travers des différents substrats a été quantifié en utilisant l'extension *Cell Counter* du logiciel ImageJ (figure 40). Le lumicanne Hlum 57 inhibe significativement la migration des cellules A375 (-80%, $p < 0,001$), d'une manière similaire à la protéine cœur du lumicanne (-70%, $p < 0,001$).

Ainsi, le lumicanne glycosylé possède les mêmes propriétés anti-migratoires que sa protéine cœur seule. Dans la suite de l'étude, nous avons utilisé le lumicanne Hlum 37 pour le revêtement de plaques de culture dans les tests de migration et d'adhésion. Le lumicanne Hlum 57 a été utilisé lorsqu'il était nécessaire d'injecter le lumicanne dans le milieu de culture, puisque contrairement à Hlum 37, Hlum 57 est soluble en milieu physiologique.

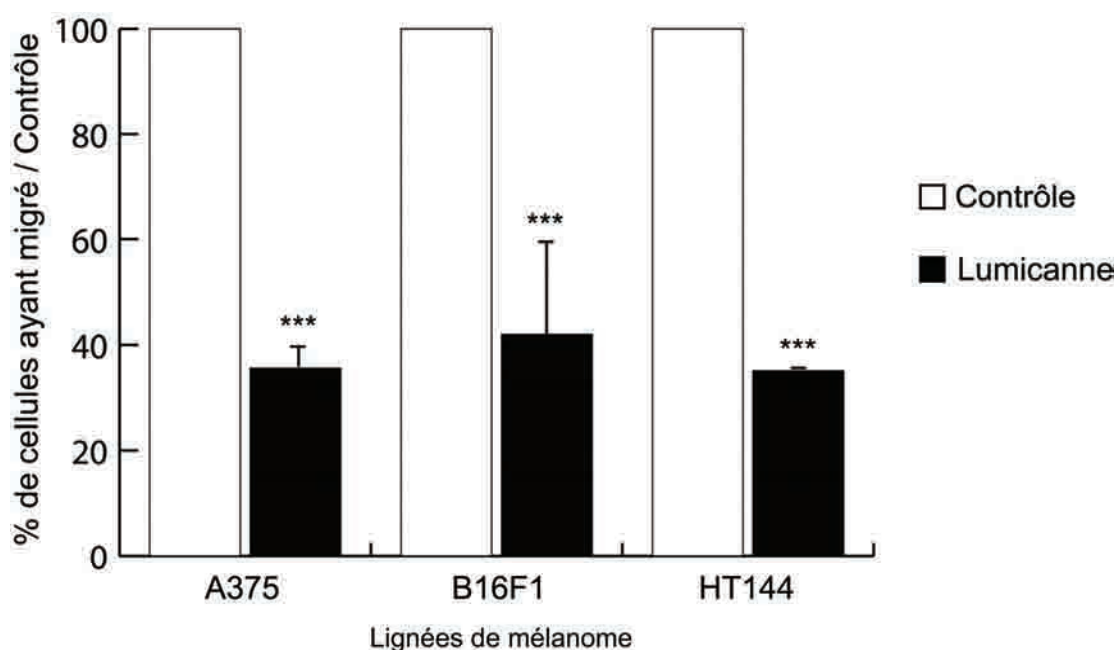


Figure 37 : Effet du lumicanne Hlum 37 sur la migration de trois lignées de mélanome. Les cellules A375, B16F1 et HT144 (5×10^4 cellules/Transwell[®]) sontensemencées sur des membranes de Transwell[®], coatées par du lumicanne Hlum 37 ou de la BSA (contrôle). La migration cellulaire est suivie sur 24 heures. Les cellules sont ensuite fixées et colorées au violet cristal. Les cellules de la face supérieure sont éliminées à l'aide d'une tige cotonnée et cinq champs/membrane sont photographiés. Les cellules ayant migré à la face inférieure des membranes sont comptées en utilisant l'extension *Cell Counter* du logiciel ImageJ. (***) $p < 0,001$).

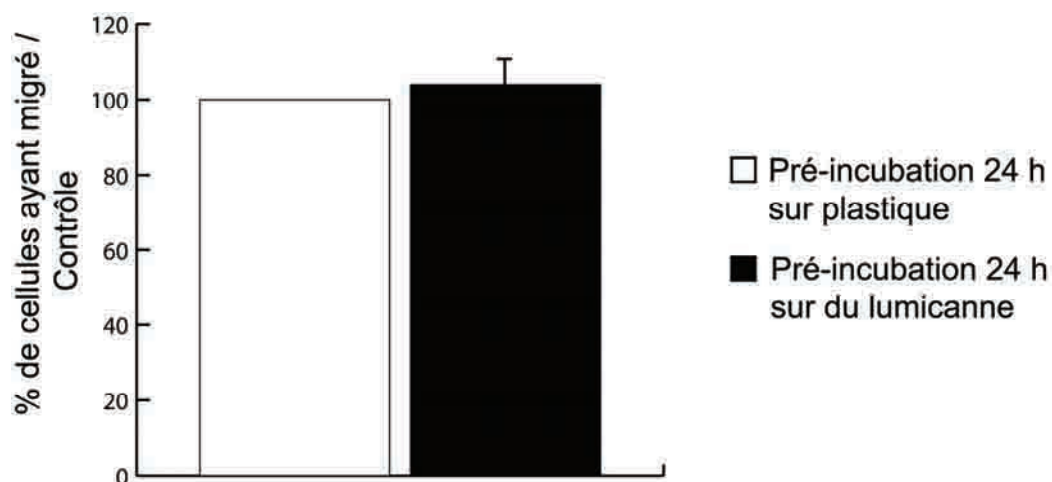


Figure 38 : Effet réversible du lumicanne sur les cellules A375. Les cellules pré-incubées sur plastique ou lumicanne Hlum 37 sont ensemencées sur des membranes de Transwell® non recouvert de protéines. La migration est mesurée sur 24 heures comme indiqué sur la figure 37.

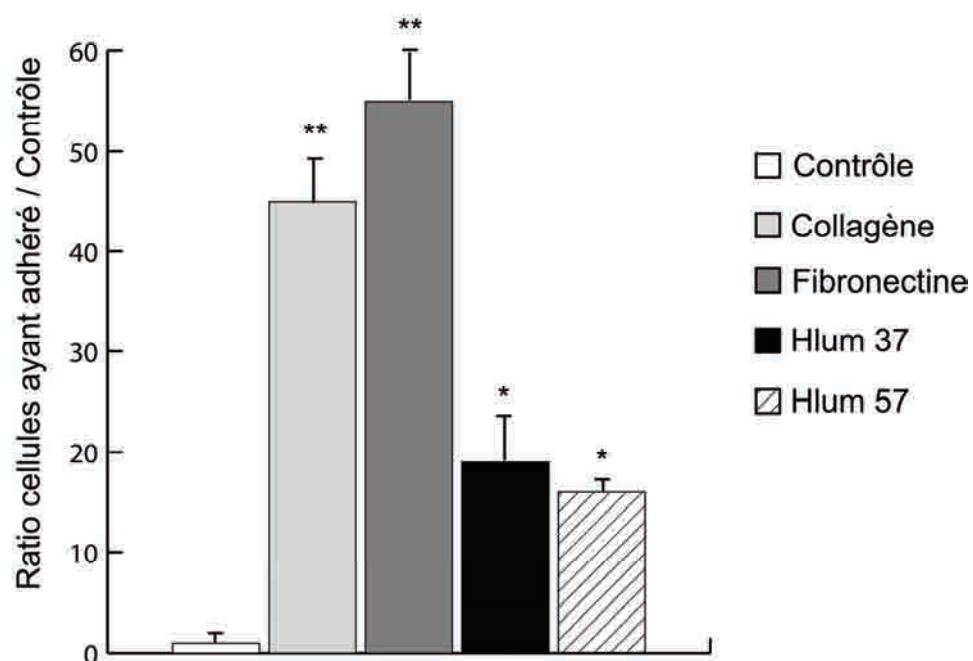


Figure 39 : Effet du lumicanne glycosylé (Hlum 57) sur l'adhésion des cellules de mélanome A375. Les cellules (5×10^4 cellules/puits, plaque 96 puits) sont ensemencées et incubées pendant 2 heures à 37°C sur différents revêtements protéiques (10 µg/puits). La BSA est utilisée comme contrôle. Les puits sont ensuite lavés afin d'éliminer les cellules non ou faiblement adhérentes. Les cellules sont fixées et colorées au violet de cristal. L'absorbance est lue à 560 nm. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

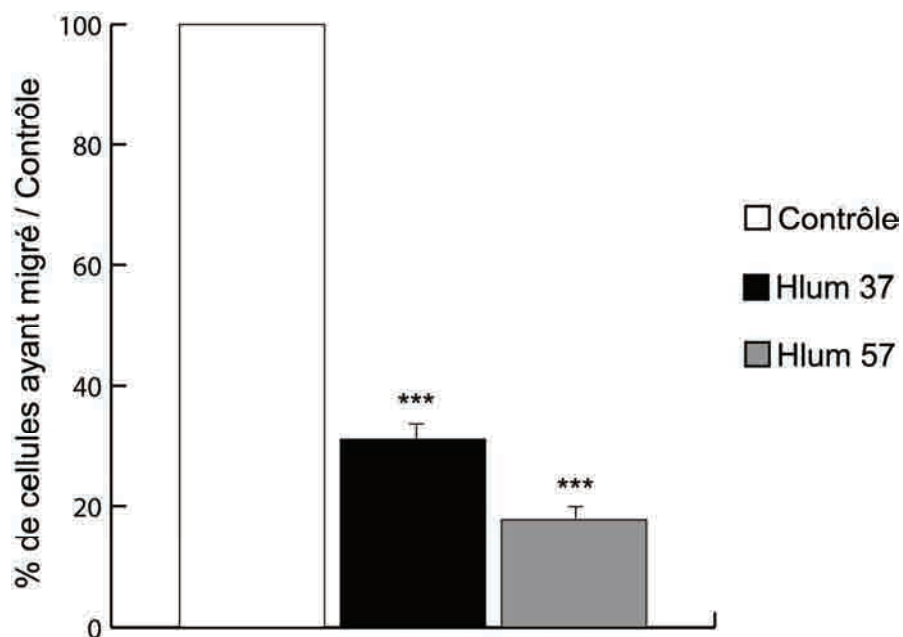


Figure 40 : Effet du lumicanne glycosylé (Hlum 57) sur la migration des cellules de mélanome A375. Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) sontensemencées sur la face supérieure des membranes de Transwell[®], préalablement recouvertes par 10 μg de lumicanne glycosylé, 10 μg de la protéine cœur de lumicanne (Hlum 37) ou de quantités équimolaires de BSA (contrôle). La migration cellulaire est mesurée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (***) $p < 0,001$.

CHAPITRE II : IMPLICATION DE L'INTEGRINE $\alpha 2\beta 1$ DANS L'INHIBITION DE LA MIGRATION CELLULAIRE PAR LE LUMICANNE

Le lumicanne, glycosylé ou non, est capable d'inhiber la migration des cellules de mélanome. Il pourrait y avoir une interaction entre le lumicanne et un récepteur présent à la surface des cellules, induisant cet effet. Les intégrines sont les principaux récepteurs de l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire. Elles sont impliquées dans de nombreux processus incluant la migration cellulaire (Parise et coll. 2000, Tsuji et coll. 2002 et Kuphal et coll. 2005). Nous avons précédemment montré dans notre équipe que le lumicanne était un substrat pour l'adhésion des cellules de mélanome. Cette adhésion est médiée par des intégrines contenant la sous-unité $\beta 1$, la sous-unité $\alpha 2$ semblant être également une bonne candidate. Dans le but de savoir si l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ était impliquée dans l'inhibition de la migration cellulaire par le lumicanne, les tests fonctionnels suivants ont été réalisés.

1- Effet du lumicanne sur des cellules A375 invalidées pour l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$

La migration des cellules de mélanome A375 est affectée en présence de lumicanne. Ces cellules expriment à leur surface un large panel de sous-unité d'intégrine α , notamment $\alpha 2$. Afin de déterminer la participation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'effet inhibiteur du lumicanne, nous avons invalidé l'expression la sous-unité $\alpha 2$ (gène ITGA2, GeneID#3673). Pour cela, nous avons utilisé la technologie d'interférence par les petits ARN (siRNA). Les cellules A375 ont été transfectées avec un ensemble de siRNA dirigés contre la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$. Nous avons appelé « sialpha2 », les cellules A375 transfectées avec les siRNA et « mock », les cellules A375 transfectées sans ARN.

1.1- Mise en évidence de l'invalidation de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$

L'expression de l'ARNm de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ a été analysée par RT-PCR semi-quantitative, 24, 48 et 72 heures après transfection des cellules A375 par les siRNA (figure 41A). L'ARN ribosomique 18S a été utilisé afin de normaliser l'expression de l'ARNm de la sous-unité $\alpha 2$. La quantification des résultats de la RT-PCR semi-quantitative est montrée dans la figure 41B. Vingt-quatre heures suivant la transfection, nous pouvons déjà observer une baisse de l'expression de l'ARNm de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ de 30 %. A 48

heures, l'inhibition de l'expression est de 85 %. Le meilleur taux d'invalidation de l'intégrine $\alpha 2$ est obtenu à 72 heures avec une inhibition de l'ARNm de 90 %. Ces résultats montrent l'efficacité des siRNA utilisés. De plus, nous avons regardé si l'expression protéique de l'intégrine $\alpha 2$ était bien invalidée et ceci par immunocytofluorescence. Les cellules ont été immunomarquées par les anticorps anti-sous-unités d'intégrine. L'observation a été réalisée en microscopie confocale (figure 42). Les cellules mock expriment la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ à leur surface (figure 42, B), alors qu'aucune fluorescence n'est détectée à la surface des cellules sialpha2, 72 heures après transfection par les ARN interférents (figure 42, H), indiquant une invalidation de l'expression de l'intégrine $\alpha 2$. L'expression de l'intégrine $\beta 1$, associée à la sous-unité $\alpha 2$ pour former l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, n'est pas affectée par les siRNA, puisqu'elle est retrouvée à la surface des cellules mock (figure 42, E) et des cellules sialpha2 (figure 42, K). Ces résultats ont été confirmés par cytométrie en flux (figure non montrée). De même, la spécificité des siRNA envers l'intégrine $\alpha 2$ a été vérifiée : l'expression des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ n'est pas compromise (figure 42, M-R).

1.2- Effet du lumicanne sur la migration des cellules A375 dont l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ est invalidée

Les tests de migration ont été réalisés 72 heures après la transfection des cellules A375. Des membranes de Transwell[®] ont été recouvertes avec soit du lumicanne ou soit de la BSA comme contrôle. Les cellules mock et sialpha2 sontensemencées dans la chambre supérieure des Transwell[®]. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont fixées et colorées au violet cristal. La migration des cellules de chaque condition est alors quantifiée (figure 43). La migration des cellules mock, non transfectée par des siRNA, est inhibée significativement en présence de lumicanne (-40 %, $p < 0,001$) par rapport au contrôle. Lorsque l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ est invalidée (cellules sialpha2), nous ne retrouvons pas l'effet inhibiteur du lumicanne. Ces résultats indiquent que la présence de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$, et ainsi l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, est nécessaire pour l'inhibition de la migration cellulaire par le lumicanne.

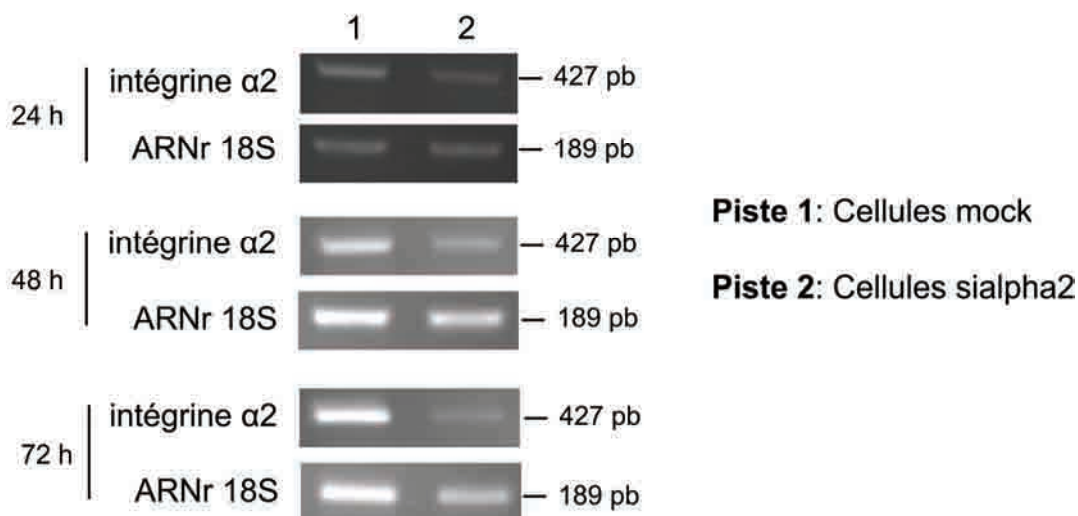
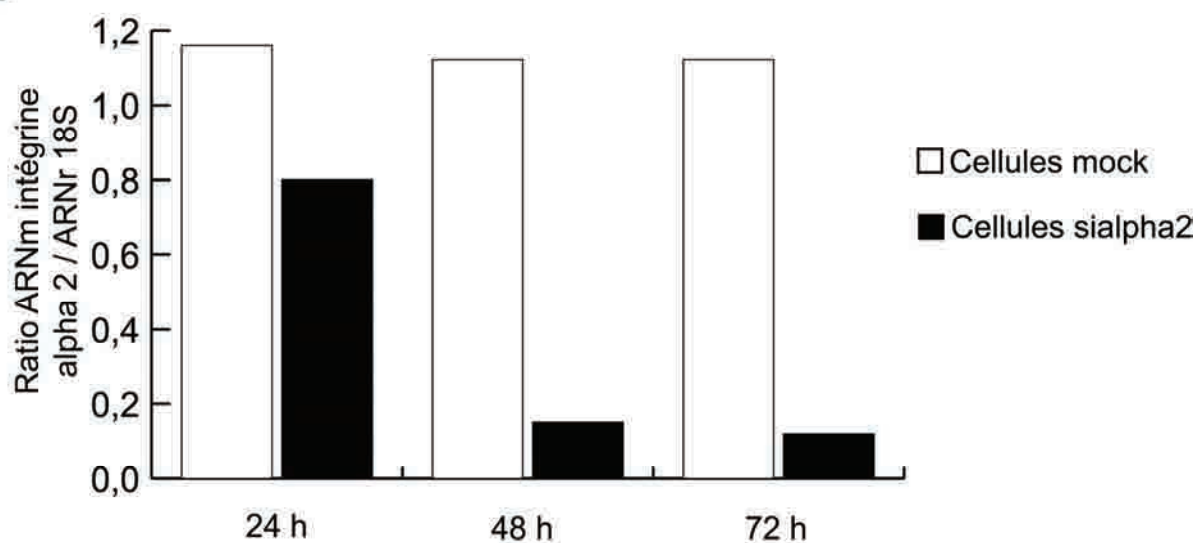
A**B**

Figure 41 : (A) Analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'invalidation de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ (gène ITGA2). Les cellules A375 ont été transfectées avec un mélange de siRNA dirigé contre le gène ITGA2. Les ARN sont extraits 24, 48 et 72 h après transfection et soumis à une RT-PCR. L'ARNr 18S est utilisé pour normaliser l'expression de l'ARNm du gène ITGA2. **(B) Quantification de l'invalidation de l'expression du gène ITGA2.** L'expression de l'ARNm de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ a été quantifiée en utilisant le logiciel Bioprofil. L'intensité des bandes obtenue pour l'intégrine $\alpha 2$ est rapportée à celle obtenue pour L'ARNr 18S dans chaque condition.

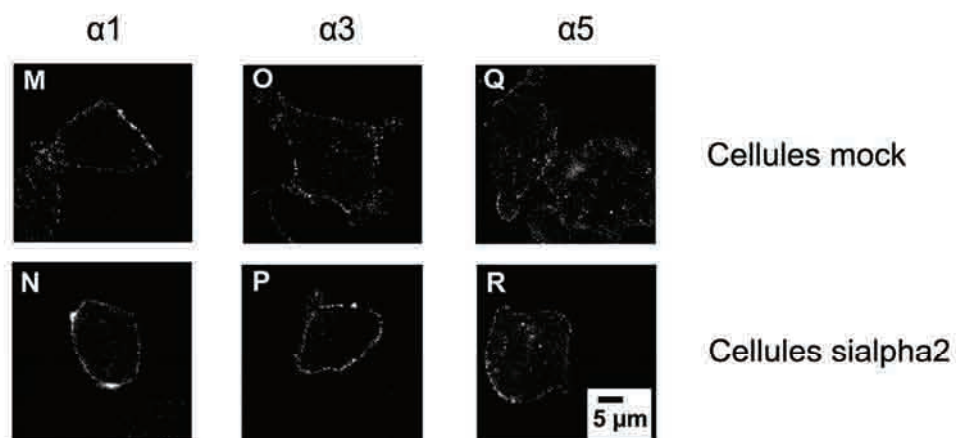
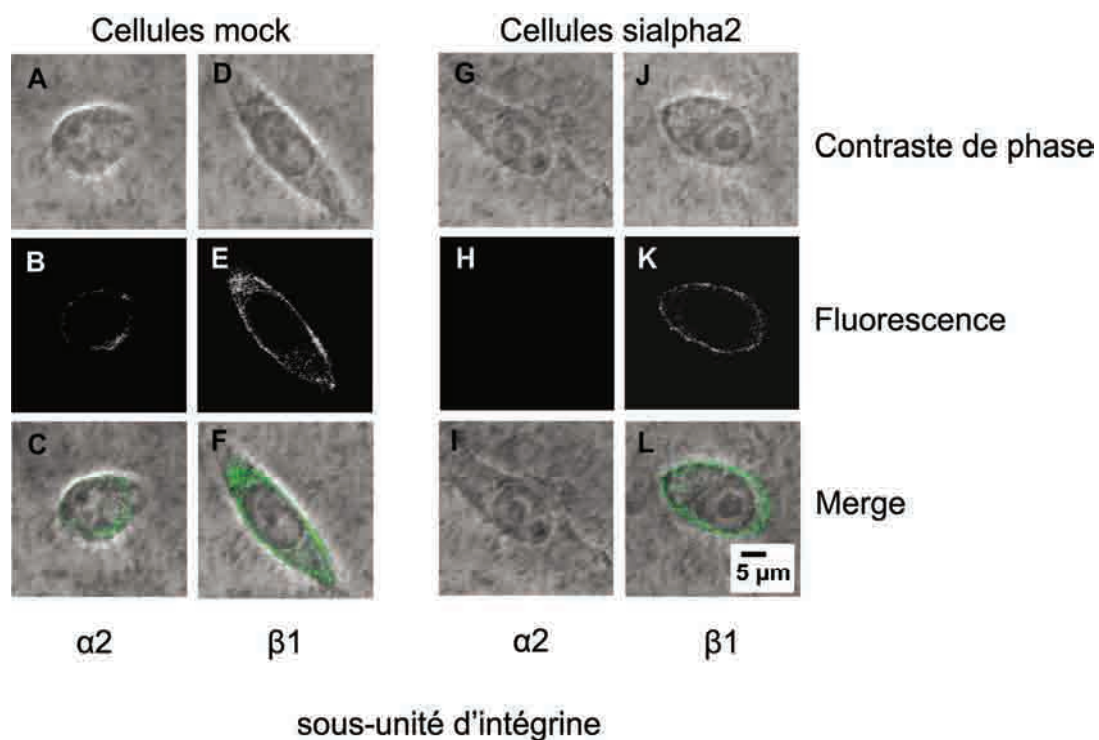


Figure 42 : Analyse par immunocytofluorescence de l'expression protéique de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$. Les cellules A375 sont ensemencées sur des lamelles de verre et transfectées par le mélange siRNA dirigé contre la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$. Les cellules sont fixées 72 h après transfection et immunomarquées par les anticorps anti-sous-unités d'intégrine couplé à l'Alexa Fluor[®] 488. L'observation a été réalisée en microscopie confocale.

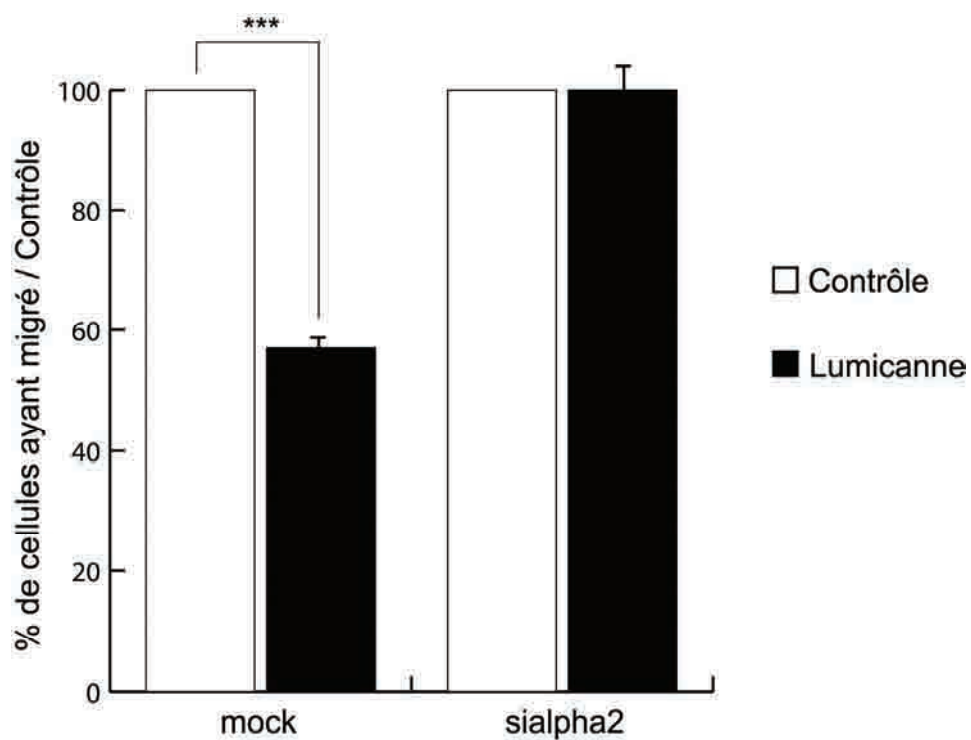


Figure 43 : Effet du lumicanne sur la migration des cellules sialpha2. Les cellules mock et sialpha2 sont ensemencées sur les membranes de Transwell® recouvertes avec 10 µg de lumicanne ou de quantités équimolaires de BSA (contrôle). La migration est quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (***) $p < 0,001$.

2- Effet du lumicanne sur des cellules surexprimant la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$

Nous avons vu précédemment (sous-chapitre 1) que l'invalidation de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ abolissait l'effet inhibiteur du lumicanne. Afin de confirmer le fait que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est impliquée dans l'inhibition de la migration cellulaire par le lumicanne, nous avons regardé l'effet du lumicanne sur une lignée de cellules dont l'expression de l'intégrine $\alpha 2$ est induite. Pour cela, nous avons utilisé les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) dont la lignée sauvage (CHO-WT) n'exprime pas la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$. Ces cellules ont été transfectées de façon stable avec un plasmide contenant le gène ITGA2 codant l'intégrine $\alpha 2$. Ainsi ces cellules (CHO-A2) peuvent exprimer la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ (Nykvist et coll. 2000, Taubenberger et coll. 2007). L'expression des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\beta 1$ des cellules CHO-WT et CHO-A2 a été analysée par Western immunoblotting (figure 44A). Les cellules de carcinome épithélial humain A431 ont été utilisées comme contrôle positif pour l'expression de ces sous-unités. Les cellules CHO-A2 expriment bien la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$, contrairement aux cellules CHO-WT, et ceci de manière équivalente à l'expression des cellules A431.

Un test fonctionnel d'adhésion a été réalisé afin de déterminer si les cellules CHO-A2 expriment suffisamment de sous-unités $\beta 1$ pour former l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Pour cela, les cellules CHO-WT et CHO-A2 ont été ensemencées sur une plaque 96 puits, recouverte par 10 μ g de lumicanne, par une quantité équimolaire de BSA (contrôle) ou par 10 μ g de collagène de type I. L'adhésion est mesurée sur deux heures (figure 44B). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est le principal récepteur du collagène de type I. Nous observons que l'adhésion des cellules CHO-WT sur le collagène de type I est assez faible et proche de celle sur la BSA (ratio de l'adhésion collagène/BSA = 5). A l'inverse, l'adhésion des cellules CHO-A2 sur le collagène est très forte, avec un ratio de l'adhésion collagène/BSA de 40. Cela confirme la présence de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface des cellules CHO-A2. Nous remarquons également que l'adhésion sur le lumicanne des cellules CHO-WT et CHO-A2 est la même (ratio de l'adhésion lumicanne/BSA = 20). Ce résultat n'exclut pas une implication de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'adhésion des cellules au lumicanne, mais cette intégrine n'est pas essentielle, au moins en ce qui concerne les cellules CHO.

Nous avons ensuite comparé l'effet du lumicanne sur la migration des cellules CHO-WT et CHO-A2 en Transwell[®] (figure 45). La migration des cellules CHO-A2, qui expriment l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, est inhibée en présence de lumicanne (-60 %, $p < 0,001$) alors que la migration des cellules CHO-WT, qui ne présentent pas d'intégrines $\alpha 2\beta 1$, n'est pas affectée

par le lumicanne. Les résultats obtenus confirment bien l'implication de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'effet anti-migratoire du lumicanne.

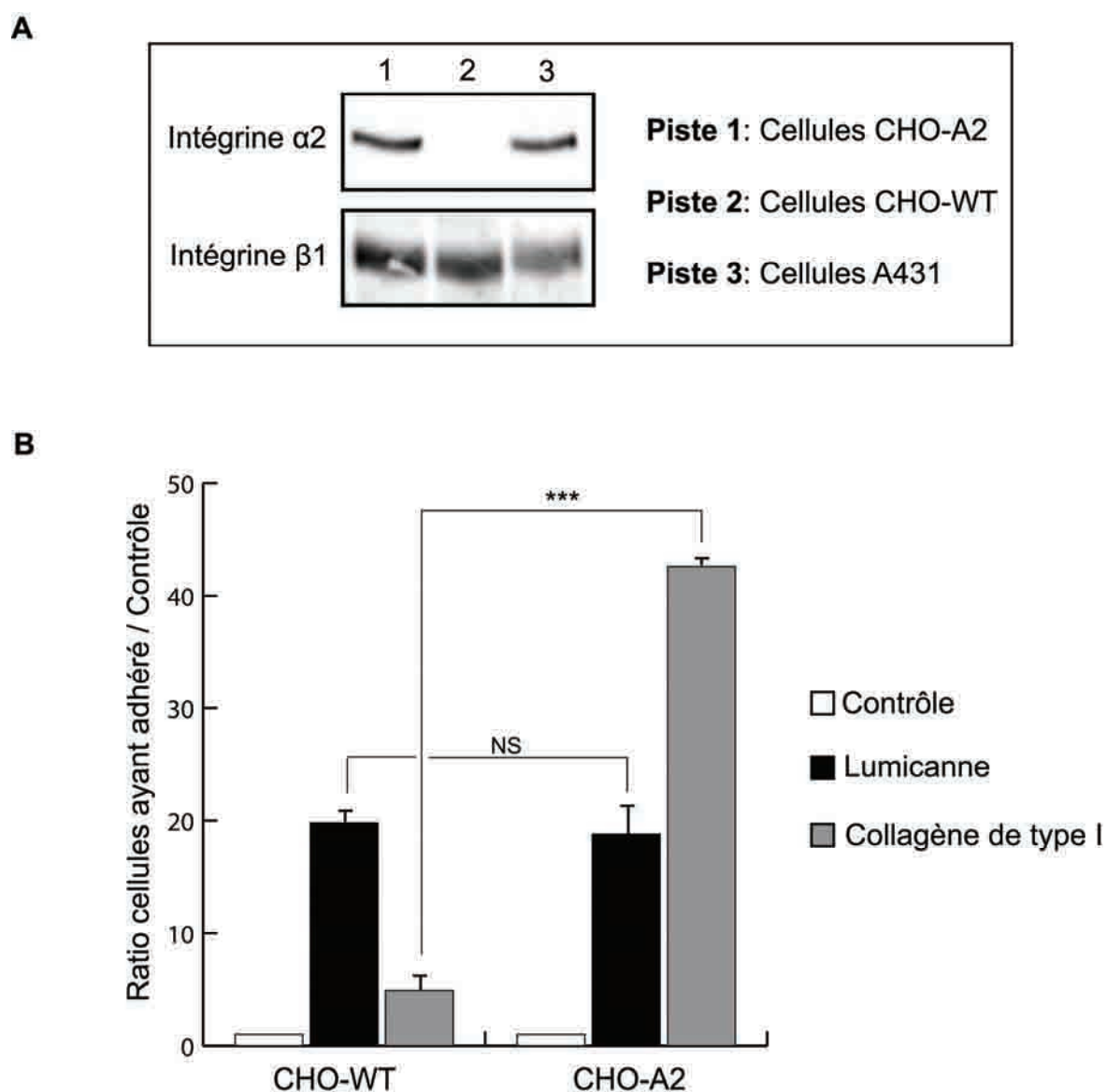


Figure 44 : (A) Mise en évidence de l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface des cellules CHO-A2. Analyse en Western immunoblotting de l'expression des sous-unités d'intégrine $\alpha 2$ et $\beta 1$ des cellules CHO-WT et CHO-A2. Les cellules A431 ont été utilisées comme témoin positif. Le blot nous a été fourni par le Dr Clemens Franz. (B) Adhésion des cellules CHO-WT et CHO-A2 sur le collagène et lumicanne. Les cellules (5×10^4 cellules/puit) sont déposées sur une plaque 96 puits, préalablement recouvert avec soit du collagène, soit du lumicanne ou soit de la BSA (contrôle), et incubées pendant 2 heures. Après lavage, les cellules sont colorées au violet cristal et l'absorbance est lue à 560 nm. Les résultats sont exprimés comme le ratio des cellules qui ont adhérees par rapport au contrôle. (*** $p < 0,001$; NS : non significatif).

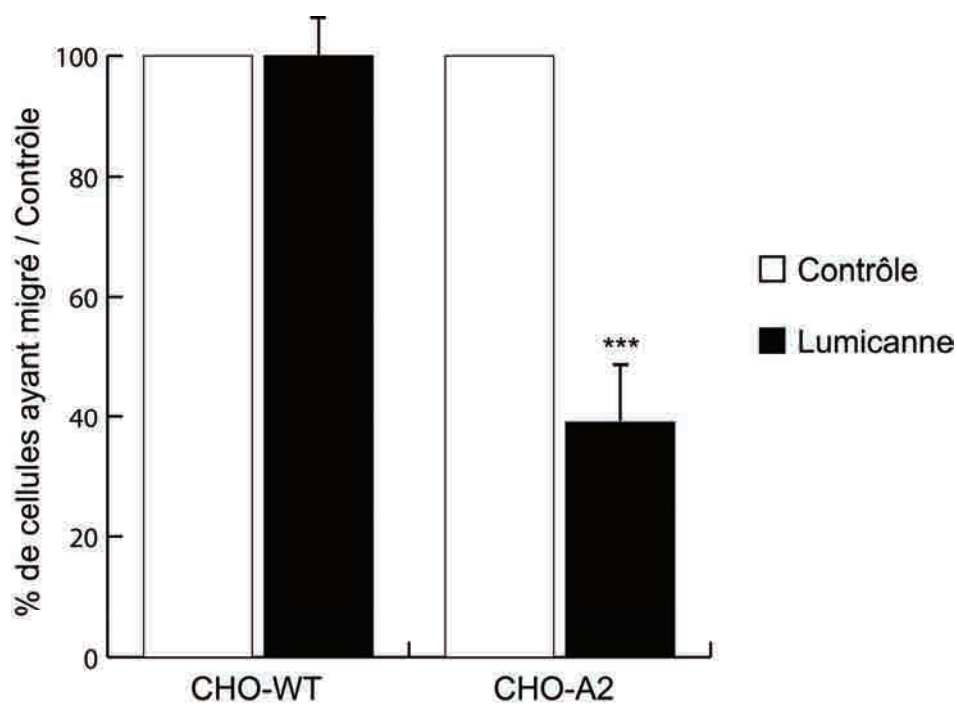


Figure 45 : Effet du lumicanne sur la migration des cellules CHO-WT et CHO-A2. Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) CHO-WT et CHO-A2 sont ensemencées sur les membranes de Transwell[®] recouvertes avec 10 μ g de lumicanne ou des quantités équimolaires de BSA (contrôle). La migration est quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37 (***) $p < 0,001$.

3- Interaction directe du lumicanne avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$

Nous avons mis en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'inhibition de la migration cellulaire par le lumicanne. Dans ce paragraphe, nous avons voulu déterminer si le lumicanne interagissait directement avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$.

Les premiers résultats ont été obtenus en collaboration avec l'équipe allemande du Pr. JA Eble. Une plaque de microtitration a été recouverte avec soit du lumicanne, soit du collagène de type I (contrôle positif) ou soit de la BSA (contrôle négatif). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ soluble est alors incubée dans les puits en présence des ions Mn^{2+} ou en présence d'EDTA (figure 46). La réponse obtenue pour la BSA représentant le « bruit de fond », celle-ci a été retranchée de la réponse obtenue pour le lumicanne et le collagène (figure 46, insert). Nous observons, en présence des ions Mn^{2+} , une fixation de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ au lumicanne. Nous montrons ainsi une interaction directe entre le lumicanne et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Cette interaction est certes deux fois moins importante que pour le collagène de type I, qui est le principal substrat de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. En présence d'EDTA, il n'y a plus d'interaction spécifique entre le collagène I et l'intégrine, alors que nous observons une faible baisse de l'interaction lumicanne-intégrine $\alpha 2\beta 1$. Ce résultat montre que l'interaction lumicanne-intégrine $\alpha 2\beta 1$ est indépendante des cations divalents.

Les seconds résultats ont été obtenus en collaboration avec l'équipe finlandaise du Pr. J Heino. Cette équipe a précédemment montré que le collagène de type I se fixait au niveau du domaine I de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ (Tulla et coll. 2008). Nous avons voulu déterminer si le lumicanne pouvait également interagir avec le domaine $\alpha 2I$. Pour cela, le lumicanne a été *coaté* dans des puits d'une plaque de microtitration. Le domaine $\alpha 2I$ couplé à une protéine GST est alors incubé avec le lumicanne. La BSA est utilisée comme contrôle négatif (figure 47). Le domaine $\alpha 2I$ fixe le lumicanne avec une meilleure affinité que la BSA. Nous obtenons une constante de dissociation K_d de 300 ± 100 nM pour la fixation du lumicanne au domaine $\alpha 2I$, ce qui dénote une faible interaction avec ce domaine.

Ces résultats suggèrent que le lumicanne fixe, d'une part, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ au niveau du domaine $\alpha 2I$ avec une faible affinité et d'autre part, un autre domaine de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ avec une plus forte affinité et de manière indépendante des cations divalents.

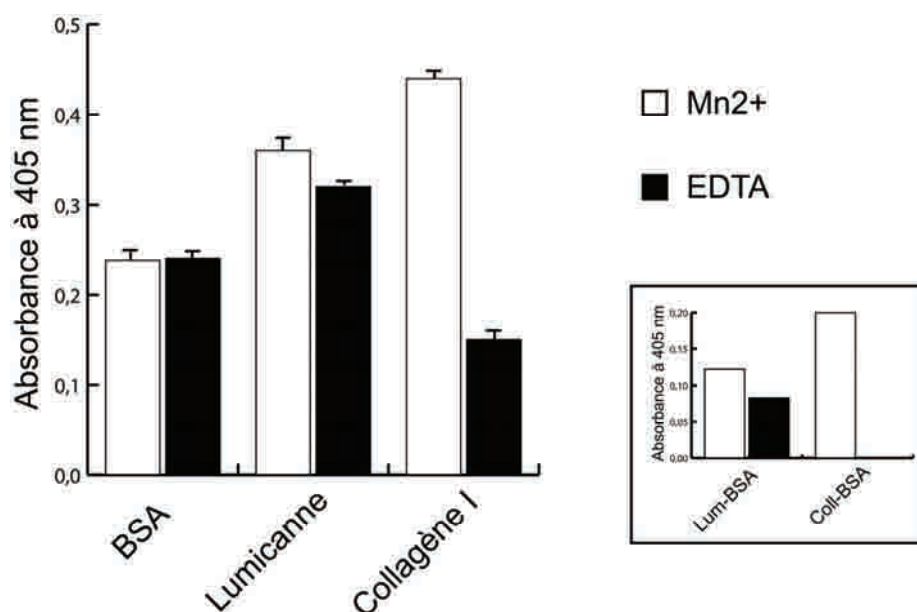


Figure 46 : Interaction directe du lumicanne avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Une plaque de microtitration a été recouverte par 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lumicanne recombinant, de collagène de type I ou de BSA. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à une concentration de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluée dans de la BSA/TBS/ MgCl_2 , est mise au contact des différents substrats pendant 2 heures à température ambiante, en présence de 1 mM de Mn^{2+} ou de 10 mM d'EDTA. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ non fixée est éliminée par lavage des puits. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ayant interagit avec les substrats est fixée par 2,5 % de glutaraldéhyde/HEPES. Après lavage de la plaque, la quantité d'intégrine $\alpha 2\beta 1$ fixée est mesurée par un test ELISA avec un anticorps anti-intégrine $\beta 1$ et un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline. Des tablettes de *p*-nitrophénylphosphate sont utilisées comme substrat de la phosphatase alcaline pour la détection du signal. La réaction de couleur jaune est mesurée à 405 nm par un lecteur de plaque ELISA. **Insert :** la réponse des signaux obtenus pour le lumicanne et le collagène a été corrigée par soustraction des valeurs obtenues pour la BSA.

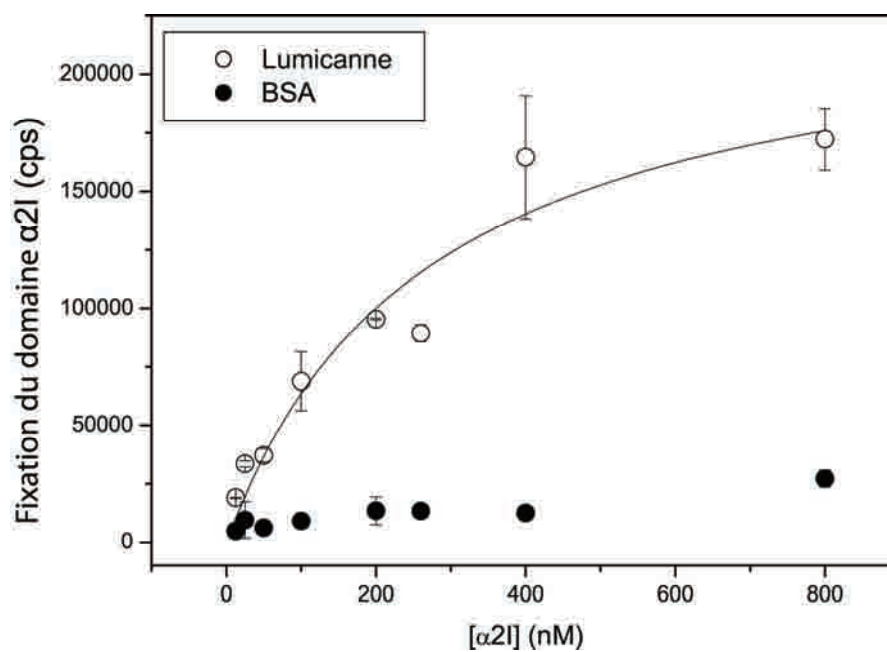


Figure 47 : Interaction directe du lumicanne avec le domaine $\alpha 2I$. Le lumicanne recombinant (16,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dilué dans de la PBS, a été *coaté* à l'intérieur des puits d'une plaque de microtitration. Les sites non spécifiques des puits sont bloqués avec du Delfia® Diluent II contenant de la BSA. Ce tampon a également été utilisé pour mesurer la fixation non spécifique. Le domaine d'intégrine $\alpha 2I$ couplé à une protéine GST, dilué dans le tampon Delfia® assay, est ajouté dans les puits à différentes concentrations pour une heure, en présence de 2 mM de MgCl_2 . Les puits sont ensuite lavés trois fois et la détection du signal est réalisé avec un anticorps anti-GST marqué Delfia® Europium et une solution Delfia® enhancement. Le signal est mesuré en utilisant un spectrophotomètre à fluorescence à résolution temporelle.

CHAPITRE III : CARACTERISATION DE LA SEQUENCE ACTIVE DU LUMICANNE RESPONSABLE DE L'INHIBITION DE LA MIGRATION CELLULAIRE

Dans le chapitre précédent, nous avons identifié l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ comme médiateur des effets du lumicanne. Dans ce troisième chapitre, nous avons localisé la séquence du lumicanne impliquée dans l'inhibition de la migration des cellules de mélanome par ce SLRP.

1- Détermination de la séquence active du lumicanne présentant un effet inhibiteur de migration cellulaire

1.1- Localisation de la région active au sein du lumicanne

Afin de localiser la région du lumicanne dans laquelle se situe la séquence active, nous avons, dans une première approche, produit différents fragments issus du lumicanne. La schématisation du lumicanne et de ses fragments est représentée dans la figure 48A. La protéine cœur du lumicanne comprend les motifs de 11 répétitions riches en leucine (LRR). Le peptide L 1-9, d'une taille de 30,5 kDa, comporte entre autre les motifs des LRR 1 à 9 et le peptide L 1-6, d'une taille de 23,9 kDa, les motifs des LRR 1 à 6. Les deux fragments recombinants ont été produits et purifiés de manière similaire au lumicanne recombinant Hlum 37. Une analyse par Western immunoblotting a permis de confirmer la synthèse de ces fragments (figure 48B). Les fragments ont été testés sur la migration des cellules A375, et comparés à l'effet du lumicanne. Les cellules ont étéensemencées sur des membranes de Transwell[®] recouvertes avec les différents fragments. La migration est quantifiée sur 24 heures (figure 49). En présence du fragment L 1-9, nous observons une inhibition de la migration des cellules A375 comparable à celle obtenue en présence de lumicanne. En revanche, le fragment L 1-6 n'affecte pas la migration de ces cellules. Ces résultats suggèrent que la séquence active inhibitrice de la migration cellulaire se situe dans la région comportant les motifs des LRR 7 à 9.

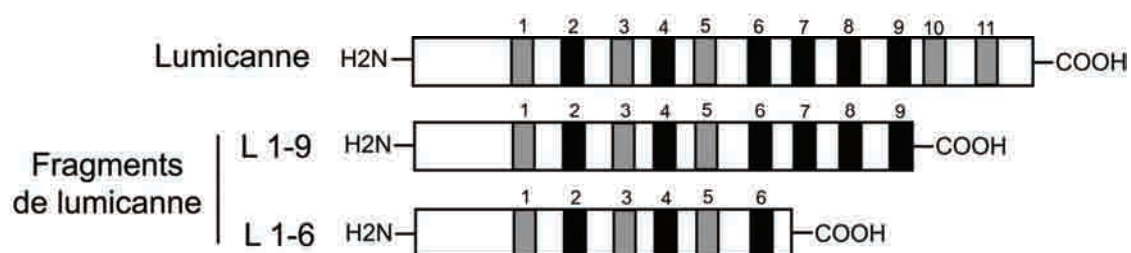
1.2- Analyse de la région comportant les LRR 7 à 9

Nous avons en premier lieu analysé la région où se situe les LRR 7 à 9 par un alignement de séquence du lumicanne de différentes espèces (voir figure 15). Il en résulte que

cette région est très conservée inter-espèce, mais aucun LRR de cette région ne semble plus conservé qu'un autre.

Le lumicanne, la décorine, le biglycane et la fibromoduline appartiennent à la famille des SLRP et possèdent des activités biologiques similaires, en particulier des propriétés anti-tumorales (Goldoni et coll. 2008, Weber et coll. 2001). Les séquences ayant des fonctions importantes sont souvent conservées au sein d'une même famille de protéine. La séquence du lumicanne impliquée dans l'inhibition de la migration cellulaire, pourrait ainsi être conservée entre les SLRP. Nous avons alors réalisé un alignement de la séquence en acides aminés des quatre SLRP et nous nous sommes focalisés sur la région comportant les LRR 7 à 9 (figure 50). L'alignement montre 54 % (6/11) de conservation du motif du LRR 9, alors que seulement 27 % (3/11) des acides aminés sont conservés au niveau des motifs des LRR 7 et 8. Ainsi, le motif du LRR 9 peut-être considéré comme un bon candidat pour contribuer à l'effet anti-migratoire du lumicanne entier.

A



B



Figure 48 : (A) Représentation schématique de la protéine du lumicanne et des fragments dérivés. Les motifs LxxLxLxxNxL sont représentés par des rectangles noirs (consensus) et gris (consensus partiel). (B) Détection de la protéine cœur du lumicanne et des fragments L 1-9 et L 1-6 par Western immunoblotting. Les protéines ont été révélées par un immunosérum purifié dirigé contre le lumicanne entier obtenu comme décrit dans le paragraphe 2.2.3 du chapitre méthodes. La taille des différentes bandes est indiquée dans la marge droite.

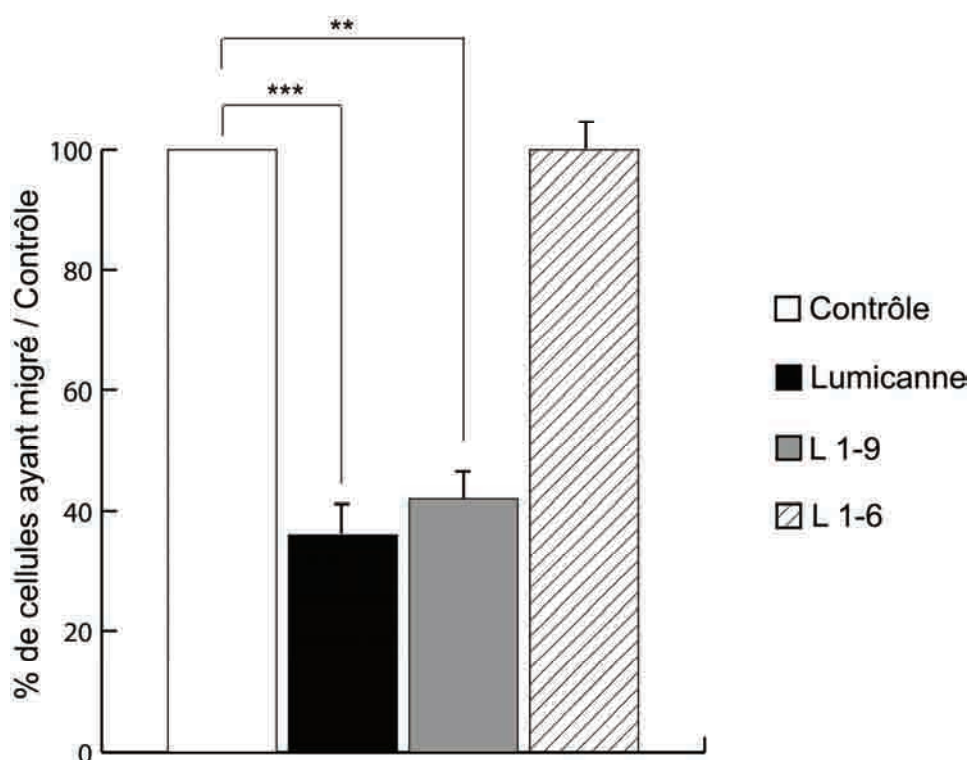


Figure 49 : Effet des fragments L 1-9 et L 1-6 sur la migration des cellules A375. Les cellules (5×10^4 cellules/chambre) sont ensemencées sur des membranes de Transwell®, recouvertes par du lumicanne, L 1-9, L 1-6 ou de la BSA (contrôle). La migration est mesurée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

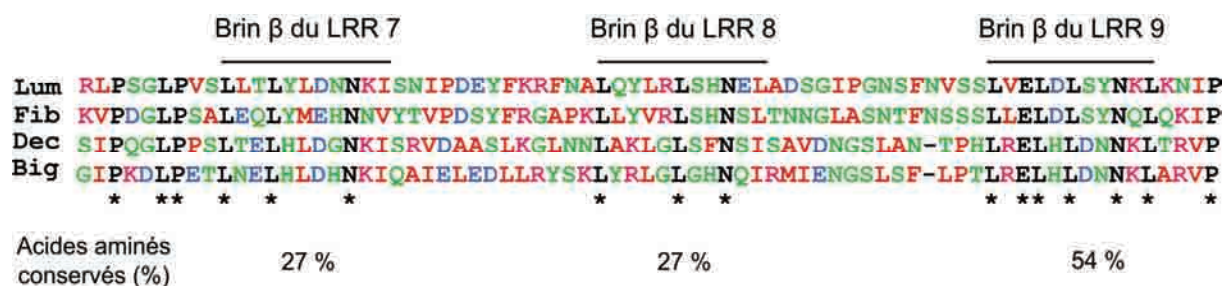


Figure 50 : Alignement de la séquence protéique partielle humaine de quatre SLRP (lumicanne (Lum), fibromoduline (Fib), décorine (Dec) et biglycane (Big)) incluant les LRR 7 à 9. Les acides aminés identiques sont indiqués par les étoiles et les lettres noires (bleu: acides aminés acides, magenta: acides aminés basiques, rouge: acides aminés petits et hydrophobes, vert: acides aminés restants). Les acides aminés conservés (%) entre les quatre SLRP pour chaque motif des LRR sont indiqués en-dessous des séquences. L'analyse a été réalisée via le logiciel ClustalW2 accessible sur le site the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>).

1.3- Etude du LRR 9 sur la migration des cellules de mélanome

Nous avons synthétisé un peptide (peptide 9) dérivé du LRR 9 du lumicanne, dont la séquence encadre le motif de ce LRR. En parallèle, deux autres peptides, choisis en dehors de la région comportant les LRR 7 à 9, ont également été synthétisés : Il s'agit du peptide 5, dérivé du LRR 5 du lumicanne et du peptide 11, dérivé du LRR 11 du lumicanne. Le peptide dérivé du LRR 8 a aussi été synthétisé et utilisé ultérieurement. La localisation et la séquence en acides aminés des peptides sur le lumicanne sont représentées dans la figure 51. Un modèle de la structure du lumicanne, obtenue par homologie à partir de la structure cristallographique de la décorine et du biglycane, montre que les acides aminés des peptides 8, 9 et 11 sont localisés au niveau de la face concave du lumicanne, alors que la plupart des résidus du peptide 5 sont situés sur la face convexe (figure 51B).

Nous avons testé tout d'abord différentes concentrations du peptide 9 sur la migration des cellules A375. Les cellules sont pré-incubées avec le peptide 9 avant d'êtreensemencées sur des membranes de Transwell® non recouvertes par un substrat protéique. Le peptide 9 a été utilisé à des concentrations de 1, 10 et 100 μM (figure 52). Le peptide 9 inhibe la migration des cellules de mélanome A375, et d'une manière dose-dépendante. Ainsi, à une concentration de 10 μM , le peptide 9 inhibe la migration par 40 %, mais la meilleure inhibition est obtenue pour une concentration de 100 μM (-60 %, $p < 0,001$). Nous obtenons un coefficient de corrélation pour la courbe dose-réponse $r = 0,994$. La concentration de 100 μM a été utilisée lors des tests suivants. La cytotoxicité du peptide 9 à une concentration de 100 μM a été mesurée *via* un test MTT. Après 24 heures d'incubation, nous ne notons aucune différence dans la viabilité des cellules, pré-incubées ou non avec le peptide 9 (figure 52, insert). L'effet du peptide 9 a été comparé aux peptides 5 et 11 afin de déterminer si l'inhibition de la migration est spécifique à ce peptide. Les cellules ont été pré-incubées avec l'un des trois peptides (100 μM) avant d'être déposées dans des chambres de Transwell®. La migration est mesurée sur 24 heures (figure 53). Seul le peptide 9 inhibe la migration des cellules A375.

Nous avons précédemment montré que le lumicanne était capable d'inhiber la migration de trois lignées de mélanome. Nous avons testé si le peptide 9 présentait ces mêmes propriétés. Ainsi, les cellules A375, B16F1 et HT144 ont été pré-incubées avec ce peptide. L'effet du peptide 9 a été comparé à un peptide 9 scramble (peptide 9 dont la séquence protéique a été mélangée). Les résultats de la migration sont montrés sur la figure 54. Le peptide 9 inhibe significativement la migration des cellules A375, B16F1 et HT144 (-60%,

$p < 0,001$; -30%, $p < 0,05$ et -30%, $p < 0,05$, respectivement), tandis que le peptide scramble correspondant (9 SCR) n'a aucun effet sur la migration de ces cellules. Cependant, bien que l'effet du peptide 9 sur la migration des cellules A375 soit similaire à celui du lumicanne entier, sur les cellules B16F1 et HT144, il est deux fois moindre.

L'ensemble de ces résultats montre que la séquence du motif du LRR 9 du lumicanne est responsable de l'inhibition de la migration des cellules de mélanome. Nous proposons le nom de lumcorine (lumicanne core protéine) pour le peptide dérivé de ce motif.

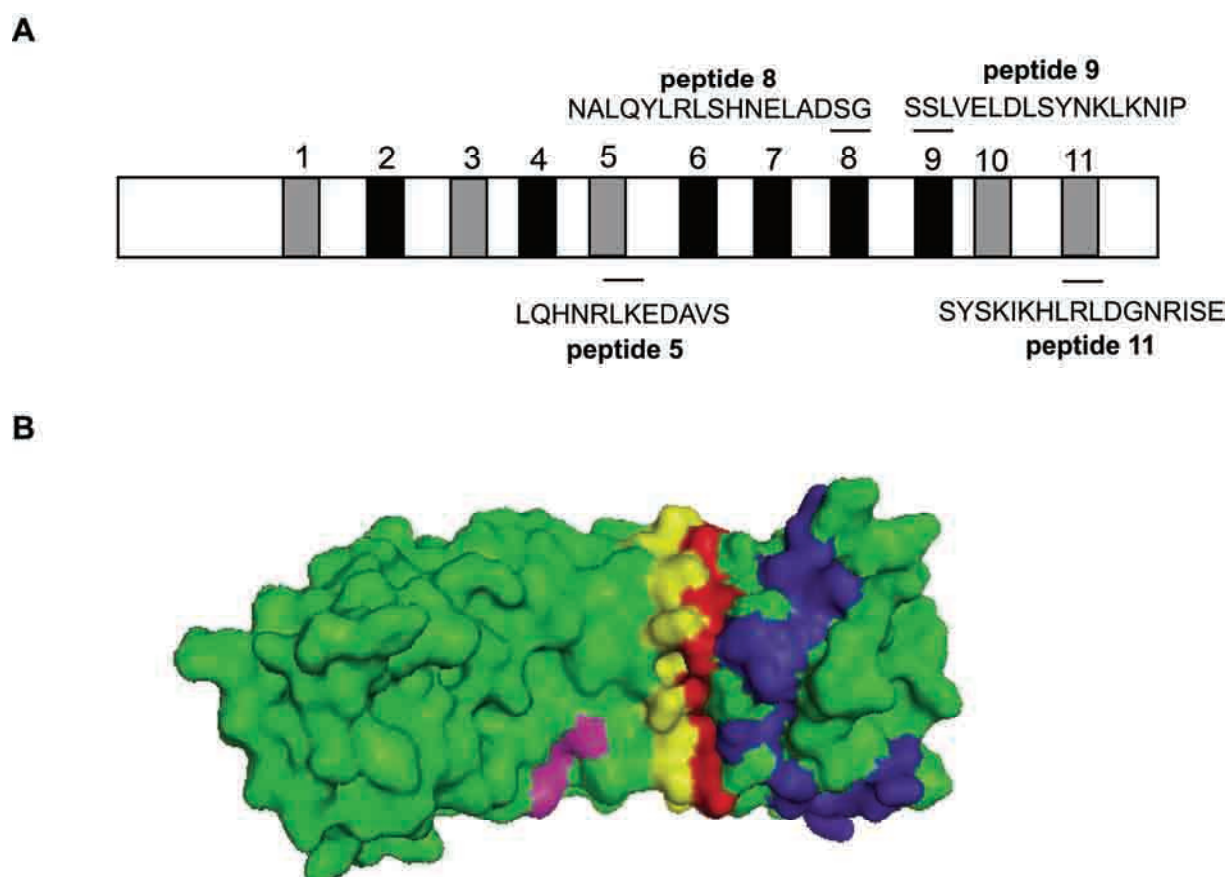


Figure 51 : (A) Séquence et localisation des différents peptides synthétiques utilisés au cours de cette étude. La séquence en acides aminés est donnée pour chaque peptide et localisée sur la représentation schématique de la protéine cœur du lumicanne par un trait. **(B) Vue de la face concave du lumicanne.** Le modèle structural a été obtenu à partir de la structure cristallographique de la décorine et du biglycane (PDB # 1xku et PDB # 2ft3) en utilisant le logiciel Swiss-Pdb Viewer. La séquence des peptides 5, 8, 9 et 11 est colorée en magenta, jaune, rouge et bleue, respectivement.

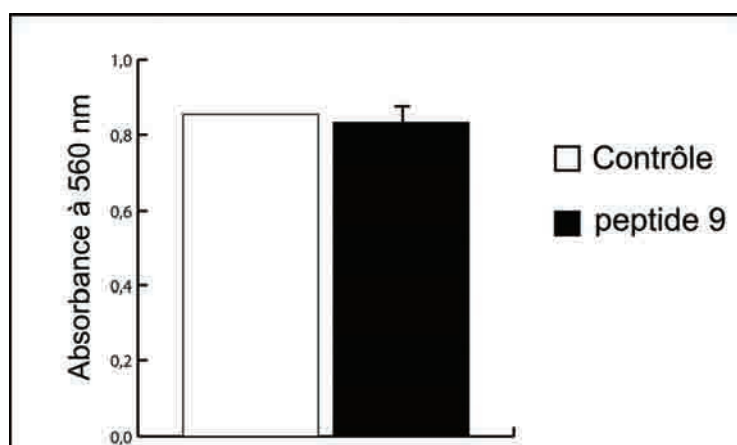
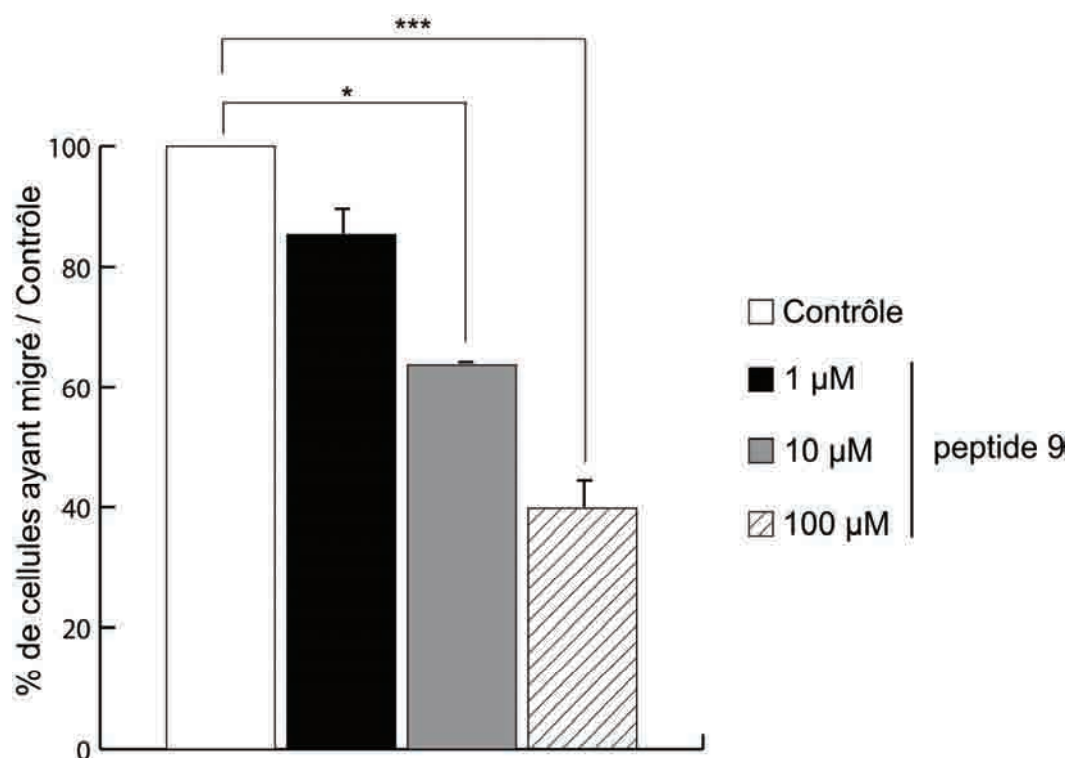


Figure 52 : Effet dose-réponse du peptide 9 sur la migration des cellules de mélanome A375. Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) sont pré-incubées pendant 2 heures avec le peptide 9 à différentes concentrations ou sans peptide (contrôle), avant d'être ensemencées sur des membranes de Transwell[®]. La migration est quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37 (Coefficient de corrélation $r = 0,994$; $p < 0,001$). **Insert :** Mesure de l'effet cytotoxique du peptide 9 sur les cellules A375. Le test de viabilité cellulaire a été réalisé, après 24 heures d'incubation des cellules avec le peptide 9 ou sans peptide (contrôle), par une mesure de la réduction du MTT. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

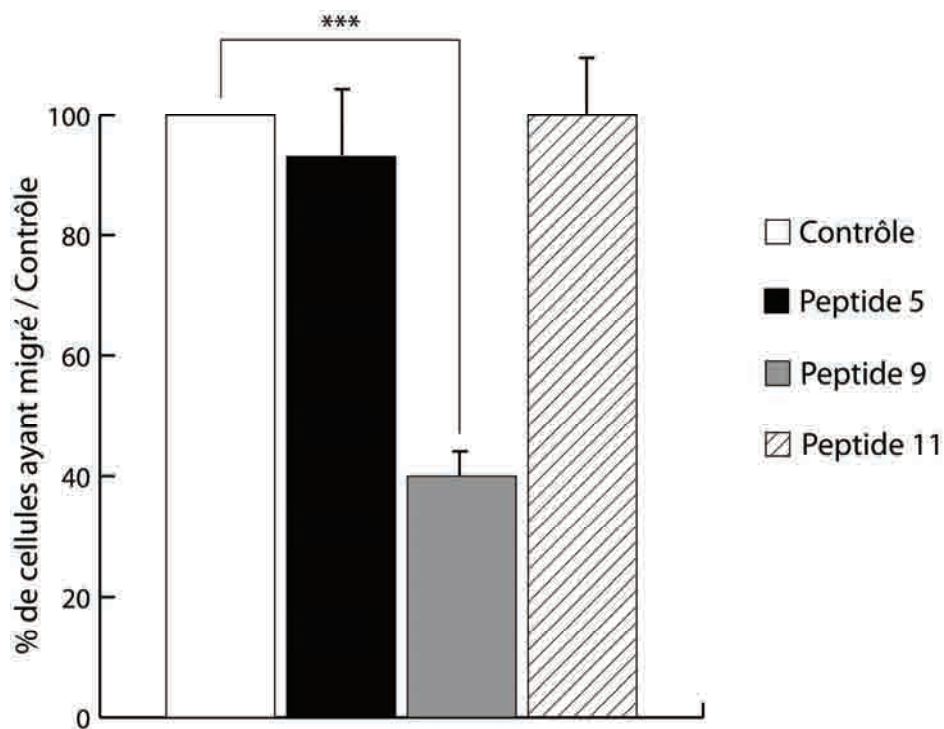


Figure 53 : Effet des peptides 5 et 11 sur la migration des cellules de mélanome A375.

Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) sont pré-incubées pendant 2 heures avec le peptide 5, 9 ou 11 à une concentration de $100 \mu\text{M}$ ou sans peptide (contrôle), avant d'être ensemencées dans des chambres de Transwell[®]. La migration est quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (***) $p < 0,001$).

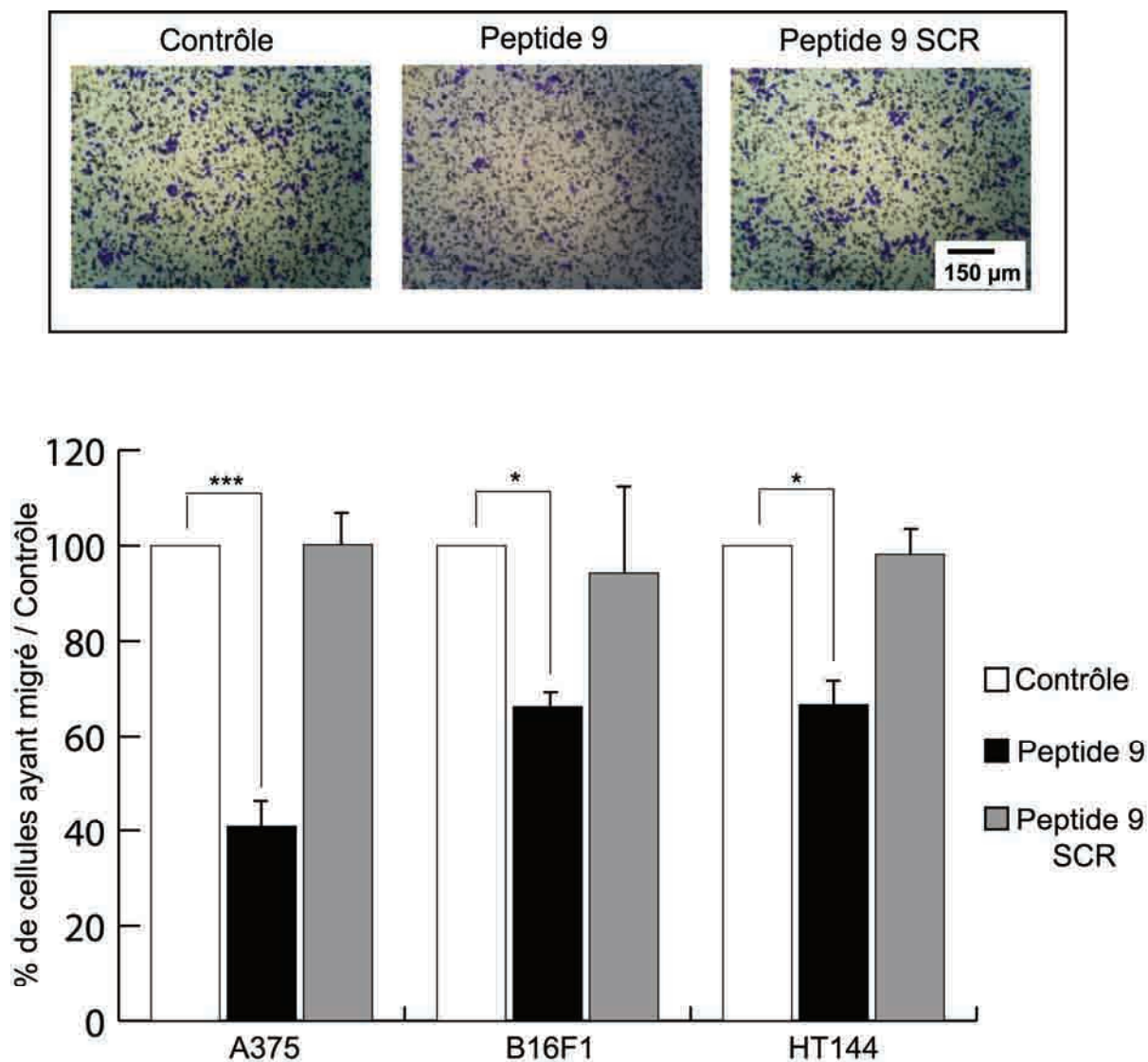


Figure 54 : Effet du peptide 9 sur la migration des trois lignées de mélanome A375, B16F1 et HT144. L'effet du peptide 9 est comparé à un peptide scramble (9 SCR). Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) sont pré-incubées pendant 2 heures avec le peptide 9 ou 9 SCR à une concentration de 100 μ M ou sans peptide (contrôle), avant d'être ensemencées sur la face supérieure des membranes de Transwell[®]. La migration est quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. **Insert :** Observation de la migration des cellules A375 en microscopie optique. Les cellules sont colorées au violet cristal. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

2- Effet de lumcorine sur l'adhésion des cellules de mélanome

Les effets de lumcorine (peptide 9) observés sur la migration des cellules de mélanome peuvent être dus à une inhibition directe de la migration ou bien à une inhibition de l'adhésion des cellules sur la face supérieure des membranes de Transwell[®]. Afin de déterminer le mode d'action de lumcorine, son effet a été testé sur l'adhésion des cellules de mélanome. Il a été décrit que le revêtement de plaque de culture par des petits peptides solubles n'était pas approprié (Humphries 2003). Pour cette raison, nous avons réalisé un test de compétition pour l'adhésion des cellules au substrat. Les cellules de mélanome A375, HT144 et B16F1 ont été pré-incubées avec lumcorine, avant d'être ensemencées dans des puits d'une plaque 96 puits, préalablement recouverte avec du lumican ou de la BSA (contrôle). Les cellules de mélanome ont également été pré-incubées avec le lumicanne sous forme soluble, comme contrôle positif. L'adhésion est mesurée sur 2 heures (figure 55). Nous pouvons noter, en premier lieu, que la force d'adhésion au lumicanne diffère selon les cellules de mélanome : l'adhésion des cellules B16F1 au lumicanne est trois fois plus forte que celle des cellules A375. Lorsque les cellules ont été en contact avec le lumicanne sous forme soluble, leur adhésion est inhibée sur le revêtement de lumicanne. Ce résultat suggère une compétition entre les deux formes de lumicanne (soluble et fixé (revêtu)). Le lumicanne soluble a saturé le récepteur au lumicanne pour l'adhésion, empêchant ainsi l'interaction des cellules avec le lumicanne fixé. En revanche, lumcorine n'affecte pas l'adhésion des cellules au lumicanne. Ce résultat indique également que la séquence du lumicanne impliquée dans l'adhésion peut être distincte du site actif responsable de l'inhibition de la migration cellulaire. Ceci a été confirmé par le fait que les cellules A375 adhèrent sur le fragment L 1-6 (figure 56), alors que celui-ci n'affecte pas la migration de ces cellules (figure 49).

3- Effet de lumcorine sur la migration et l'adhésion des cellules de mélanome en présence de collagène

Le collagène est le composant majeur de la matrice extracellulaire. Le lumicanne est connu pour interagir avec le collagène de type I (Chakravarti 1998) et ceci pourrait induire une interférence sur l'effet inhibiteur du lumicanne. De plus, l'effet induit par le collagène sur les cellules de mélanome pourrait annihiler l'effet de lumcorine. Nous avons donc testé l'effet du peptide sur la migration des cellules A375 en présence de collagène de type I. Les cellules ont été pré-incubées avec lumcorine (100 μ M) et ensemencées sur des membranes de Transwell[®] recouvertes avec du collagène. La migration est quantifiée sur 24 heures (figure

57). Lumcorine inhibe significativement la migration des cellules A375 en présence de collagène I (-60 %, $p < 0,05$). Ce résultat indique que le collagène ne compromet pas l'activité anti-migratoire de lumcorine.

De même, nous avons vérifié l'effet de lumcorine sur l'adhésion des cellules A375 au collagène. Ce test de compétition a été réalisé d'une manière identique à celui décrit dans le paragraphe 2. Les résultats sont montrés sur la figure 58. Lumcorine n'affecte pas l'adhésion des cellules de mélanome au collagène.

4- Effet du peptide dérivé du LRR 8 du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome

Nous avons montré précédemment que l'effet inhibiteur de la migration était médié au niveau de la région comportant les LRR 7 à 9. Bien que le peptide dérivé du LRR 9 (lumcorine) soit un peptide actif, il n'est pas exclu que les séquences dérivées des LRR 7 et 8 puissent jouer également un rôle dans l'inhibition de la migration par le lumicanne. Ceci pourrait expliquer les différences observées entre l'effet de lumcorine et de la protéine lumicanne entière. Cependant, le côté N-terminal du peptide 7 montrant des propriétés très hydrophobes, celui-ci interagissait de façon non spécifique avec les cellules en les agglomérant. De ce fait, ce peptide a été retiré de notre étude. Ainsi, uniquement le peptide 8 a été testé. Les cellules A375 et B16F1 ont été pré-incubées avec le peptide 8, dans les mêmes conditions que lors des tests avec lumcorine. Le résultat des tests de migration est présenté dans la figure 59. Le peptide 8 inhibe significativement la migration des cellules A375 (-30 %, $p < 0,05$), dans un degré moindre que lumcorine (-50 %, $p < 0,01$), mais n'affecte pas la migration des cellules B16F1.

Puisque le peptide 8 et lumcorine sont capables d'inhiber la migration des cellules A375, nous avons voulu savoir s'il pouvait exister un effet synergique des deux peptides sur l'inhibition de la migration cellulaire. Pour cela, les cellules A375 ont été pré-incubées avec le peptide 8 et lumcorine, à une concentration de 100 μ M chacun. La migration des cellules en chambre de Transwell® a été quantifiée sur 24 heures (figure 60). Nous retrouvons la même différence dans l'effet du peptide 8 et de lumcorine que lors du test précédent. Lorsque les deux peptides sont ajoutés ensemble dans le milieu de culture des cellules, nous obtenons un effet intermédiaire entre le peptide 8 et lumcorine. Ce résultat suggère que le peptide 8 et lumcorine peuvent interagir avec le même récepteur.

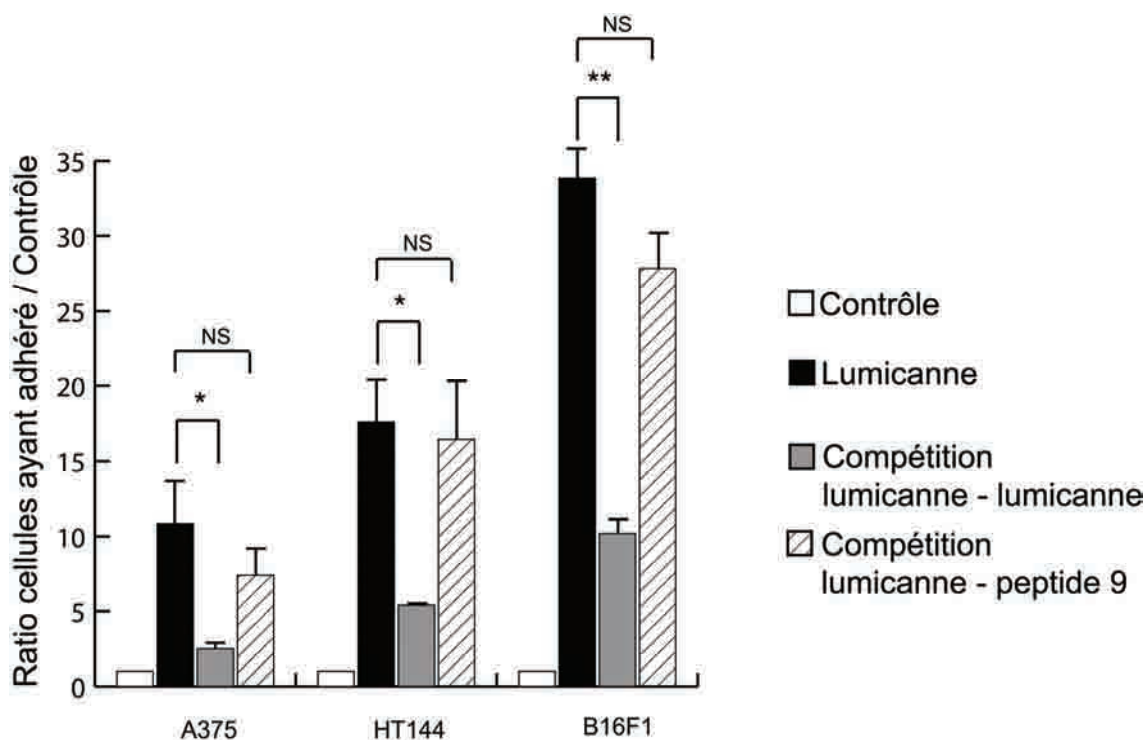


Figure 55 : Effet de lumcorine sur l'adhésion des cellules de mélanome au lumicanne. Les cellules A375, HT144 et B16F1 ont été pré-incubées pendant 1 heure avec le lumicanne ou lumcorine (peptide 9), avant d'être ensemencées sur un revêtement de lumican. L'adhésion des cellules sur BSA (contrôle) est utilisée comme contrôle négatif et celle sur lumicanne comme contrôle positif. L'adhésion est quantifiée après 2 heures d'incubation comme décrit sur la figure 39. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; NS : non significatif).

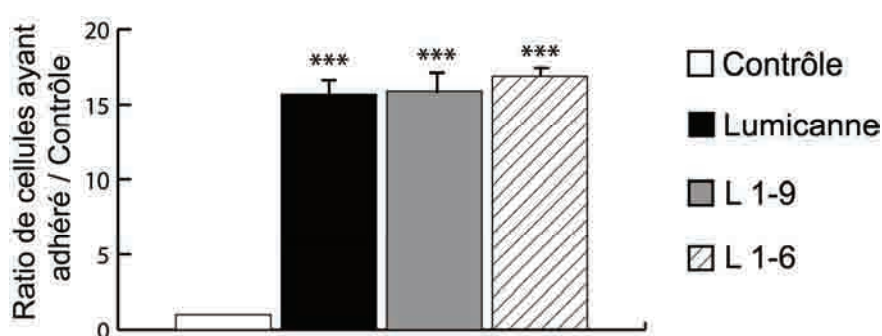


Figure 56 : Effet des fragments L 1-9 et L 1-6 sur l'adhésion des cellules A375. Les cellules (5×10^4 cellules/puit) ont été ensemencées sur une plaque 96 puits recouverte par du lumicanne, les fragments L 1-6 et L 1-9 ou par de la BSA (contrôle). L'adhésion est mesurée après 2 heures d'incubation comme décrit sur la figure 39. (***) $p < 0,001$.

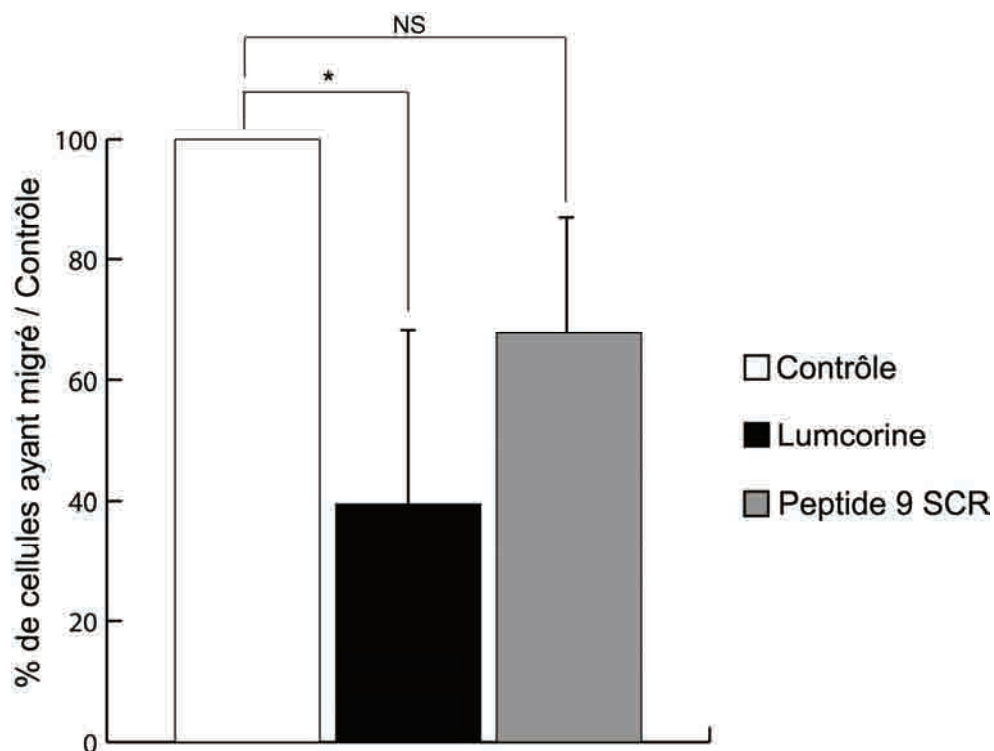


Figure 57 : Effet de lumcorine sur la migration des cellules A375 en présence de collagène. Les cellules (5×10^4 cellules/chambre) ont été pré-incubées pendant 2 heures avec lumcorine ou le peptide scramble (9 SCR) ou sans peptide (contrôle), puis ensemencées sur du collagène de type I dans des chambres de Transwell[®]. La migration est quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (* $p < 0,05$; NS : non significatif).

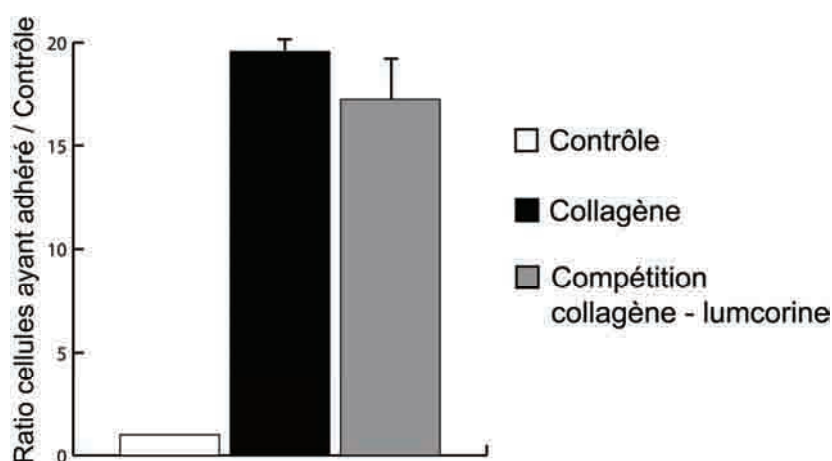


Figure 58 : Effet de lumcorine sur l'adhésion des cellules A375 au collagène. Les cellules ont été pré-incubées avec lumcorine avant d'être ensemencées sur un revêtement de collagène de type I. L'adhésion des cellules sur BSA (contrôle) est utilisée comme contrôle négatif et celle sur collagène comme contrôle positif. L'adhésion est quantifiée après 2 heures d'incubation comme décrit sur la figure 39.

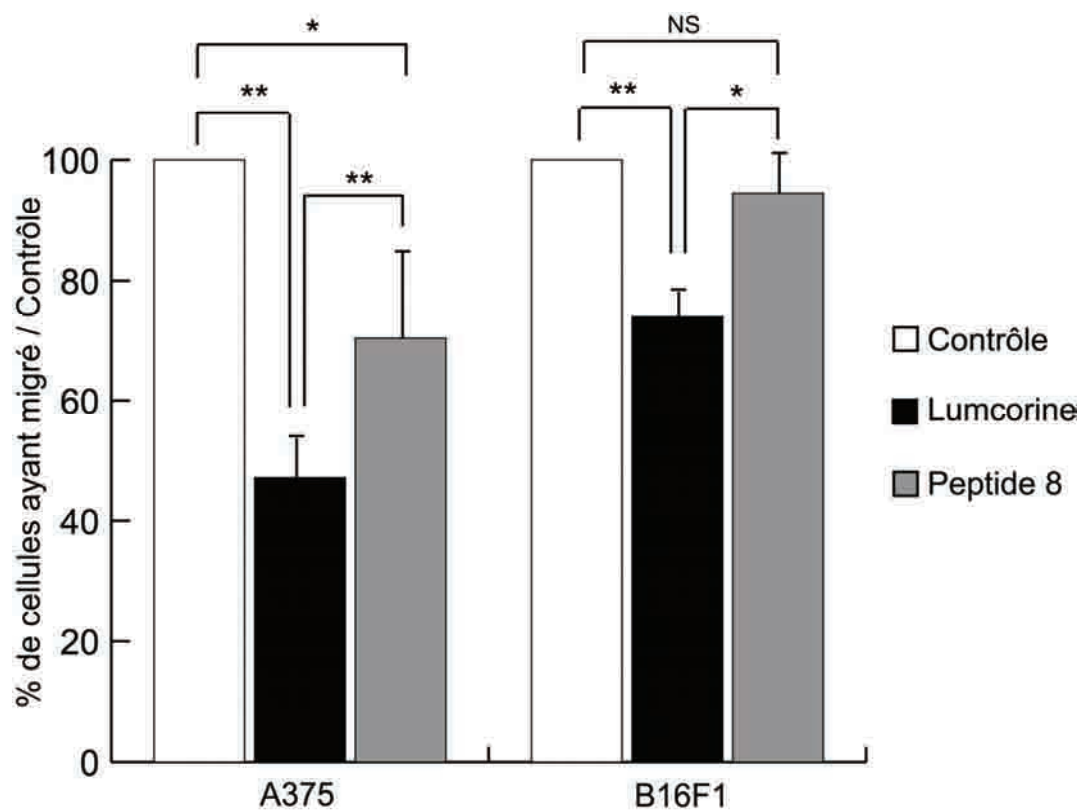


Figure 59 : Effet du peptide 8 sur la migration des cellules A375 et B16F1. Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) ont été pré-incubées pendant 2 heures avec lumcorine ou le peptide 8 (100 μ M) ou sans peptide (contrôle) et ensemencées sur Transwell[®]. La migration a été mesurée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; NS : non significatif).

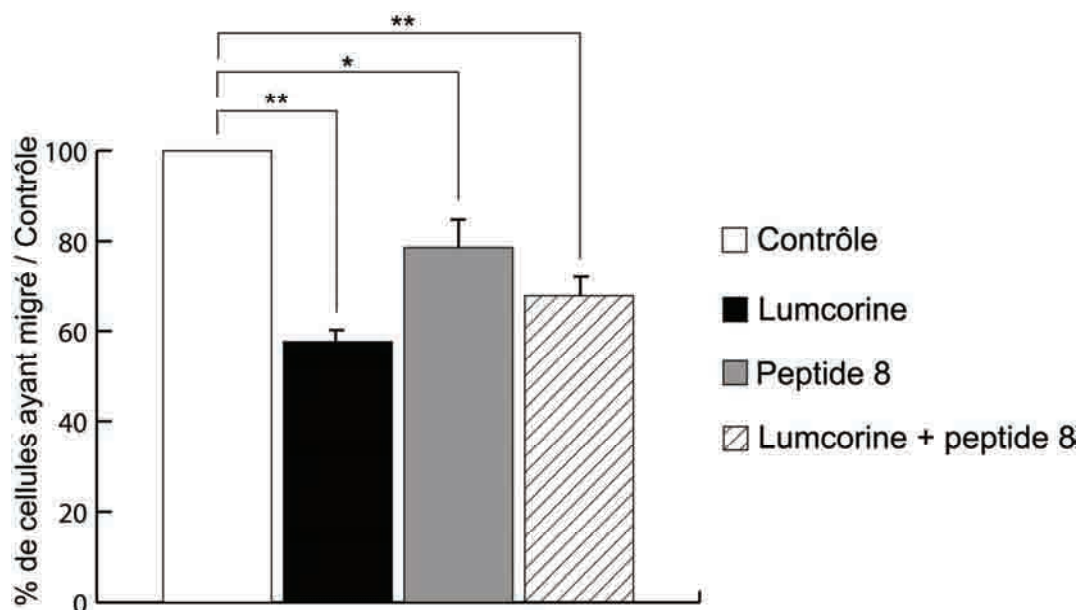


Figure 60 : Effet du mélange lumcorine et peptide 8 sur la migration des cellules A375.

Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) ont été pré-incubées pendant 2 heures avec lumcorine et le peptide 8 (100 μ M), ensemble et séparément, ou sans peptide (contrôle), puis ensemencées sur des membranes de Transwell[®]. La migration a été mesurée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5- Effet de lumcorine sur la phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK

Lumcorine affecte la migration des cellules de mélanome. Ce phénomène implique des modifications intracellulaires, notamment au niveau de la transduction du signal. Nous avons précédemment montré que le lumicanne inhibait significativement la phosphorylation de la tyrosine 397 de la protéine kinase de l'adhésion focale (FAK-pY397). Cette régulation négative de la voie de transduction de pFAK pouvait conduire à l'inhibition du phénotype migratoire des cellules de mélanome (Brézillon et coll. 2009).

Dans le but de déterminer si lumcorine affecte la phosphorylation de FAK, les cellules de mélanome HT144 ont été pré-incubées avec lumcorine. Les protéines sont extraites en présence d'orthovanadate, un inhibiteur des phosphatases de phosphotyrosines. La phosphorylation de FAK en présence de lumcorine en fonction du temps est étudiée par Western immunoblotting et quantifiée via le logiciel Bioprofil (figure 61). Nous observons une baisse de la phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK, après 15 minutes d'incubation des cellules avec lumcorine.

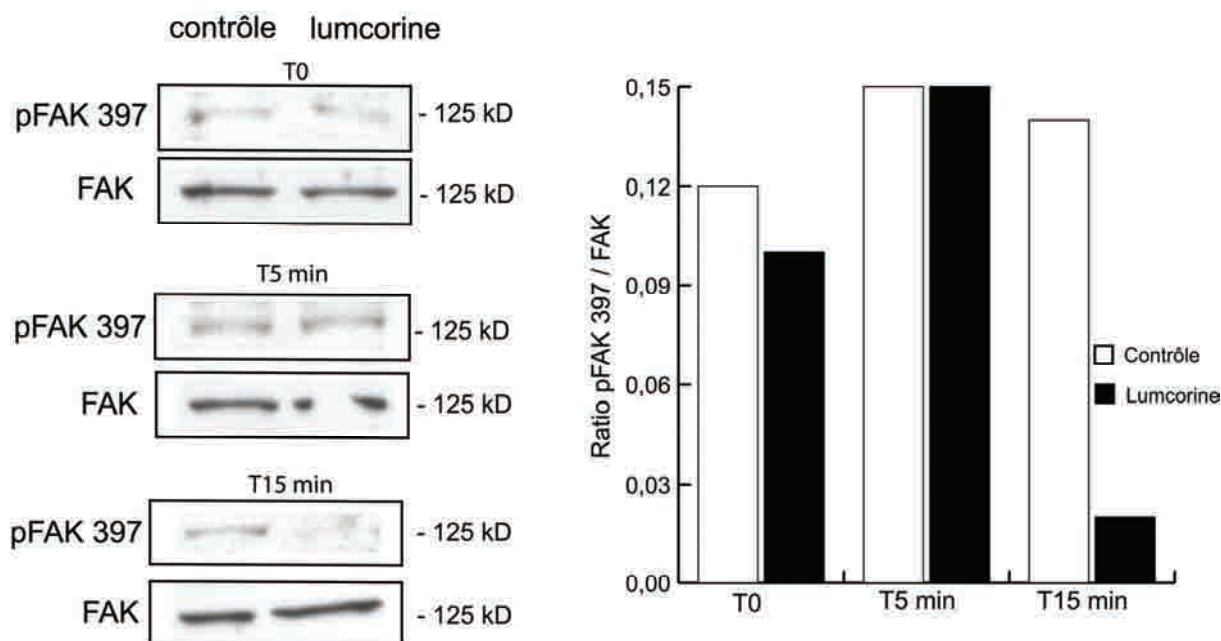


Figure 61 : Analyse de l'effet de lumcorine sur la phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK par Western immunoblotting. Les cellules HT144 sur une plaque 6 puits, ont été mises en contact avec lumcorine pendant 0, 5 et 15 minutes. Les protéines extraites, suite à une électrophorèse sur SDS-PAGE et après un transfert sur membrane, ont été révélées par un anticorps anti-pFAK(Tyr397) et anti-FAK. La quantification a été réalisée avec le logiciel Bioprofil. L'intensité des bandes obtenue pour pFAK 397 est rapportée à celle obtenue pour FAK dans chaque condition.

6- Détermination des acides aminés impliqués dans l'inhibition de la migration par lumcorine et le lumicanne

Lumcorine est un peptide de 17 acides aminés. Nous avons tenté de réduire sa taille afin de préciser le site actif. Pour cela, nous avons synthétisé trois peptides dérivés de lumcorine. La séquence et la localisation des peptides par rapport à lumcorine sont représentées sur la figure 62. Le peptide L9F comprend la partie N-terminale de lumcorine, L9R la partie C-terminale et le peptide L9M correspond à la partie centrale de lumcorine. Ces trois peptides ont été testés sur la migration des cellules A375. Les cellules ont été pré-incubées avec un des trois peptides (100 μ M) avant d'être ensemencées en Transwell[®]. La migration est quantifiée sur 24 heures (figure 63). Les peptides L9F et L9R n'affectent pas la migration des cellules A375, alors que le peptide L9M inhibe significativement la migration de ces cellules (-30 %, $p < 0,01$). Ainsi, la séquence active de lumcorine est contenue dans le peptide L9M de 10 acides aminés.

Afin d'essayer de déterminer le(s) acide(s) aminé(s) impliqué(s), nous avons comparé l'effet de lumcorine à celui d'une séquence dérivée du motif du LRR 9 de la fibromoduline. En effet, les deux séquences diffèrent par seulement quatre acides aminés sur dix-sept (Val257, Lys265, Lys267 et Asp268 du lumicanne). Le peptide FmodLRR9, dérivée du LRR 9 de la fibromoduline, a été synthétisé. En parallèle, le peptide F9M, correspondant à la partie centrale du peptide FmodLRR9, a également été synthétisé. Les séquences des deux peptides sont données dans la figure 62. Le résultat de la migration des cellules A375 en présence de lumcorine ou du peptide FmodLRR9 est présenté sur la figure 64. Lumcorine inhibe la migration des cellules A375 (-30 %, $p < 0,05$), tandis que le peptide dérivé de la fibromoduline n'a aucun effet sur la migration cellulaire. Ainsi les quatre acides aminés correspondant à la Val257, Lys265, Lys267 et Asp268 du lumicanne pourrait être impliquées dans l'effet inhibiteur de lumcorine. Nous avons alors comparé l'effet du peptide L9M, qui comporte uniquement les lysines 265 et 267, par rapport à celui du peptide F9M (figure 65). Le peptide dérivé de la partie centrale du peptide FmodLRR9, F9M, n'affecte pas la migration des cellules A375, contrairement au peptide L9M.

L'ensemble de ces résultats suggèrent l'implication de la lysine 265 et/ou de la lysine 267 dans l'inhibition de la migration cellulaire par lumcorine et le lumicanne.

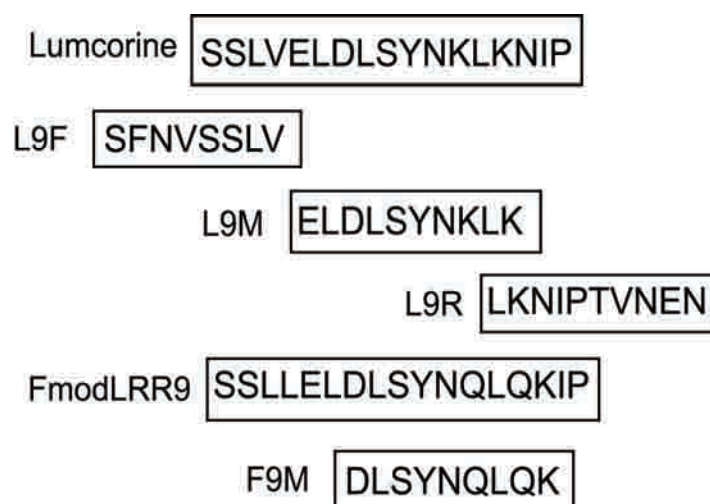


Figure 62 : Séquence des peptides dérivés du LRR 9 du lumicanne et de la fibromoduline. Le peptide L9M est dérivé de lumcorine, alors que les peptides L9F et L9R en sont partiellement dérivés. Les peptides FmodLRR9 et F9M sont dérivés de la fibromoduline humaine.

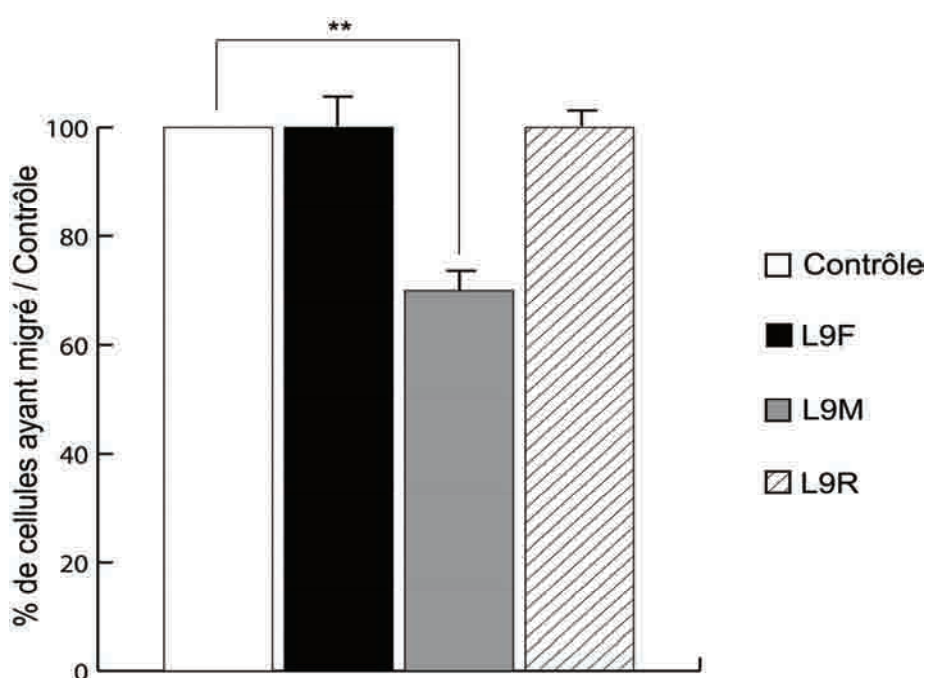


Figure 63 : Effet des peptides dérivés de lumcorine sur la migration des cellules A375. Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) ont été pré-incubées pendant 2 heures avec les peptides L9F, L9M et L9R (100 μ M) ou sans peptide (contrôle), puis ensemencées sur des membranes de Transwell[®]. La migration a été mesurée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (** $p < 0,01$).

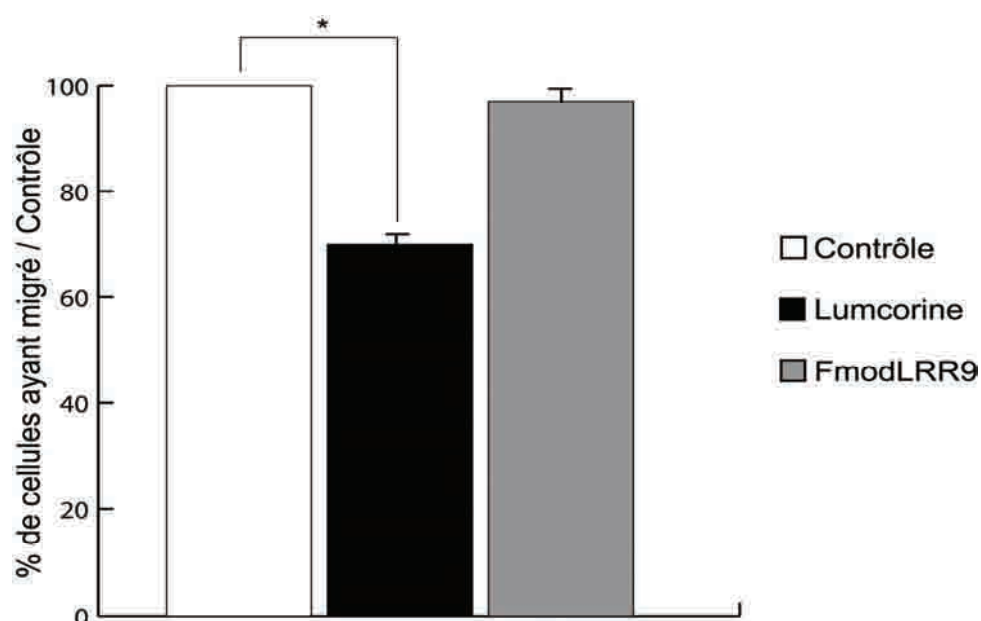


Figure 64 : Comparaison de l'effet entre lumcorine et le peptide dérivé du LRR 9 de la fibromoduline sur la migration des cellules A375. Les cellules (5×10^4 cellules/membrane) ont été pré-incubées pendant 2 heures avec lumcorine ou le peptide FmodLRR9 (100 μ M) ou sans peptide (contrôle), puis ensemencées sur des membranes de Transwell®. La migration a été mesurée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (* $p < 0,05$).

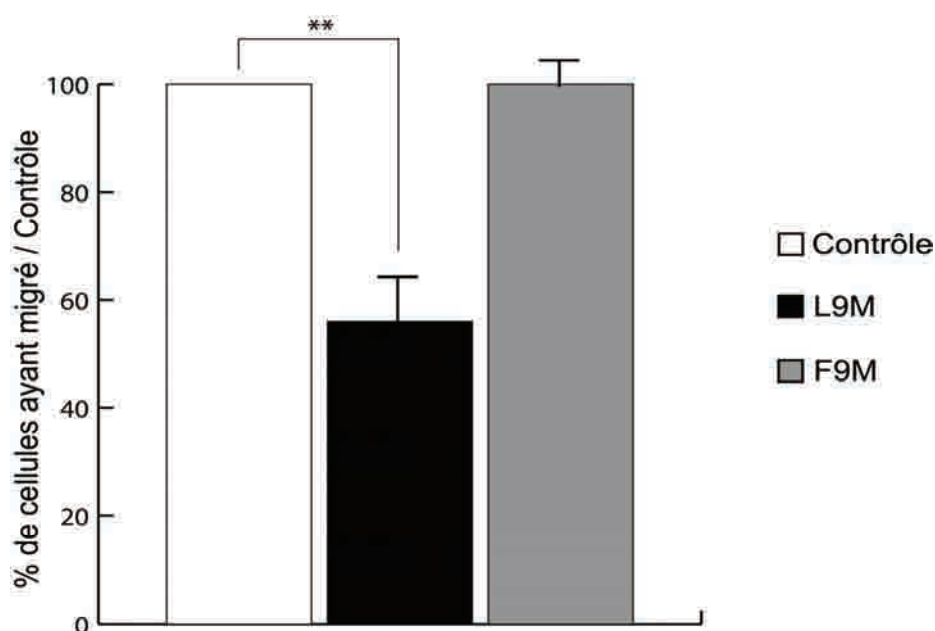


Figure 65 : Comparaison de l'effet entre le peptide L9M et F9M sur la migration des cellules A375. Les cellules (5×10^4 cellules/chambre) ont été pré-incubées avec le peptide L9M ou F9M (100 μ M) ou sans peptide (contrôle), puis ensemencées dans des chambres de Transwell®. La migration a été quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (** $p < 0,01$).

Afin de confirmer l'implication de ces acides aminés, nous les avons mutés en alanine sur la protéine entière de lumicanne. Nous avons ainsi obtenu la construction Hlum (K265A), qui correspond au lumicanne muté sur la lysine 265, et la construction Hlum (K267A), qui correspond au lumicanne muté sur la lysine 267. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir le double mutant Hlum (K265-267A). Nous avons testé l'effet des deux formes mutantes du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome A375, comparé à celui du lumicanne (figure 66). Les deux protéines mutées Hlum (K265A) et Hlum (K267A) inhibent la migration cellulaire à l'instar du lumicanne. Ce résultat suggère que la lysine 265 ou la lysine 267 n'est pas primordiale à l'effet du lumicanne sur la migration cellulaire. Cependant, il est possible que la présence de l'une ou l'autre des lysines puisse suffire à l'effet du lumicanne.

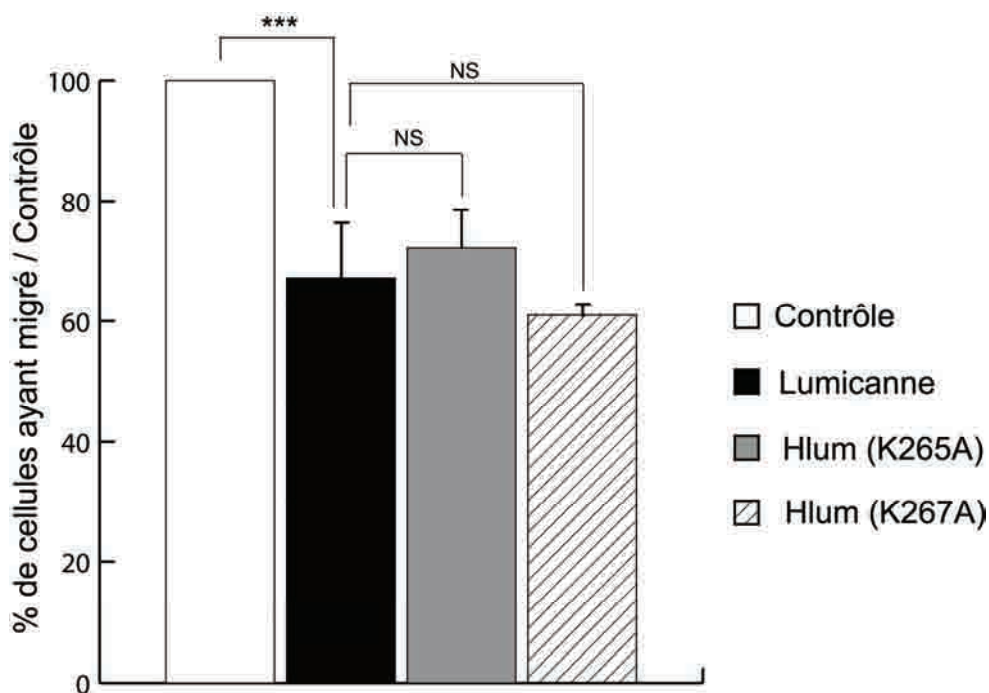


Figure 66 : Effet des formes mutantes du lumicanne sur la migration des cellules A375. Les cellules (5×10^4 cellules/chambre) sont ensemencées sur des membranes de Transwell®, recouvertes par du lumicanne, Hlum (K265A), Hlum (K267A) ou de la BSA (contrôle). La migration est mesurée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (*** $p < 0,001$, NS : non significatif).

CHAPITRE IV : EFFET DU LUMICANNE ET DE LUMCORINE SUR LA MIGRATION DES CELLULES NON TRANSFORMEES

Nous avons montré dans le chapitre III que lumcorine, le peptide dérivé du LRR 9 du lumicanne, reproduisait les effets de la protéine entière de lumicanne en inhibant la migration des cellules de mélanome. Dans ce dernier chapitre, nous avons testé si lumcorine, ainsi que le lumicanne, était capable d'inhiber la migration d'autres types cellulaires et en particulier la migration des cellules non transformées.

1- Effet du lumicanne et de lumcorine sur la migration des fibroblastes dermiques

Les fibroblastes dermiques sont responsables de la synthèse de nombreux composants de la matrice extracellulaire, et participent activement à la cicatrisation tissulaire. Une étude de notre équipe (Brézillon et coll. 2007) a montré que les fibroblastes dermiques secrètent du lumicanne préférentiellement en marge de la tumeur de mélanome. Cette surexpression péri-tumorale du lumicanne suggère un rôle défensif contre la progression des cellules tumorales. Nous avons alors voulu savoir si le lumicanne était également capable d'inhiber la migration des fibroblastes dermiques.

1.1- Effet du lumicanne sur la migration des fibroblastes dermiques

Des chambres de Transwell[®] ont été *coatées* avec du lumicanne (10 µg/chambre). Les fibroblastes dermiques (passage 2) sont ensemencées sur les membranes coatées. La migration est quantifiée sur 24 heures (figure 67). Comparé à la migration des fibroblastes à travers un *coating* de BSA (contrôle), la migration des cellules en présence de lumicanne est significativement inhibée.

1.2- Effet de lumcorine sur la migration des fibroblastes dermiques

L'effet de lumcorine sur la migration des fibroblastes a été observé en vidéomicroscopie. Les cellules ont été ensemencées dans deux chambres mitoyenne composant l'insert Ibidi (voir paragraphe 3.3.2.2 du chapitre méthode). Après adhésion des cellules sur la plaque, l'insert est retiré et lumcorine ou le peptide scramble correspondant (100 µM) est ajouté au milieu de culture. La migration des cellules est réalisée sur 40 heures, une photo étant prise toutes les 30 minutes (vidéo 6 à 8). La migration est ensuite quantifiée

en utilisant un logiciel de suivi du déplacement cellulaire. Pour chaque condition, la trajectoire de 14 cellules est représentée (figure 68A). Dans le contrôle ou en présence du peptide scramble (9 SCR), les cellules referment la « blessure » en 40 heures. En revanche, en présence de lumcorine, la « blessure » ne se referme pas. La mesure de la vitesse de migration a été réalisée sur une moyenne de 28 cellules pour chaque condition (figure 68B). Lumcorine inhibe la vitesse de migration de 30 % par rapport au contrôle.

Ces résultats montrent que le lumicanne et lumcorine sont capables d'inhiber la migration des fibroblastes dermiques.

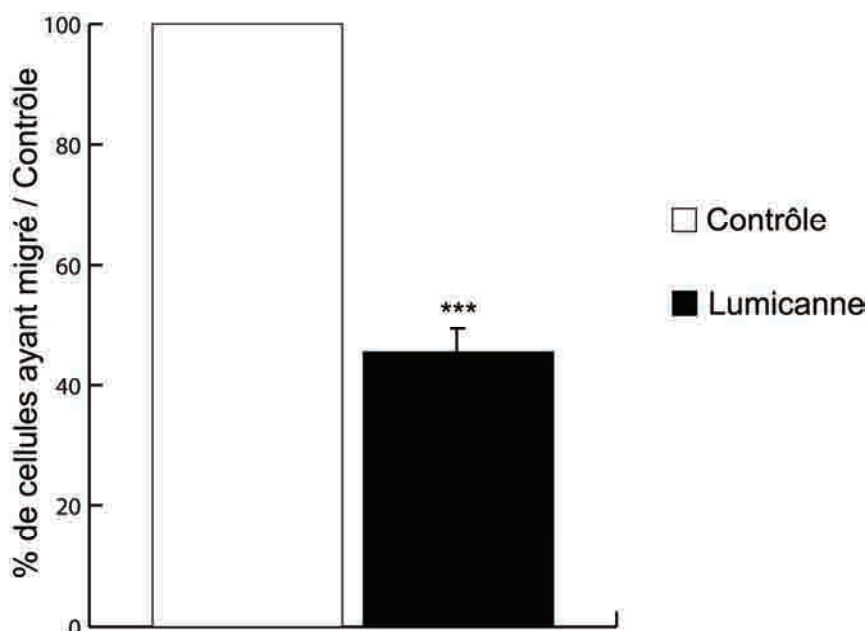


Figure 67 : Effet du lumicanne sur la migration en Transwell[®] des fibroblastes dermiques. Les cellules (5×10^4 cellules/Transwell[®]) ont étéensemencées sur du lumicanne ou de la BSA (contrôle). La migration est quantifiée sur 24 heures comme décrit sur la figure 37. (***) $p < 0,001$.

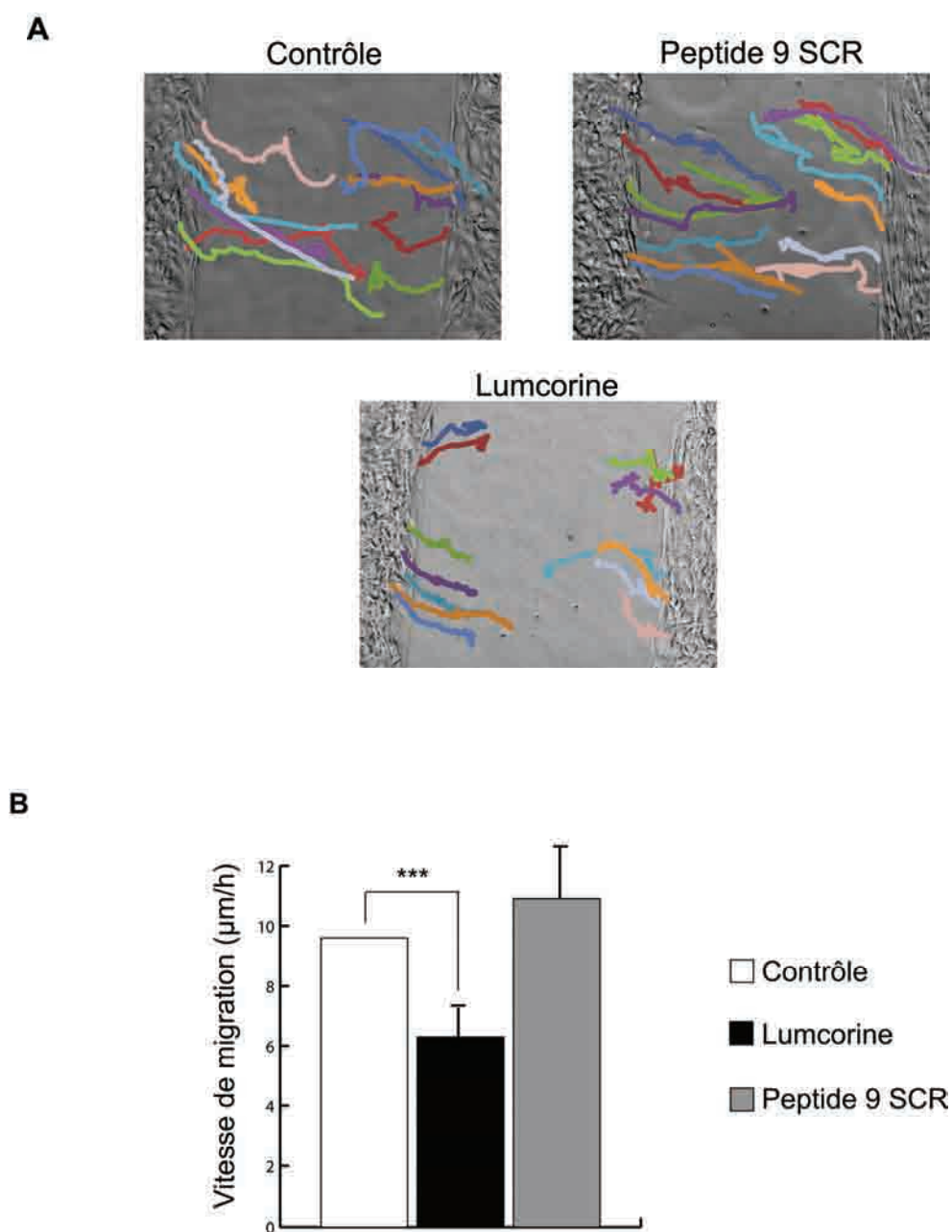


Figure 68 : (A) Trajectoires des fibroblastes au cours de la migration. Les cellules (5×10^4 cellules/chambre d'insert) ont été mises en présence de lumcorine ou du peptide 9 SCR, ou d'aucun peptide (contrôle). La migration sur 40 heures est caractérisée par un logiciel de suivi de la migration. Les trajectoires de 14 cellules sont représentées pour chaque condition sur 40 heures. Les photographies (LUT inverse) montrent l'état de la migration au moment T0 h. **(B) Analyse de la vitesse de migration des fibroblastes dermiques.** La vitesse de migration a été quantifiée sur 40 heures, à partir d'une moyenne de 28 cellules par condition grâce à un logiciel de suivi. (***) $p < 0,001$.

2- Effet du lumicanne et de lumcorine sur la migration des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales participent activement à l'angiogenèse, qui est un processus primordial dans la croissance tumorale et les métastases. Il a été décrit que le lumicanne pouvait avoir un rôle inhibiteur dans l'angiogenèse (Albig et coll. 2007). Ainsi, nous avons voulu déterminer si le lumicanne et son peptide dérivé, lumcorine, étaient capable d'inhiber la migration des cellules endothéliales. Lors des différents tests, nous avons utilisé les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC).

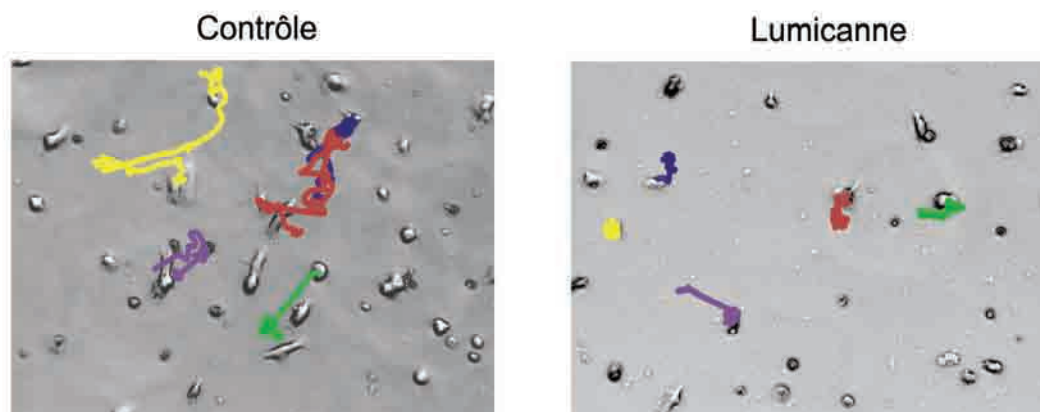
2.1- Effet du lumicanne sur la migration des cellules HUVEC

L'effet du lumicanne sur la migration des cellules HUVEC a été observé en migration aléatoire par vidéomicroscopie. Les puits d'une plaque 12 puits sont recouverts ou non avec du lumicanne (120 µg/puits). La migration est mesurée sur 24 heures, une photographie étant prise toutes les 30 minutes (vidéo 9 et 10). La migration est ensuite quantifiée en utilisant un logiciel de suivi du déplacement cellulaire. La migration des cellules endothéliales sur le lumicanne est caractérisée par des trajectoires courtes et circulaires, comparée aux trajectoires de ces cellules sur plastique (figure 69A). La vitesse de migration des cellules HUVEC sur lumicanne est significativement ralentie (-30 %, $p < 0,01$) par rapport au contrôle (figure 69B).

2.2- Effet de lumcorine sur la migration des cellules HUVEC

La migration a été réalisée comme décrit dans le paragraphe 1.2 de ce chapitre. Les cellules ont été mises en présence de lumcorine, 24 heures après ensemencement des cellules dans chacune des chambres de l'insert. La migration des cellules HUVEC est observée sur 48 heures (vidéo 11 à 13). Nous pouvons remarquer que les cellules ne cherchent pas à combler la blessure réalisée, malgré une migration importante. Ce résultat suggère que ces cellules aient besoin d'avoir un contact intercellulaire permanent. Aucune différence n'est observée dans la migration des cellules HUVEC, en présence ou non de lumcorine. Ainsi, lumcorine n'affecte pas la migration des cellules endothéliales. Cependant, en contact avec lumcorine, les cellules HUVEC montrent une dégénérescence cellulaire moindre, alors que dans le contrôle, les cellules commencent à dégénérer 30 heures après le début du test. Ainsi, il semble que lumcorine augmente la viabilité des cellules endothéliales, en absence de sérum. Cet effet n'est pas retrouvé en présence de lumicanne.

A



B

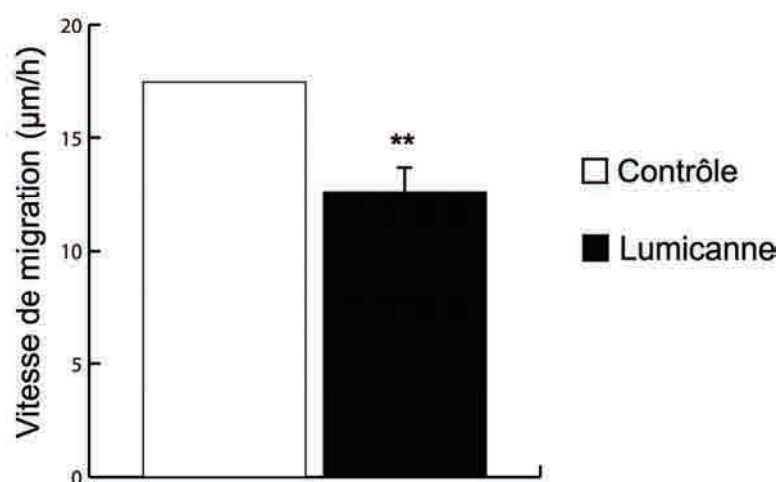


Figure 69 : (A) Trajectoires des cellules HUVEC au cours de la migration sur lumicanne. Les cellules (5×10^3 cellules/puits) ont étéensemencées sur du lumicanne ou sur plastique (contrôle). La migration sur 24 heures est caractérisée par un logiciel de suivi de la migration. Les trajectoires de 5 cellules sont représentées pour chaque condition sur 24 heures. Les photographies (LUT inverse) montrent l'état de la migration au moment T0 h. **(B) Analyse de la vitesse de migration des cellules HUVEC.** La vitesse de migration a été quantifiée sur 24 heures, à partir d'une moyenne de 45 cellules par condition grâce à un logiciel de suivi. (** $p < 0,01$).

3- Effet du lumicanne et de lumcorine sur la migration des cellules souches mésenchymateuse (CSM)

Les cellules CSM sont des cellules souches tissulaires multipotentes qui peuvent donner naissance aux cellules endothéliales. Nous avons vu précédemment que le lumicanne inhibait la migration des cellules endothéliales, mais pas lumcorine. Dans ce paragraphe, nous avons voulu déterminer si ces deux molécules étaient capables d'inhiber la migration des cellules souches mésenchymateuses.

3.1- Effet du lumicanne sur la migration des cellules CSM

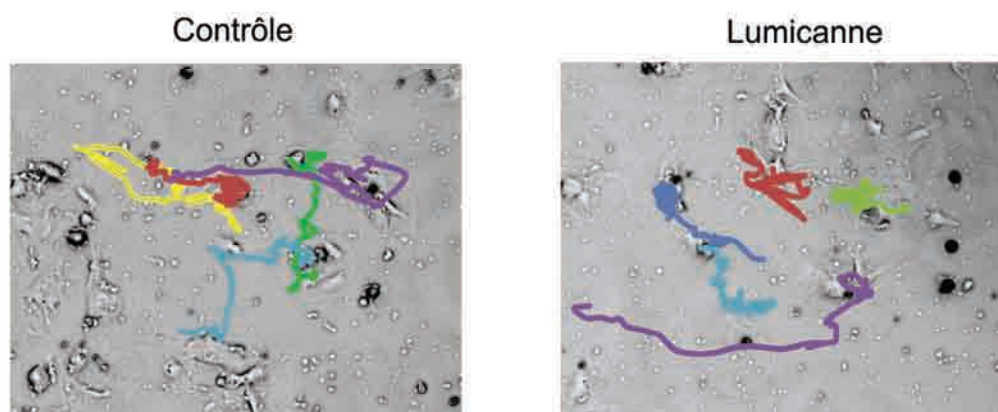
L'effet du lumicanne sur la migration aléatoire des cellules CSM a été observé en vidéomicroscopie. Les cellules ont étéensemencées sur une plaque 12 puits recouverte par du lumicanne. La migration est mesurée sur 48 heures (vidéo 14 et 15). Les trajectoires des cellules CSM sur lumicanne ou sur plastique ne sont pas différentes les unes des autres (figure 70A). Par ailleurs, la vitesse de migration est similaire d'une condition à l'autre (figure 70B).

3.2- Effet de lumcorine sur la migration des cellules CSM

Lumcorine a été additionné au milieu de culture des cellules CSM, après que l'insert Ibidi soit retiré. En parallèle, comme contrôle négatif, nous avons utilisé le peptide scramble (9 SCR). La migration des cellules CSM est observée sur 40 heures (vidéo 16 à 18). De même que pour lumicanne, lumcorine n'a d'effet ni sur les trajectoires (figure 71A), ni sur la vitesse de migration des cellules CSM (figure 71B).

Ainsi, lumicanne et lumcorine sont capables d'inhiber la migration des fibroblastes dermiques, alors que seul le lumicanne inhibe la migration des cellules endothéliales HUVEC, et qu'aucune de ces molécules n'affecte celle des cellules CSM.

A



B

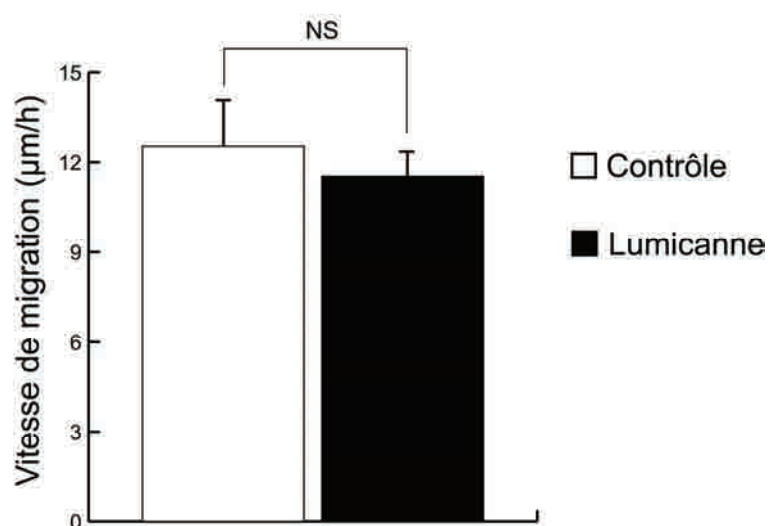


Figure 70 : (A) Trajectoires des cellules CSM au cours de la migration sur lumicanne. Les cellules (5×10^3 cellules/puits) ont étéensemencées sur du lumicanne ou sur plastique (contrôle). La migration sur 24 heures est caractérisée par un logiciel de suivi de la migration. Les trajectoires de 5 cellules sont représentées pour chaque condition sur 24 heures. Les photographies (LUT inverse) montrent l'état de la migration au moment T0 h. **(B) Analyse de la vitesse de migration des cellules CSM.** La vitesse de migration a été quantifiée sur 48 heures, à partir d'une moyenne de 30 cellules par condition grâce à un logiciel de suivi. (NS, non significatif).

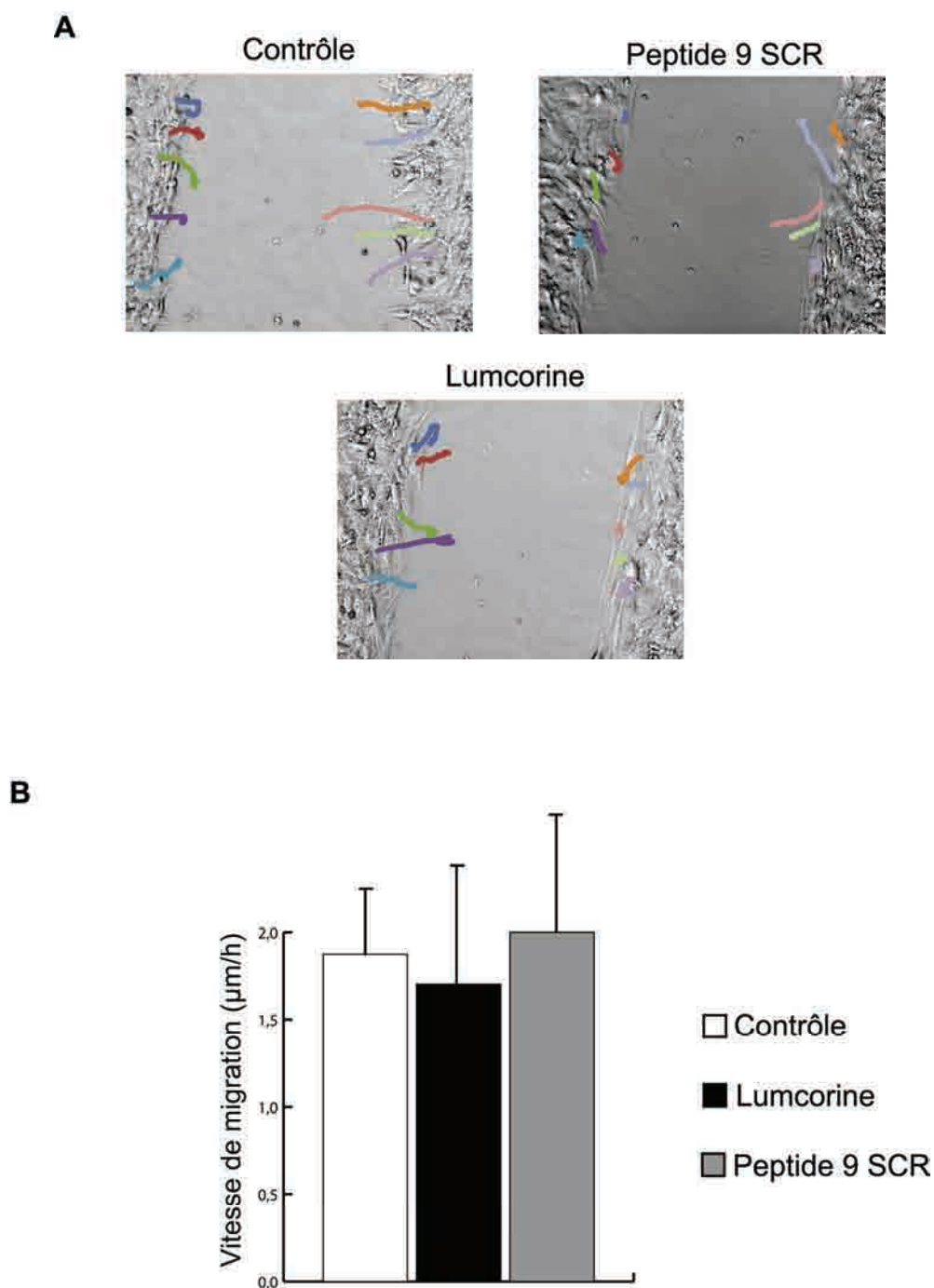


Figure 71 : (A) Trajectoires des cellules CSM au cours de la migration en présence de lumcorine. Les cellules (2×10^4 cellules/chambre d'insert) ont été mises en présence de lumcorine ou du peptide 9 SCR, ou d'aucun peptide (contrôle). La migration sur 40 heures est caractérisée par un logiciel de suivi de la migration. Les trajectoires de 10 cellules sont représentées pour chaque condition sur 40 heures. Les photographies (LUT inverse) montrent l'état de la migration au moment T0 h. **(B) Analyse de la vitesse de migration des CSM.** La vitesse de migration a été quantifiée sur 40 heures, à partir d'une moyenne de 20 cellules par condition grâce à un logiciel de suivi.

Discussion

Le lumicanne est essentiellement investi dans la régulation de la fibrillogenèse du collagène de type I, participant ainsi aux propriétés mécaniques de la peau et permettant également la transparence de la cornée (Chakravarti et coll. 1998). Cependant, dans des conditions pathologiques comme le cancer, le lumicanne présente d'autres rôles et participe activement à ce processus au sein des tissus où il est exprimé. Des études épidémiologiques ont ainsi montré qu'une faible expression du lumicanne dans le cancer du sein est corrélée avec un faible taux de survie (Troup et coll. 2003). De même, dans le cas d'un ostéosarcome, l'expression du lumicanne a été corrélée avec la différenciation des cellules de l'ostéosarcome et non avec la progression de celui-ci (Nikitovic et coll. 2008). En revanche, au niveau du cancer colorectal, où le lumicanne est exprimé par les cellules cancéreuses, une forte expression est corrélée avec un mauvais pronostic de survie (Seya et coll. 2006). Dans le cancer du pancréas, l'agressivité de la tumeur dépend de l'expression du lumicanne par les cellules cancéreuses ou les cellules adjacentes à la tumeur (Ishiwata et coll. 2007). Au sein de notre laboratoire, nous nous sommes intéressés au mélanome, qui est un cancer très agressif au potentiel métastatique élevé, dans le but de comprendre le mode d'action du lumicanne lors d'une pathologie cancéreuse. Le lumicanne diminue la progression du mélanome (Vuillermoz et coll. 2004). Ceci s'explique par une inhibition de la migration des cellules de mélanome. Ces cellules sont capables d'adhérer au lumicanne (D'Onofrio et coll. 2008), ce qui entraîne un remodelage de leur cytosquelette, perturbant ainsi leur migration (Brézillon et coll. 2009).

Au cours des différents chapitres, nous avons mis en évidence les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la migration des cellules par le lumicanne. Lors des tests précédents, nous utilisons la protéine cœur du lumicanne afin de mettre en évidence les effets de cette protéine sur le mélanome. Or, au niveau du derme, le lumicanne est exprimé sous forme glycosylée (Corpuz et coll. 1996). Ainsi, dans le premier chapitre des résultats, nous montrons la production et la purification du lumicanne glycosylé. Nous avons décrit plus haut que l'agressivité d'un cancer pouvait varier selon les cellules exprimant le lumicanne. Une explication est que les modes d'actions du lumicanne peuvent différer selon les différents degrés de glycosylation de cette protéine (Matsuda et coll. 2008). Par ailleurs, l'effet du lumicanne dépend du type cellulaire sur lequel il agit : il promeut la migration des cellules épithéliales de la cornée, qu'il soit sous forme protéoglycane (Seomun et Joo 2008) ou sous forme glycosylée (Yeh et coll. 2005). C'est pourquoi nous avons analysé l'effet du lumicanne

glycosylé sur la migration des cellules de mélanome en le comparant aux effets de la protéine cœur.

L'extraction du lumicanne, sous forme protéoglycane, à partir de cornée est bien décrite (Nakazawa et coll. 1983, Blochberger et coll. 1992). Les charges négatives portées par les groupements sulfates des chaînes de kératane sulfate permettent une purification par chromatographie échangeuse d'ion. Il est plus délicat d'extraire la forme glycosylée du lumicanne à partir d'un tissu. Yeh et coll. (2005) ont purifié le lumicanne sous forme glycoprotéine à partir de membranes amniotiques humaines par chromatographie d'immuno-affinité. Ils ont ainsi obtenu 200 µg de lumicanne par membrane d'une masse de ≈5,75g. Nous avons utilisé la même technique afin de purifier le lumicanne à partir d'un milieu de culture de cellules de fibroblastes de poumons d'embryon humain MRC5. Les cellules MRC5 secrètent le lumicanne de façon importante. La décorine, qui appartient aussi à la famille des SLRP, a déjà été purifié à partir de ces cellules (Honda et Munakata 2004). Nous avons montré que le lumicanne exprimé par les cellules MRC5 avait une taille d'environ 87 kDa et était exprimé sous forme de glycoprotéine portant des chaînes de kératane peu sulfatées. De ce fait il a été difficile d'en obtenir une grande quantité par chromatographie échangeuse d'ion. De plus, par cette méthode de purification, d'autres protéines portant des charges négatives peuvent être éluées en même temps que le lumicanne. Nous avons obtenu de meilleurs résultats en purifiant le lumicanne à l'aide d'anticorps anti-lumicanne couplés à une résine. Cependant, la quantité de lumicanne obtenue est peu importante (0,5 mg de lumicanne/L de milieu de culture).

L'utilisation de cellules HEK-293 transfectées par le gène d'intérêt est devenue courante (Piecha et coll. 2002, Baldi et coll. 2005). Ce type de cellules est facilement transfectable et bien que ce soit des cellules adhérentes, elles peuvent être cultivées en suspension dans des mini-bioréacteurs afin d'augmenter leur rendement (Belin et Rousselle 2006). De plus, les cellules HEK-293 préalablement transfectées avec le gène codant l'antigène nucléaire 1 du virus Epstein Barr (EBNA) vont pouvoir exprimer une quantité plus importante de protéine d'intérêt (Cachianes et coll. 1993). Le choix du vecteur d'expression est également important. Pour profiter du gène EBNA, le vecteur doit posséder une origine de répllication OriP (vecteur pCEP-4). De même, pour faciliter la purification de la protéine d'intérêt, les vecteurs sont pourvus de différents *tags* (6xHis, GST). Le système HEK-293-EBNA et pCEP-4 va permettre une production plus importante associée à une purification facilitée. Lors de nos travaux, nous avons purifié 2,5 mg de lumicanne/L de milieu de culture.

Nous avons ainsi obtenu une quantité de lumicanne cinq fois plus importante que lors de la production par les cellules MRC5. La production du lumicanne par les cellules eucaryotes reste cependant plus faible que celle obtenue par voie bactérienne (10 mg/L), bien que celle-ci ne permet pas de modifications post-traductionnelles comme la glycosylation.

Le lumicanne produit par les cellules HEK-Hlum a une taille d'environ 57 kDa et est dépourvu de chaînes de kératane sulfate. Ce lumicanne possède les mêmes propriétés que la protéine cœur sur l'adhésion et la migration des cellules de mélanome. Ce résultat suggère que les glycosylations portées par le lumicanne n'interfèrent pas dans l'inhibition de la migration des cellules de mélanome. Ainsi, le lumicanne glycosylé secrété dans les tissus serait capable de ralentir la progression des cellules de mélanome. Cependant, nous n'avons pas testé l'effet de la forme protéoglycane du lumicanne sur ces cellules. Bien que dans les tissus sains, autre que la cornée, le lumicanne soit exprimé sous sa forme glycosylée, certaines cellules de mélanome le secrètent sous sa forme protéoglycane (Sifaki et coll. 2006). Les glycosaminoglycannes peuvent avoir des fonctions propres, indépendamment de la protéine cœur. Fiedler et coll. (2008) ont montré que les GAG de la décorine, et non la protéine cœur, modulaient l'activité des cellules endothéliales. Il est alors possible que les chaînes de kératane sulfate du lumicanne possèdent une activité contraire à la protéine cœur, annihilant l'effet inhibiteur sur la migration cellulaire de cette protéine.

Afin d'induire son effet sur les cellules, le lumicanne doit interagir avec un médiateur. Les intégrines, qui sont exprimées à la surface des cellules, sont les principaux récepteurs des molécules de la matrice extracellulaire. Elles ont été décrites comme modulatrices de l'invasion des cellules de mélanome (Tripathi et coll. 1997). Notre équipe avait montré que l'adhésion des cellules de mélanome au lumicanne se fait *via* une intégrine (D'Onofrio et coll. 2008). Par ailleurs, la protéine cœur d'un protéoglycane proche du lumicanne, la décorine, supporte l'adhésion des plaquettes à travers l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ (Guidetti et coll. 2002). Les résultats, présentés dans le chapitre II, indiquent l'implication de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ dans l'inhibition de la migration cellulaire par le lumicanne. L'utilisation de siRNA dirigés contre l'intégrine $\alpha 2$ a permis de démontrer la requête de l'expression de cette intégrine pour l'effet inhibiteur du lumicanne sur la migration des cellules de mélanome. L'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ est augmentée au niveau des mélanomes métastatiques (Moretti et coll. 1993), tandis qu'elle est pratiquement indétectable dans les cellules avec un faible potentiel métastatique (Ziobler et coll. 1999). Ainsi, le lumicanne peut avoir un meilleur effet sur les mélanomes métastatiques, contribuant alors à l'inhibition de la dissémination des

cellules tumorales. Les résultats que nous avons obtenus avec les cellules CHO montrent, d'une part que la présence de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface des cellules est essentielle à l'effet inhibiteur du lumicanne, et d'autre part que cet effet n'est pas uniquement spécifique aux cellules de mélanome. Le lumicanne induit la transcription des gènes codant les sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ et $\beta 1$ au niveau des cellules épithéliales de la cornée (Seomun et Joo 2008). Il aurait été possible que cette induction soit valable pour d'autres types cellulaires comme les cellules de mélanome. Le lumicanne serait alors capable d'induire la synthèse de son propre médiateur. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé au niveau des cellules de mélanome A375 (données non montrées). De plus, cette synthèse est activée par la voie de signalisation des MAP kinases ERK 1,2. Or, une étude préliminaire de notre équipe sur les voies de signalisation des cellules A375 induites par le lumicanne a montré que la voie ERK 1,2 ne semble pas être impliquée dans le modèle utilisé (données non publiées).

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est connue pour être le récepteur du collagène. Cette intégrine présente une meilleure affinité pour les collagènes fibrillaires, tel que le collagène de type I (Nykqvist et coll. 2000). La fixation du collagène sur l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ implique le domaine I de la sous-unité $\alpha 2$ (Käpylä et coll. 2000), domaine qui contient un site d'adhésion dépendant des ions métalliques (MIDAS) (Kim et coll. 2005). Une équipe finlandaise (Tulla et coll. 2008) décrit un K_d de ≈ 36 nM pour la fixation du collagène I au domaine $\alpha 2I$ recombinant. Nous avons obtenu, en collaboration avec la même équipe, un K_d de ≈ 300 nM pour l'interaction lumicanne- $\alpha 2I$ recombinant. Ainsi, comparé au collagène de type I, le lumicanne se fixe au domaine $\alpha 2I$ avec une plus faible affinité. Cependant, le K_d que nous avons obtenu est proche de celui mesuré pour l'interaction entre le collagène I et le domaine $\alpha 1I$ recombinant (≈ 268 nM). L'étude que nous avons menée avec le Pr Eble a montré que l'interaction entre le lumicanne et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ entière était environ deux fois moins importante que l'interaction collagène I-intégrine. Ainsi, le lumicanne fixe l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ entière avec une meilleure affinité que le domaine $\alpha 2I$ seul. De plus l'interaction lumicanne-intégrine $\alpha 2\beta 1$ est indépendante des cations divalents. Nous pouvons noter qu'en présence d'EDTA, nous observons une faible baisse de l'interaction lumicanne-intégrine qui peut-être due au lumicanne fixé au niveau du domaine $\alpha 2I$ de la même intégrine. L'endorépeline, un fragment dérivé du perlécane qui est un protéoglycane de la membrane basale, est capable de se fixer sur l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ et comme le lumicanne, de façon indépendante des cations divalents (Woodall et coll. 2008). Cette interaction conduit à l'inhibition de la migration des cellules endothéliales et à l'inhibition de l'angiogénèse. Le lumicanne peut donc fixer, d'une part,

l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ au niveau du domaine $\alpha 2I$ avec une faible affinité et d'autre part, un autre domaine de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ avec une plus forte affinité et de manière indépendante des cations divalents. Un récepteur au lumicanne avait été mis en évidence à la surface des macrophages, mais sans être identifié (Funderburgh et coll. 1997). Cependant, la forme protéoglycane du lumicanne n'est pas reconnue par ce récepteur, indiquant que les chaînes de kératane sulfate gênent la fixation du lumicanne. Si l'on émet l'hypothèse que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ ne puisse pas interagir avec la forme protéoglycane du lumicanne, alors seul le lumicanne glycosylé ou sa protéine cœur sont capables d'induire l'inhibition de la migration cellulaire. De plus, cela suggérerait que le site responsable de cet effet est proche d'un site susceptible de porter des chaînes de kératane sulfate.

Le lumicanne pourrait également interagir avec le récepteur du facteur de croissance hépatocytaire (HGF), également connu comme le récepteur Met. Ce récepteur est impliqué dans la transformation maligne, l'invasion et les métastases (Danilkovitch-Miagkova et Zbar 2002, Birchmeier et coll. 2003, Knudsen et Vande Woude 2008). Il a été récemment montré que la décorine se fixait avec ce récepteur et entraînait une inhibition de la croissance et de la migration cellulaire médié par Met (Goldoni et coll. 2009). Ce récepteur est exprimé à la surface des cellules de mélanome (Puri et coll. 2007). Ainsi, une partie de l'effet inhibiteur de la migration par le lumicanne pourrait être induit par Met.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus nous ont amené à identifier la séquence du lumicanne impliquée dans l'inhibition de la migration. Nous nous sommes focalisés sur les motifs des répétitions riches en leucine du lumicanne. Dans les SLRP, les sites d'interaction protéine-protéine sont localisés au niveau de la face concave de la molécule. Cette face concave est formée par des brins β parallèles qui sont constitués de la séquence LxxLxLxxNxL des LRR (Kobe et Kajava 2001, McEwan et coll. 2006). L'alignement de séquence des quatre SLRP principaux a montré un pourcentage de similarité élevé en acides aminés, suggérant une conservation du motif LRR 9 au cours de l'évolution. Nous avons fait l'hypothèse que ce motif conservé pouvait jouer un rôle dans la fonction anti-tumorale du lumicanne. Les LRR des SLRP n'ont pas seulement un rôle structural, certains ont également des rôles biologiques comme le LRR 5 de la décorine qui présente des propriétés anti-angiogéniques (Sulochana et coll. 2005). Le peptide issu du LRR 9 du lumicanne montre quant à lui des propriétés anti-tumorales. Nous avons alors proposé le nom de lumcorine pour ce peptide dérivé de la protéine cœur du lumicanne (lumicanne core protéine). Pour notre étude, nous avons sélectionné trois lignées de mélanome : Les cellules

A375 et HT144 issues de mélanomes humains et les cellules de mélanome B16F1 murines. Les cellules A375 et B16F1 n'expriment pas de lumicanne. En revanche, les cellules HT144 expriment l'ARNm du lumicanne (Brézillon et coll. 2007), mais aucune expression de la protéine n'a été détectée par western immunoblotting, ne permettant pas de connaître si et sous quelle forme le lumicanne pourrait être exprimé. Cependant, il n'est pas exclu qu'une faible quantité de lumicanne soit sécrétée par ces cellules et que celui-ci puisse légèrement interférer avec le lumicanne exogène ou lumcorine. Lumcorine affecte la migration des cellules de mélanome sans altérer l'adhésion de ces cellules ni sur le collagène de type I, ni sur le lumicanne. Lumcorine n'entre pas en compétition avec le lumicanne dans les tests d'adhésion cellulaire, suggérant que les sites du lumicanne, responsables de l'adhésion et de l'inhibition de la migration sont distincts. Ceci peut impliquer des récepteurs différents au lumicanne selon le phénomène étudié. Par ailleurs, le fait que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ soit essentielle à l'inhibition de la migration mais qu'elle ne soit pas nécessaire à l'adhésion des cellules CHO au lumicanne, confirme cette hypothèse. Nous pouvons observer que l'adhésion des cellules B16F1 au lumicanne est trois fois plus importante que celle des cellules A375. Les cellules B16F1 auraient alors plus de récepteurs impliqués dans l'adhésion au lumicanne que les cellules A375.

Le collagène de type I est un composant majeur de la matrice extracellulaire. Il promeut l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses (Grzesiak et Bouvet 2006). Le collagène I induit également la transition épithélio-mésenchymateuse, qui est à la base de l'invasivité des cellules cancéreuses (Shintani et coll. 2008-b, Kirkland 2009). Cependant, lumcorine inhibe la migration des cellules de mélanome adhérentes sur un revêtement de collagène I, montrant que la présence de collagène ne compromet pas l'effet inhibiteur de ce peptide. Ce résultat est en accord avec celui précédemment obtenu par notre équipe qui démontre que la présence de collagène n'affecte pas l'effet remodelant du lumicanne sur le cytosquelette des cellules de mélanome (Brézillon et coll. 2009). La séquence de lumcorine est distante du site de fixation du lumicanne au collagène, puisque le premier se situe au niveau du LRR 9 du lumicanne, alors que le second est localisé au niveau du LRR 7 (Kalamajski et Oldberg 2009). Ainsi, l'interaction du collagène de type I avec le lumicanne semblerait ne pas pouvoir interférer avec l'effet inhibiteur de ce dernier. Cette interaction, outre son rôle sur le collagène, pourrait faciliter la disponibilité du lumicanne pour les cellules. Le collagène I ayant le même récepteur que le lumicanne, nous pouvons alors imaginer un complexe ternaire entre ces deux molécules et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$.

Lumcorine montre des différences d'efficacité dans l'inhibition de la migration, comparé au lumicanne, selon les lignées cellulaires. Plus précisément, il diminue la migration des cellules B16F1 et HT144 de seulement 30 %, alors que la protéine cœur de lumicanne inhibe la migration de ces cellules par environ 60 %. D'autres domaines du lumicanne, en particulier les LRR 7 et LRR 8, peuvent être impliqués dans l'inhibition de la migration cellulaire. Les résultats que nous avons obtenus avec le peptide 8 ne permettent cependant pas de confirmer cette hypothèse, au moins en ce qui concerne les cellules B16F1. Par ailleurs, nous ne pouvons pas exclure un effet du peptide 7, car nous n'avons pas pu le tester sur les cellules de mélanome en raison de ses propriétés très hydrophobes. Une autre explication pour l'écart observé pourrait être une différence dans le nombre de récepteurs exprimés par les trois lignées cellulaires. Nous avons décrit plus haut que les cellules B16F1 semblaient avoir plus de récepteur pour l'adhésion au lumicanne que les cellules A375. Précédemment, notre équipe a montré que l'adhésion des cellules de mélanome au lumicanne pouvait empêcher celles-ci de migrer (D'Onofrio et coll. 2008). A l'inverse, les cellules A375 exprimeraient plus de récepteurs pour lumcorine (ou la séquence équivalente présente sur le lumicanne) que les cellules B16F1 et HT144. Le fait que nous obtenons un effet intermédiaire entre le peptide 8 et lumcorine sur les cellules A375 quand les deux peptides sont ajoutés ensemble au milieu de culture, suggère que le peptide 8 et lumcorine interagiraient avec le même récepteur. Ceci serait en accord avec l'hypothèse précédemment formulée puisque le peptide 8 n'a pas d'effet sur les cellules B16F1.

Le lumicanne inhibe la migration cellulaire via la séquence correspondant à lumcorine, mais d'autres mécanismes ne sont pas à négliger, comme la présence d'un domaine d'adhésion qui peut apporter un effet synergique, ou la présence d'autres sites pouvant participer à cette inhibition de la migration tel que le LRR 8.

La progression tumorale peut également être contrôlée par l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses. Le lumicanne a été décrit pour faciliter l'induction du récepteur pro-apoptotique Fas (Vij et coll. 2005). Dans notre modèle d'étude, l'inhibition de la migration du mélanome n'est pas due à un effet pro-apoptotique (donnée non montrée). Cependant, un effet pro-apoptotique à plus long terme, comme dans le cas de la décorine (Goldoni et coll. 2008), ne peut pas être exclu. Au contraire, un rapide réarrangement de l'organisation des filaments d'actine a été observé lorsque les cellules de mélanome se développaient sur du lumicanne (Radwanska et coll. 2008). Des données récentes de notre équipe suggèrent que cette interaction induirait une réorganisation des plaques de l'adhésion focale, conduisant à

l'immobilisation des cellules de mélanome. La protéine FAK (Focal Adhesion Kinase), localisée au niveau des plaques d'adhésion focale et des complexes focaux, contrôle entre autre la dynamique du cytosquelette d'actine. Elle est impliquée dans de nombreux processus tels que la migration cellulaire (Parsons et coll. 2000). Une inhibition de l'expression de FAK dans le mélanome induit une baisse de la migration (Li et coll. 1998). La phosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 dans les cellules de mélanome semble être rapportée à un phénotype agressif (Hess et Hendrix 2006). Il a été décrit que la phosphorylation de la protéine FAK dans les cellules de mélanome est constitutive (Kahana et coll. 2002). Notre équipe a montré que la protéine cœur du lumicanne induisait une diminution de la phosphorylation de la tyrosine 397 de la protéine FAK dans les cellules de mélanome A375 (Brézillon et coll. 2009). Les résultats que nous avons obtenus avec lumcorine sont en accord avec ceux obtenus avec le lumicanne, puisque lumcorine inhibe également la phosphorylation de FAK au niveau de la tyrosine 397, sans altérer l'expression de cette protéine. Cette inhibition peut empêcher le recrutement de la protéine Src, et inhiber le renouvellement des complexes focaux. Or, ce processus est une étape importante, qui permet à la cellule de migrer. Lumcorine et le lumicanne peuvent ainsi inhiber la migration cellulaire en maintenant une adhésion constante de la cellule à son substrat.

La décorine et le biglycane, deux autres membres de la famille des SLRP, ont été décrits à l'instar du lumicanne comme des molécules possédant des activités anti-tumorales. La décorine est capable d'interférer avec les fonctions du récepteur au facteur de croissance épidermique EGF, de provoquer l'apoptose et d'arrêter la croissance tumorale (Seidler et coll. 2006). Le biglycane, quant à lui, a été montré dans sa capacité à stopper le cycle des cellules cancéreuses de pancréas en G1 (Weber et coll. 2001). Il est alors possible que le domaine LRR 9 de ces SLRP puisse également avoir des propriétés anti-tumorales. En particulier, il a été intéressant de comparer les effets de lumcorine à la séquence similaire du LRR 9 de la fibromoduline qui ne diffèrent entre eux que de quatre acides aminés. Le fait que le peptide issu du LRR 9 de la fibromoduline n'affecte pas la migration des cellules de mélanome, nous a permis de déterminer quels acides aminés contenus dans lumcorine pouvaient être importants pour l'inhibition de la migration cellulaire. Ainsi les lysines correspondantes aux lysines 265 et 267 du lumicanne semblent être nécessaires. Les chaînes latérales de ces deux lysines apparaissent à l'extérieur de la protéine cœur du lumicanne d'après le modèle tridimensionnel du lumicanne que nous avons obtenu à partir des données cristallographiques de la décorine et du biglycane. Les deux lysines 265 et 267 apparaissent alors comme de

bonnes candidates pour des interactions protéine-protéine. Cependant nous n'avons pas confirmé la nécessité des deux lysines par mutation de la protéine entière du lumicanne. Le résultat que nous avons obtenu avec les deux formes mutantes suggère que les deux lysines 265 et 267 ne sont pas essentielles. Cependant, il est possible que la présence uniquement d'une des deux lysines est suffisante pour induire l'effet du lumicanne. Il serait intéressant d'obtenir le double mutant lumicanne sur les deux lysines pour confirmer cette hypothèse. De plus, nous avons précédemment observé un effet du LRR 8 sur la migration cellulaire. Celui-ci pourrait contribuer à la régulation de la migration par le lumicanne en absence d'un domaine LRR 9 non fonctionnel.

Les matrikines sont des fragments de protéine issues de la dégradation des molécules de la matrice extracellulaire, dotées d'activités biologiques (Maquart et coll. 2005). Plusieurs publications décrivent la dégradation du lumicanne par les métalloprotéinases matricielles. Li et coll. (2004) ont montré que la MT1-MMP était capable de cliver la protéine cœur du lumicanne, en quatre fragments majeurs. La dégradation du lumicanne par la MT1-MMP compromet l'expression de p21/Waf-1 qui est un inhibiteur de la croissance cellulaire. Ceci peut s'expliquer par le fait que la métalloprotéinase va cliver le lumicanne de part et d'autre des séquences N et C-terminale contenant les cystéines. Or ces cystéines sont essentielles à la structure tridimensionnelle des SLRP. Ainsi la conformation du lumicanne semble primordiale pour exercer son activité. Li et coll. (2004) ont également montré que la digestion du lumicanne par la MMP-2 et la MT3-MMP donnait des fragments similaires à ceux obtenus par la MT1-MMP. La MMP-12, qui est une métalloélastase, dégrade également le lumicanne présent dans le cartilage articulaire, donnant trois peptides dont les séquences n'ont pas été identifiées (Zhen et coll. 2008). L'ADAMTS-4, une agréganase, clive le lumicanne issu de cartilage en deux fragments. En revanche, Zhen et coll. (2008) n'ont pas retrouvé de produit de digestion du lumicanne par les MMP-2, 3, 9 et 13. Cependant, Monfort et coll. (2006) ont décrit une digestion du lumicanne de cartilage articulaire par la MMP-13. Ainsi, Il n'est pas exclu que la dégradation du lumicanne puisse libérer lumcorine qui pourrait être détectée au niveau des tissus et ainsi exercer sa fonction de matrikine dans les tissus.

Nous avons observé que l'effet du lumicanne n'était pas spécifique des cellules de mélanome, puisque cette protéine inhibait également la migration des cellules CHO. Il a été intéressant de connaître l'effet du lumicanne, mais également de lumcorine, sur la migration de cellules normales impliquées dans les processus tumoraux. Les fibroblastes dermiques surexpriment du lumicanne en marge de la tumeur de mélanome, suggérant un rôle défensif

contre la progression des cellules tumorales. Les résultats que nous avons obtenus montrent que le lumicanne et lumcorine sont capables d'inhiber la migration des fibroblastes dermiques. L'inhibition de la migration des fibroblastes qui entourent une tumeur peut permettre d'éviter une délocalisation de ces fibroblastes qui vont ainsi délimiter la tumeur et par ailleurs empêcher le développement de cette tumeur par la surexpression de lumicanne. Le lumicanne inhiberait la migration des fibroblastes également dans le tissu sain. Un autre rôle du lumicanne serait alors de réguler la cicatrisation tissulaire. Hévine, une protéine appartenant à la famille SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein) a été décrite pour réguler la cicatrisation par l'inhibition de la migration des fibroblastes dermiques (Sullivan et coll. 2008). Cette protéine est aussi connu sous le terme de ECM2, SLRP de la classe I. Comme le lumicanne, hévine régule l'assemblage du collagène dermique (Sullivan et coll. 2006) et est capable d'altérer l'adhésion focale (Girard et Springer 1996). Par ailleurs, hévine promeut l'expression de la décorine par les fibroblastes dermiques. Hévine et le lumicanne possèdent des fonctions similaires. Ces deux protéines peuvent intervenir ensemble ou non dans les différentes étapes de la cicatrisation. Ainsi, durant la phase inflammatoire, le recrutement des macrophages va initier et propager la formation d'un nouveau tissu. Hévine pourrait influencer ce processus (Barker et coll. 2005). De même, le lumicanne pourrait réguler cette étape, puisque les macrophages peuvent adhérer sur le lumicanne comme il a été démontré par Funderburgh et coll. (1997). Dans le poumon, l'expression du lumicanne par les fibroblastes est également importante. Le lumicanne pourrait alors en partie prévenir de la fibrose pulmonaire en inhibant la migration de ces fibroblastes.

Nous avons aussi montré que le lumicanne inhibait la migration des cellules endothéliales. Ces cellules sont les premières actrices du processus d'angiogenèse, qui va permettre la survie de la tumeur et l'amorçage de métastases. Albig et coll. (2007) ont démontré que le lumicanne possédait une activité angiostatique. Il diminue significativement l'activation de p38 MAPK en réponse au VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) dans les cellules endothéliales HMEC et inhibe la capacité invasive de ces cellules. La décorine a été décrite comme suppresseur de l'angiogenèse médiée par les cellules tumorales. Elle inhibe la migration des cellules endothéliales en interférant avec la libération de NO induite par le VEGF (Fan et coll. 2008). La séquence responsable de l'inhibition de l'angiogenèse a été localisée au niveau du LRR 5 de la décorine (Sulochana et coll. 2005). A l'inverse du lumicanne, lumcorine n'affecte pas la migration des cellules endothéliales HUVEC. Ce

résultat suggère que le lumicanne possède une séquence angiostatique distincte de la séquence lumcorine et qui affecte uniquement les cellules endothéliales. Par ailleurs, la séquence du lumicanne correspondante à la séquence angiostatique de la décorine n'a également pas d'effet sur les cellules endothéliales (données non montrées). Nous pouvons noter que la protéine hévine, décrite précédemment, affecte les cellules endothéliales (Girard et Springer 1996) et l'angiogenèse (Barker et coll. 2005). Lors de l'étape de régénération tissulaire, la néovascularisation est dépendante de la migration des cellules endothéliales. Ainsi, le lumicanne pourrait aussi réguler cette étape de la cicatrisation tissulaire.

Ni le lumicanne, ni lumcorine sont capables d'inhiber la migration des cellules CSM. Les cellules CSM peuvent en certaines circonstances se différencier en cellules endothéliales (Minguell et coll. 2001). Les CSM, grâce à leur capacité de différenciation, ont un potentiel thérapeutique très intéressant, notamment dans le traitement de tissus endommagés (Steingen et coll. 2008). Dans la plupart des intentions thérapeutiques, l'injection systémique des cellules CSM semble être le mode d'administration le plus utilisé. Cependant, cela implique que les cellules CSM puissent migrer jusqu'au tissu cible (De Becker et coll. 2007). Bien que le lumicanne serait capable de réguler le processus de cicatrisation tissulaire, il n'interviendrait pas dans la reconstruction de tissu par les cellules CSM. Les cellules CSM sont multipotentes alors que les fibroblastes dermiques sont des cellules différenciées et de ce fait, le phénotype de ces deux types cellulaires diffère l'un de l'autre. Ainsi, les cellules indifférenciées seraient moins réceptives au lumicanne que les cellules différenciées.

Les fibroblastes dermiques, les cellules endothéliales HUVEC et les cellules souches mésenchymateuses expriment l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ à la surface cellulaire. Le fait que le lumicanne et lumcorine présentent des comportements différents dans leur effet anti-migratoire selon le type cellulaire, indique que la présence de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est nécessaire, mais n'est pas suffisante pour induire une inhibition de la migration. Ceci induit l'implication d'autres molécules dans la régulation de la migration par le lumicanne.

Conclusions
et
Perspectives

Les principaux SLRP, décorine, biglycane, fibromoduline et lumicanne, sont connus depuis longtemps pour leur régulation de la fibrillogenèse du collagène. Des données récentes montrent que ces molécules sont très actives lors des pathologies cancéreuses. Ainsi, le lumicanne exerce des activités anti-tumorales au sein du mélanome. Notre équipe a précédemment montré que le lumicanne inhibe l'invasion du mélanome, en partie *via* l'adhésion des cellules de mélanome au lumicanne, ce qui entraîne une désorganisation du complexe d'adhésion focale et du cytosquelette d'actine (Vuillermoz et coll. 2004, D'Onofrio et coll. 2008, Brézillon et coll. 2009). Cependant, tous les mécanismes impliqués dans ce phénomène n'ont pas encore été mis à jour.

Dans le premier chapitre, nous avons montré différents systèmes de production et de purification du lumicanne sous forme glycosylé à partir de cellules eucaryotes. A partir des cellules HEK-293 EBNA, nous avons obtenu environ 2,5 mg de lumicanne par litre de milieu de culture, correspondant à 55 fg de lumicanne produit par cellule et par heure. Afin d'augmenter la production de lumicanne, nous pourrions passer à un système de culture en suspension dans un mini-bioréacteur. Nous avons montré que la forme glycosylée possède les mêmes propriétés que la protéine cœur du lumicanne sur les cellules de mélanome. De même, il serait intéressant de tester le lumicanne sous forme protéoglycane et voir quels effets il peut médier. En effet, comme nous l'avons précisé dans la discussion, l'activité du lumicanne peut varier selon son degré de glycosylation.

Lors du deuxième chapitre, nous avons mis en évidence l'implication de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans l'effet anti-migratoire du lumicanne. Ainsi, une extinction de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ annihile l'effet du lumicanne sur la migration cellulaire, alors qu'une expression *de novo* de cette même sous-unité va permettre au lumicanne d'inhiber la migration. Nous avons alors montré pour la première fois une interaction directe entre le lumicanne et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. Il semble que le lumicanne puisse interagir au moins au niveau de deux sites sur cette intégrine : il peut se fixer sur le domaine $\alpha 2I$ avec une faible affinité et sur un autre domaine avec une plus forte affinité et de manière indépendante des cations divalents. Nous envisageons de compléter ces données en déterminant lequel des deux sites de fixation du lumicanne sur l'intégrine pourrait être impliqué dans l'inhibition de la migration cellulaire. Par ailleurs, des études sur le *docking* entre le lumicanne et l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ peuvent être menées. La structure tri-dimensionnelle de l'intégrine a déjà été obtenue (Emsley

et coll. 2004) et nous avons réalisé celle du lumicanne par homologie avec la structure cristallographique de la décorine et du biglycane. Cette étude permettrait de déduire les acides aminés pouvant être impliqués dans l'interaction du lumicanne et de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$.

Au cours de la troisième partie de notre étude, nous avons caractérisé une séquence active du lumicanne responsable de l'inhibition de la migration des cellules de mélanome. Par différents fragments et peptides dérivés du lumicanne, nous avons localisé une séquence active au sein du LRR 9 du lumicanne. Nous avons alors proposé le nom de lumcorin (lumicanne core protéine) pour le peptide dérivé de cette séquence. Lumcorin est capable d'inhiber la migration de trois lignées de mélanome A375, HT144 et B16F1, sans altérer l'adhésion de ces cellules à leur support. Nous avons par ailleurs démontré que le site d'adhésion du lumicanne est distinct du site inhibiteur de la migration. Nous prévoyons également de localiser le site responsable de l'adhésion des cellules au lumicanne. Pour cela, d'autres fragments dérivés du lumicanne sont en cours de production. Les tests que nous avons menés avec lumcorin ont été réalisés *in vitro*. Nous avons l'intention de poursuivre ces études *in vivo* chez la souris et voir si lumcorin est capable de diminuer la progression tumorale *in situ* et la formation de métastases. Nous serons peut-être amenés à cycliser le peptide afin d'augmenter sa durée de vie à l'intérieur d'un organisme. Une étude sur la structure tri-dimensionnelle de lumcorin devra être effectuée en parallèle. Les tests réalisés entre lumcorin et le peptide issu du LRR 9 de la fibromoduline ont permis de déterminer quels acides aminés pouvaient être impliqués dans l'effet de lumcorin. Il serait intéressant de comparer la conformation des deux peptides en RMN (résonance magnétique nucléaire) et en dichroïsme circulaire, afin de savoir si celle-ci est également importante pour induire l'effet de lumcorin. Bien que nous ayons montré que le lumicanne fixait l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, une interaction directe entre lumcorin et cette intégrine reste à démontrer. Dans le but de finaliser notre travail, nous envisageons de vérifier si lumcorin peut être présent physiologiquement dans la circulation sanguine. Pour pouvoir détecter ce peptide, nous pensons développer un test ELISA à partir d'un anticorps anti-lumcorin que nous aurons obtenu chez le lapin. Nous avons montré que lumcorin affectait la phosphorylation de la tyrosine 397 de FAK. Nous prévoyons d'approfondir cette étude sur les voies de signalisation intracellulaires en nous intéressant aux membres Rho, Rac et Cdc42 de la famille des Rho GTPases, qui régulent entièrement le cycle de migration.

Notre étude nous a amené, dans le dernier chapitre, à connaître les effets du lumicanne et de lumcorin sur la migration de cellules normales pouvant avoir un rôle lors de pathologies

tumorales. Ainsi, ces deux molécules sont capables d'inhiber la migration des fibroblastes dermiques. Ce résultat ouvre la possibilité d'une nouvelle étude portant sur la régulation de la cicatrisation par le lumicanne. En revanche, seul le lumicanne inhibe la migration des cellules endothéliales et ni le lumicanne et ni lumcorin n'affecte la migration des cellules souches mésenchymateuses. Nous pourrions également tenter de déterminer le site responsable de l'effet angiostatique du lumicanne. Nous désirons par la suite tester les effets du lumicanne et de lumcorin sur d'autres types cellulaires, notamment sur des cellules issues de différentes tumeurs comme le cancer du sein, du poumon et du colon. De même, nous voudrions savoir si lumcorin mime les effets du lumicanne sur la migration des kératocytes (Seomun et coll. 2008).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'effet du lumicanne et suggère le peptide lumcorin comme nouveau régulateur de la migration cellulaire. La finalité de notre travail sera l'utilisation de lumcorin comme agent anticancéreux.

Références
Bibliographiques

Albig AR, Roy TG, Becenti DJ, Schiemann WP.

Transcriptome analysis of endothelial 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: 197-216.

Alexopoulou AN, Multhaupt HA, Couchman JR.

Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology.

Int J Biochem Cell Biol 2007; 39: 505-28.

Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE.

A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis.

J Cell Biol 1998; 141: 1147-57.

Araki K, Wakabayashi H, Shintani K, Morikawa J, Matsumine A, Kusuzaki K, Sudo A, Uchida A.

Decorin suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line.

Oncology 2009; 77: 92-9.

Baldi L, Muller N, Picasso S, Jacquet R, Girard P, Thanh HP, Derow E, Wurm FM.

Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: application to large-scale protein production.

Biotechnol Prog 2005; 21: 148-53.

Barker TH, Framson P, Puolakkainen PA, Reed M, Funk SE, Sage EH.

Matricellular homologs in the foreign body response: hevin suppresses inflammation, but hevin and SPARC together diminish angiogenesis.

Am J Pathol 2005; 166: 923-33.

Bataille V, de Vries E.

Melanoma--Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention.

BMJ 2008; 337: a2249.

Belin V, Rousselle P.

Production of a recombinantly expressed laminin fragment by HEK293-EBNA cells cultured in suspension in a dialysis-based bioreactor.

Protein Expr Purif 2006; 48: 43-8.

Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA.

Treatment of metastatic melanoma: an overview.

Oncology (Williston Park) 2009; 23: 488-96.

Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF.

Met, metastasis, motility and more.

Nat Rev Mol Cell Biol 2003; 4: 915-25.

Blochberger TC, Cornuet PK, Hassell JR.

Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated.
J Biol Chem 1992; 267: 20613-9.

Boulais N, Misery L.

The epidermis : a sensory tissue.
Eur J Dermatol 2008; 18: 119-27.

Bradford MM.

A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem 1976; 72: 248-54.

Bredrup C, Knappskog PM, Majewski J, Rødahl E, Boman H.

Congenital stromal dystrophy of the cornea caused by a mutation in the decorin gene.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46: 420-6.

Breslow A.

Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma.
Ann Surg 1970; 172: 902-8.

Brézillon S, Venteo L, Ramont L, D'Onofrio M.F, 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: 405-16.

Brézillon S, Radwanska A, Zeltz C, Malkowski A, Ploton D, Bobichon H, Perreau C, Malicka-Blaszkiewicz M, Maquart F.X, Wegrowski Y.

Lumican core protein inhibits melanoma cell migration via alterations of focal adhesion complexes.
Cancer Lett 2009-a; 283: 92-100.

Brézillon S, Zeltz C, Schneider L, Terry C, Vuillermoz B, Ramont L, Perreau C, Pluot M, Diebold MD, Radwanska A, Malicka-blaszkiewicz M, Maquart FX, Wegrowski Y.

Lumican inhibits B16F1 melanoma cell lung metastasis.
J Physiol Pharmacol 2009-b; 60 suppl4: xxx-xxx.

Cachianes G, Ho C, Weber RF, Williams SR, Goeddel DV, Leung DW.

Epstein-Barr virus-derived vectors for transient and stable expression of recombinant proteins.
Biotechniques 1993; 15: 255-9.

Ceroni A, Dell A, Haslam SM.

The GlycanBuilder: a fast, intuitive and flexible software tool for building and displaying glycan structures.

Source Code Biol Med 2007; 2: 3.

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: 481-8.

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: 1277-86.

Chamberlain A, Ng J.

Cutaneous melanoma--atypical variants and presentations.

Aust Fam Physician 2009; 38: 476-82.

Cho E, Rosner BA, Colditz GA.

Risk factors for melanoma by body site.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005; 14: 1241-4.

Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC.

The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.

Cancer Res 1969; 29: 705-27.

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: 9759-63.

Corsi A, Xu T, Chen XD, Boyde A, Liang J, Mankani M, Sommer B, Iozzo RV, Eichstetter I, Robey PG, Bianco P, Young MF.

Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues.

J Bone Miner Res 2002; 17: 1180-9.

Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ.

Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy.

Phys Ther 1999; 79: 308-19.

Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B.

Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors.
J Clin Invest 2002; 109: 863-7.

De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, Van Riet I.

Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3.

Haematologica 2007; 92: 440-9.

Demoor-Fossard M, Redini F, Boittin M, Pujol JP.

Expression of decorin and biglycan by rabbit articular chondrocytes. Effects of cytokines and phenotypic modulation.

Biochim Biophys Acta 1998; 1398: 179-91.

de Vries E, Nijsten TE, Visser O, Bastiaannet E, van Hattem S, Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW.

Superior survival of females among 10,538 Dutch melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site.

Ann Oncol 2008; 19: 583-9.

Dodge GR, Diaz A, Sanz-Rodriguez C, Reginato AM, Jimenez SA.

Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha on the expression of the genes encoding aggrecan, biglycan, and decorin core proteins in cultured human chondrocytes.

Arthritis Rheum 1998; 41: 274-83.

Dolhnikoff M, Morin J, Roughley PJ, Ludwig MS.

Expression of lumican in human lungs.

Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 19: 582-7.

D'Onofrio MF, Brézillon S, Baranek T, Perreau C, Roughley PJ, Maquart FX, Wegrowski Y.

Identification of beta-1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican. Biochem. Biophys. Res Commun 2008; 365: 266-72.

Duca L, Floquet N, Alix AJP, Haye B, Debelle L.

Elastin as matrikine.

Crit Rev Oncol Hematol 2004; 49: 235-44.

Eble JA, Beermann B, Hinz HJ, Schmidt-Hederich A.

Alpha 2beta 1 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: 12274-84.

Edwards IJ, Xu H, Wright MJ, Wagner WD.

Interleukin-1 upregulates decorin production by arterial smooth muscle cells.
Arterioscler Thromb 1994; 14: 1032-9.

Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ.

Structure of the integrin alpha2beta1-binding collagen peptide.
J Mol Biol 2004; 335: 1019-28.

Etienne-Manneville S, Hall A.

Rho GTPases in cell biology.
Nature 2002 Dec; 420: 629-35.

Etienne-Manneville S.

Polarity proteins in migration and invasion.
Oncogene 2008; 27: 6970-80.

Faix J, Breitsprecher D, Stradal TE, Rottner K.

Filopodia: Complex models for simple rods.
Int J Biochem Cell Biol 2009; 41: 1656-64.

Fan H, Sulochana KN, Chong YS, Ge R.

Decorin derived antiangiogenic peptide LRR5 inhibits endothelial cell migration by interfering with VEGF-stimulated NO release.
Int J Biochem Cell Biol 2008; 40: 2120-8.

Fiedler LR, Schönherr E, Waddington R, Niland S, Seidler DG, Aeschlimann D, Eble JA.

Decorin regulates endothelial cell motility on collagen I through activation of insulin-like growth factor I receptor and modulation of alpha2beta1 integrin activity.
J Biol Chem 2008; 283: 17406-15.

Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Conrad GW.

Arterial lumican. Properties of a corneal-type keratan sulfate proteoglycan from bovine aorta.
J Biol Chem 1991; 266: 24773-7.

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: 1159-67.

Funderburgh JL.

Keratan sulfate : structure, biosynthesis, and function.
Glycobiology 2000; 10: 951-58.

- Funderburgh JL, Funderburgh ML, Mann MM, Corpuz L, Roth MR.**
Proteoglycan expression during transforming growth factor beta -induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation.
J Biol Chem 2001; 276: 44173-8.
- Gandhi N.S, Mancera R.L.**
The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins.
Chem Biol Drug Des 2008; 72: 455-82.
- Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF.**
Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi.
Eur J Cancer 2005; 41: 28-44.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T.**
Collagens – structure, function and biosynthesis.
Adv Drug Deliv Rev 2003; 3: 305-17.
- Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ.**
SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases.
Matrix Biol 2006; 25: 484-91.
- Gilbert SF.**
The morphogenesis of evolutionary developmental biology.
Int J Dev Biol 2003; 47: 467-77.
- Girard JP, Springer TA.**
Modulation of endothelial cell adhesion by hevin, an acidic protein associated with high endothelial venules.
J Biol Chem 1996; 271: 4511-7.
- Goldoni S, Iozzo RV.**
Tumor microenvironment: Modulation by decorin and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs.
Int J Cancer 2008; 123: 2473-9.
- Goldoni S, Seidler DG, Heath J, Fassan M, Baffa R, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV.**
An antimetastatic role for decorin in breast cancer.
Am J Pathol 2008; 173: 844-55.
- Goldoni S, Humphries A, Nyström A, Sattar S, Owens RT, McQuillan DJ, Ireton K, Iozzo RV.**
Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor.
J Cell Biol 2009; 185: 743-54.

Grange F.

Epidemiology of cutaneous melanoma: descriptive data in France and Europe.
Ann Dermatol Venereol 2005; 132: 975-82.

Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV.

Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis.
Oncogene 2002; 21: 4765-77.

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: 21942-9.

Grover J, Liu CY, Kao WW, Roughley PJ.

Analysis of the human lumican gene promoter.
J Biol Chem 2000; 275: 40967-73.

Grzesiak JJ, Bouvet M.

The alpha2beta1 integrin mediates the malignant phenotype on type I collagen in pancreatic cancer cell lines.
Br J Cancer 2006; 94: 1311-9.

Guerriero E, Chen J, Sado Y, Mohan RR, Wilson SE, Funderburgh JL, Sundarraj N.

Loss of alpha3(IV) collagen expression associated with corneal keratocyte activation.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2007; 48: 627-35.

Guex N and Peitsch MC.

SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling.
Electrophoresis 1997; 18: 2714-23.

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: 1707-14.

Haase HR, Clarkson RW, Waters MJ, Bartold PM.

Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan synthesis by human periodontal fibroblasts.
J Cell Physiol 1998; 174: 353-61.

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: 3705-9.

Hassell JR, Rada J, Cornuet P, Vergnes JP, Kinchington PR.
Gene structure of chick lumican and identification of the first exon.
Biochim Biophys Acta 1998; 1397: 119-25.

Heegaard AM, Corsi A, Danielsen CC, Nielsen KL, Jorgensen HL, Riminucci M, Young MF, Bianco P.
Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice.
Circulation 2007; 115: 2731-8.

Heimer R, Bashey RI, Kyle J, Jimenez SA.
TGF-beta modulates the synthesis of proteoglycans by myocardial fibroblasts in culture.
J Mol Cell Cardiol 1995; 27: 2191-8

Hess AR, Hendrix MJ.
Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype.
Cell Cycle 2006; 5: 478-80.

Hildebrand A, Romarís M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E.
Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta.
Biochem J 1994; 302: 527-34.

Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ.
Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix.
Matrix Biol 1998; 17: 1-19.

Honda E, Munakata H.
Purification and characterization of decorin from the culture media of MRC-5 cells.
Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 1635-44.

Hornebeck W, Maquart FX.
Proteolysed matrix as a template for the regulation of tumor progression.
Biomed Pharmacother 2003; 57: 223-30.

Humphries MJ.
Cell substrate adhesion assays.
In *Current Protocols in Cell Biology* 2003; 9.1.1-9.1.11. (John Wiley and Sons, inc.).

Iozzo RV.
Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.
Annu Rev Biochem 1998; 67: 609-52.

Iozzo RV.

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

J Biol Chem 1999; 274: 18843-6.

Iozzo RV, San Antonio JD.

Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena.

J Clin Invest 2001; 108: 349-55.

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: 537-43.

Kahana O, Micksche M, Witz IP, Yron I.

The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma.

Oncogene 2002; 21: 3969-77.

Kähäri VM, Larjava H, Uitto J.

Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture.

J Biol Chem 1991; 266: 10608-15.

Kalamajski S, Aspberg A, Oldberg A.

The decorin sequence SYIRIADTNIT binds collagen type I.

J Biol Chem 2007; 282: 16062-7.

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: 26740-5.

Kalamajski S, Oldberg A.

Homologous sequence in lumican and fibromodulin LRR 5-7 competes for collagen binding.

J Biol Chem 2009; 284: 534-9.

Käpylä J, Ivaska J, Riikonen R, Nykvist P, Pentikäinen O, Johnson M, Heino J.

Integrin alpha(2)I domain recognizes type I and type IV collagens by different mechanisms.

J Biol Chem 2000; 275: 3348-54.

Käpylä J, Jääliñoja J, Tulla M, Ylöstalo J, Nissinen L, Viitasalo T, Vehviläinen P, Marjomäki V, Nykvist P, Säämänen AM, Farndale RW, Birk DE, Ala-Kokko L, Heino J.

The fibril-associated collagen IX provides a novel mechanism for cell adhesion to cartilaginous matrix.

J Biol Chem 2004; 279: 51677-87.

Kim JK, Xu Y, Xu X, Keene DR, Gurusiddappa S, Liang X, Wary KK, Höök M.
A novel binding site in collagen typeIII for integrins alpha1beta1 and alpha2beta1.
J Biol Chem 2005; 280: 32512-20.

Kirkland SC.

Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells.
Br J Cancer 2009; 101: 320-6.

Knudsen BS, Vande Woude G.

Showering c-MET-dependent cancers with drugs.
Curr Opin Genet Dev 2008; 18: 87-96.

Kobe B, Deisenhofer J.

Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats.
Nature 1993; 366: 751-56.

Kobe B, Kajava AV.

The leucine-rich repeat as a protein recognition motif.
Curr Opin Struct Biol 2001; 11: 725-32.

Kolacna L, Bakesova J, Varga F, Kostakova E, Planka L, Necas A et al.

Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix.
Physiol Res 2007; 56: S51-60.

Kolset SO, Tveit H.

Serglycin--structure and biology.
Cell Mol Life Sci 2008; 65: 1073-85.

Königer J, Giese NA, di Mola FF, Berberat P, Giese T, Esposito I, Bachem MG, Büchler MW, Friess H.

Overexpressed decorin in pancreatic cancer: potential tumor growth inhibition and attenuation of chemotherapeutic action.
Clin Cancer Res 2004; 10: 4776-83.

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: 8237-42.

Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK.

Integrin signaling in malignant melanoma.
Cancer Metastasis Rev 2005; 24: 195-222.

Kurusu S, Takenawa T.

The WASP and WAVE family proteins.
Genome Biol 2009; 10: 226.

Kuroda K, Shinkai H.

Downregulation of decorin expression in dermal fibroblasts by interleukin-4.
Arch Dermatol Res 1997; 289: 476-80.

Laine P, Reunanen N, Ravanti L, Foschi M, Santra M, Iozzo RV, Kähäri VM.

Activation of extracellular signal-regulated protein kinase1,2 results in down-regulation of decorin expression in fibroblasts.
Biochem J 2000; 349: 19-25

Lauffenburger DA, Horwitz AF.

Cell migration: a physically integrated molecular process.
Cell 1996; 84: 359-69.

Lee S, Bowrin K, Hamad AR, Chakravarti S.

Extracellular matrix lumican deposited on the surface of neutrophils promotes migration by binding to beta2 integrin.
J Biol Chem 2009; 284: 23662-9.

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: 1348-52.

Li Y, Aoki T, Mori Y, Ahmad M, Miyamori H, Takino T, Sato H.

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: 7058-64.

Long CJ, Roth MR, Tasheva ES, Funderburgh M, Smit R, Conrad GW, Funderburgh JL.

Fibroblast growth factor-2 promotes keratan sulfate proteoglycan expression by keratocytes in vitro.
J Biol Chem 2000; 275: 13918-23.

Luo BH, Carman CV, Springer TA.

Structural basis of integrin regulation and signaling.
Annu Rev Immuno 2007; 25: 619-47.

Majava M, Bishop PN, Hägg P, Scott PG, Rice A, Inglehearn C, Hammond CJ, Spector TD, Ala-Kokko L, Männikkö M.

Novel mutations in the small leucine-rich repeat protein/proteoglycan (SLRP) genes in high myopia.

Hum Mutat 2007; 28: 336-44.

Maquart FX, Siméon A, Pasco S, Monboisse JC.

Regulation of cell activity by the extracellular matrix : the concept of matrikines.

J Soc Biol 1999; 193: 423-8.

Maquart FX, Bellon G, Pasco S, Monboisse JC.

Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation.

Biochimie 2005; 87: 353-60.

Matsuda Y, Yamamoto T, Kudo M, Kawahara K, Kawamoto M, Nakajima Y, Koizumi K, Nakazawa N, Ishiwata T, Naito Z.

Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.

Int J Oncol 2008; 33: 1177-85.

Mauviel A, Santra M, Chen YQ, Uitto J, Iozzo RV.

Transcriptional regulation of decorin gene expression. Induction by quiescence and repression by tumor necrosis factor-alpha.

J Biol Chem 1995; 270: 11692-700.

McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J.

Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans.

J Struct Biol 2006; 155: 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: 381-90.

Mierke CT.

The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells.

Cell Biochem Biophys 2009; 53: 115-26.

Minguell JJ, Erices A, Conget P.

Mesenchymal stem cells.

Exp Biol Med 2001; 226: 507-20.

- Monfort J**, Tardif G, Reboul P, Mineau F, Roughley P, Pelletier JP, Martel-Pelletier J.
Degradation of small leucine-rich repeat proteoglycans by matrix metalloprotease-13: identification of a new biglycan cleavage site.
Arthritis Res Ther 2006; 8: R26.
- Moretti S**, Martini L, Berti E, Pinzi C, Giannotti B.
Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions.
Melanoma Res 1993; 3: 235-9.
- Nakazawa K**, Newsome DA, Nilsson B, Hascall VC, Hassell JR.
Purification of keratan sulfate proteoglycan from monkey cornea.
J Biol Chem 1983; 258: 6051-5.
- Navarrete Santos A**, Kehlen A, Schütte W, Langner J, Riemann D.
Regulation by transforming growth factor-beta1 of class II mRNA and protein expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis.
Int Immunol 1998; 10: 601-7.
- Nikitovic D**, Berdiaki A, Zafiroopoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN.
Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells.
FEBS J 2008; 275: 350-61.
- Nykvist P**, Tu H, Ivaska J, Käpylä J, Pihlajaniemi T, Heino J.
Distinct recognition of collagen subtypes by alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. Alpha(1)beta(1) mediates cell adhesion to type XIII collagen.
J Biol Chem 2000; 275: 8255-61.
- Ohta K**, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, Tanaka H, Ohnuma S.
Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin.
Dev Cell 2004; 7: 347-58.
- Ohta K**, Kuriyama S, Okafuji T, Gejima R, Ohnuma S, Tanaka H.
Tsukushi cooperates with VG1 to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo.
Development 2006; 133: 3777-86.
- Oldberg A**, Kalamajski S, Salnikov AV, Stuhr L, Mörgelin M, Reed RK, Heldin NE, Rubin K.
Collagen-binding proteoglycan fibromodulin can determine stroma matrix structure and fluid balance in experimental carcinoma.
Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 13966-71.

Parise LV, Lee J, Juliano RL.

New aspects of integrin signaling in cancer.
Semin Cancer Biol 2000; 10: 407-14.

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: 5606-13.

Partanen JI, Nieminen AI, Klefstrom J.

3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc.
Cell Cycle 2009; 8: 716-24.

Pasco S, Han J, Gillery P, Bellon G, Maquart FX, Borel JP et al.

A specific sequence of the noncollagenous domain of the alpha3(IV) chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix métalloprotéinases by tumor cells.
Cancer Res 2000; 60: 467-73.

Pellegata NS, Dieguez-Lucena JL, Joensuu T, Lau S, Montgomery KT, Krahe R, Kivelä T, Kucherlapati R, Forsius H, de la Chapelle A.

Mutations in KERA, encoding keratocan, cause cornea plana.
Nat Genet 2000; 25: 91-5.

Piecha D, Wiberg C, Mörgelin M, Reinhardt DP, Deák F, Maurer P, Paulsson M.

Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins.
Biochem J 2002; 367: 715-21.

Playford MP, Schaller MD.

The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology.
Oncogene 2004; 23: 7928-46.

Praillet C, Grimaud JA, Lortat-Jacob H.

Les protéoglycanes: molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques?
Médecine/Sciences 1998 ; 14 : 412-20.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM.

The skin: an indispensable barrier.
Exp Dermatol 2008; 17: 1063-72.

Prost-Squarcioni C, Heller M, Fraitag S.

Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes.
Ann Dermatol Venereol 2005 ; 132 : 8S5-48.

Prost-Squarcioni C, Heller M, Fraitag S.

Histologie moléculaire de l'épiderme, de la jonction dermo-épidermique, du derme, du tissu conjonctif et des annexes cutanées.

<http://www.histo-moleculaire.com>.

Puri N, Ahmed S, Janamanchi V, Tretiakova M, Zumba O, Krausz T, Jagadeeswaran R, Salgia R.

c-Met is a potentially new therapeutic target for treatment of human melanoma.

Clin Cancer Res 2007; 13: 2246-53.

Pusch CM, Zeitz C, Brandau O, Pesch K, Achatz H, Feil S, Scharfe C, Maurer J, Jacobi FK, Pinckers A, Andreasson S, Hardcastle A, Wissinger B, Berger W, Meindl A.

The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein.

Nat Genet 2000; 26: 324-7.

Radwanska A, Baczynska D, Nowak D, Brézillon S, Popow A, Maquart FX, Wegrowski Y, Malicka-Blaszkiewicz M.

Lumican affects actin cytoskeletal organization in human melanoma A375 cells.

Life Sci 2008; 83: 651-60.

Ramont L, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Deshorgue A, Venteo L, Laronze et al.

The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth.

Mol Cancer Ther 2007; 6: 506-14.

Raouf A, Ganss B, McMahon C, Vary C, Roughley PJ, Seth A.

Lumican is a major proteoglycan component of the bone matrix.

Matrix Biol 2002; 21: 361-7.

Reed CC, Iozzo RV.

The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis.

Glycoconj J 2002; 19: 249-55.

Reed CC, Waterhouse A, Kirby S, Kay P, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV.

Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer.

Oncogene 2005; 24: 1104-10.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR.

Cell migration: integrating signals from front to back.

Science 2003; 302: 1704-9.

Robinet A, Fahem A, Cauchard JH, Huet E, Vincent L, Lorimier S.

Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP.

J Cell Sci 2005; 118: 343-56.

Salomäki HH, Sainio AO, Söderström M, Pakkanen S, Laine J, Järveläinen HT.

Differential expression of decorin by human malignant and benign vascular tumors.

J Histochem Cytochem 2008; 56: 639-46.

Santra M, Reed CC, Iozzo RV.

Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope.

J Biol Chem 2002; 277: 35671-81.

Schaefer L, Iozzo RV.

Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction.

J Biol Chem 2008; 283: 21305-9.

Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ.

Signaling through focal adhesion kinase.

Prog Biophys Mol Biol 1999; 71: 435-78.

Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J.

Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan.

Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101: 15633-8.

Scott PG, Dodd CM, Bergmann EM, Sheehan JK, Bishop PN.

Crystal structure of the biglycan dimer and evidence that dimerization is essential for folding and stability of class I small leucine-rich repeat proteoglycans.

J Biol Chem 2006; 281: 13324-32.

Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV.

Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation.

J Biol Chem 2006; 281: 26408-18.

Seomun Y, Joo CK.

Lumican induces human corneal epithelial cell migration and integrin expression via ERK 1/2 signaling.

Biochem Biophys Res Commun 2008; 372: 221-5.

Seya T, Tanaka N, Shinji S, Yokoi K, Koizumi M, Teranishi N, Yamashita K, Tajiri T, Ishiwata T, Naito Z.

Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis correlates with poor prognosis.

Oncol Rep 2006; 16: 1225-30.

Shintani K, Matsumine A, Kusuzaki K, Morikawa J, Matsubara T, Wakabayashi T, Araki K, Satonaka H, Wakabayashi H, Iino T, Uchida A.

Decorin suppresses lung metastases of murine osteosarcoma.

Oncol Rep 2008-a; 19: 1533-9.

Shintani Y, Maeda M, Chaika N, Johnson KR, Wheelock MJ.

Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling.

Am J Respir Cell Mol Biol 2008-b; 38: 95-104.

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: 606-10.

Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, Bloch W.

Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells.

J Mol Cell Cardiol 2008; 44: 1072-84.

Sullivan MM, Barker TH, Funk SE, Karchin A, Seo NS, Höök M, Sanders J, Starcher B, Wight TN, Puolakkainen P, Sage EH.

Matricellular hevin regulates decorin production and collagen assembly.

J Biol Chem 2006 ; 281: 27621-32.

Sullivan MM, Puolakkainen PA, Barker TH, Funk SE, Sage EH.

Altered tissue repair in hevin-null mice: inhibition of fibroblast migration by a matricellular SPARC homolog.

Wound Repair Regen 2008 ; 16: 310-9.

Sulochana KN, Fan H, Jois S, Subramanian V, Sun F, Kini RM, Ge R.

Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis.

J Biol Chem 2005; 280: 27935-48.

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; 18: 1634-44.

Thomas L.

Epithelial and melanic skin tumors.

Rev Prat 2002; 52: 797-806.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF.

Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling.

Lancet 2009; 374: 362-5.

Timar J, Lapis K, Dudas J, Sebestyen A, Kopper L, Kovalszky I.

Proteoglycans and tumor progression : Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer.

Semin Cancer Biol 2002; 12: 173-86.

Tran KT, Lamb P, Deng JS.

Matrikines and matricryptins: implications for cutaneous cancers and skin repair.

J Dermatol Sci 2005; 40: 11-20.

Trikha M, Timar J, Lundy SK, Szekeres K, Cai Y, Porter AT, Honn KV.

The high affinity alphaIIb beta3 integrin is involved in invasion of human melanoma cells.

Cancer Res 1997; 57: 2522-8.

Troup S, Njue C, Kliewer EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, Roughley PJ, Murphy LC, Watson PH.

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: 207-14.

Tsuji T, Kawada Y, Kai-Murozono M, Komatsu S, Han SA, Takeuchi K, Mizushima H, Miyazaki K, Irimura T.

Regulation of melanoma cell migration and invasion by laminin-5 and alpha3beta1 integrin (VLA-3).

Clin Exp Metastasis 2002; 19: 127-34.

Tufvesson E, Westergren-Thorsson G.

Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha.

J Cell Biochem 2000; 77: 298-309.

Tulla M, Lahti M, Puranen JS, Brandt AM, Käpylä J, Domogatskaya A, Salminen TA, Tryggvason K, Johnson MS, Heino J.

Effects of conformational activation of integrin alpha 1I and alpha 2I domains on selective recognition of laminin and collagen subtypes.

Exp Cell Res 2008; 314: 1734-43.

Tybulewicz VL, Henderson RB.

Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes.
Nat Rev Immunol 2009; 9: 630-44.

Vakonakis I, Campbell ID.

Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure.
Curr Opin Cell Biol 2007; 19: 578-83.

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: 88-97.

Voet D, Voet JG.

Les polysaccharides.
In Biochimie 1998; 258-65 (Paris: DeBoeck Université).

Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'Onofrio MF, 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: 294-306.

Weber CK, Sommer G, Michl P, Fensterer H, Weimer M, Gansauge F, Leder G, Adler G, Gress TM.

Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines.
Gastroenterology 2001; 12: 657-67.

Wiesner S, Legate KR, Fässler R.

Integrin-actin interactions.
Cell Mol Life Sci 2005; 62: 1081-99.

Woodall BP, Nyström A, Iozzo RA, Eble JA, Niland S, Krieg T, Eckes B, Pozzi A, Iozzo RV.

Integrin alpha2beta1 is the required receptor for endorepellin angiostatic activity.
J Biol Chem 2008; 283: 2335-43.

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: 26409-17.

Yeh LK, Chen WL, Li W, Espana EM, Ouyang J, Kawakita T, Kao WW, Tseng SC, Liu CY.
Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing.
Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46: 479-86.

Ying S, Shiraishi A, Kao CW, Converse RL, Funderburgh JL, Swiergiel J, Roth MR, Conrad GW, Kao WW.
Characterization and expression of the mouse lumican gene.
J Biol Chem 1997; 272: 30306-13.

Yung S, Chan TM.
Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities?
Perit Dial Int 2007; Suppl 2: S104-9.

Zahm JM, Kaplan H, Hérard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, Puchelle E.
Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium.
Cell Motil Cytoskeleton 1997; 37: 33-43.

Zhen EY, Brittain IJ, Laska DA, Mitchell PG, Sumer EU, Karsdal MA, Duffin KL.
Characterization of metalloprotease cleavage products of human articular cartilage.
Arthritis Rheum 2008; 58: 2420-31.

Ziober BL, Chen YQ, Ramos DM, Waleh N, Kramer RH.
Expression of the alpha7beta1 laminin receptor suppresses melanoma growth and metastatic potential.
Cell Growth Differ 1999; 10: 479-90.

Annexes

LUMICAN INHIBITS B16F1 MELANOMA CELL LUNG METASTASIS

S. BREZILLON¹, C. ZELTZ¹, L. SCHNEIDER², C. TERRY¹, B. VUILLERMOZ^{1*}, L. RAMONT^{1,3}, C. PERREAU¹, M. PLUOT^{2,3}, M.D. DIEBOLD^{2,3}, A. RADWANSKA⁴, M. MALICKA-BLASKIEWICZ⁴, F-X. MAQUART^{1,3}, Y. WEGROWSKI¹.

¹Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6237, IFR53 Interactions Cellules-Microenvironnement, Faculté de Médecine, Université de Reims-Champagne-Ardenne, 51095 Reims, France.

²Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CNRS UMR 6237, IFR53 Interactions Cellules-Microenvironnement, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51095 Reims Cedex, France.

* present address : iDD Biotech, 62572 Dardilly, France.

³CHU de Reims, 51095 Reims Cedex, France.

⁴Department of Cell Pathology, Faculty of Biotechnology, University of Wroclaw, 51-148 Wroclaw, Poland.

Short title : Lumican inhibits lung metastasis

Address correspondence to: Stéphane Brézillon, Laboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6237, Faculté de Médecine, F51095 Reims cedex, France; Tel. +33-326-913532; Fax. +33-326-918055; E-Mail: stephane.brezillon@univ-reims.fr

Abstract

Background: Lumican is a small leucine-rich proteoglycan (SLRP) of the extracellular matrix (ECM) involved in the control of melanoma growth and invasion [Vuillermoz B et al.; The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp Cell Res* 2004; 296(2): 294-306]. The aim of the present study was to analyse the role of lumican in the regulation of the development of lung metastasis. Methods: B16F1 melanoma cells stably transfected with lumican expressing plasmid (Lum-B16F1) were injected to syngenic mice. The lung metastasis was compared to mice injected with mock-transfected B16F1 cells (Mock-B16F1). The expression of lumican, cyclin D1, apoptotic markers, Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) and Von Willebrand Factor (vWF) within lung metastasis nodules was investigated by immunohistochemistry. In parallel, cells cultured in presence of lumican were assayed for apoptosis and motility. Results: We observed that the number and the size of lung metastasis nodules were significantly decreased in mice injected with Lum-B16F1 cells in comparison to Mock-B16F1 cells. This was associated with an increase of tumour cell apoptosis within metastasis nodules but the cell proliferation rate remained constant in the two mice groups. In contrast, the VEGF immunostaining and the number of blood vessels within the lung metastasis nodules were decreased in the lumican-expressing tumours. *In vitro*, a significant decrease of apoptotic markers in wild type B16F1 cells incubated with increasing amounts of lumican core protein was observed. In addition, pseudotubes formation on Matrigel[®] and the migratory capacity of endothelial cells was inhibited by lumican. Altogether, our results indicate that lumican decreases lung metastasis development not only by inducing tumour cell apoptosis but also by inhibiting angiogenesis.

Keywords: Lung metastasis, melanoma; lumican; proteoglycan, apoptosis, angiogenesis

INTRODUCTION

The family of small leucine-rich proteoglycans SLRPs, which includes decorin, lumican, biglycan and fibromodulin, constitutes an abundant component of the skin extracellular matrix. Lumican, as well as other SLRPs, is involved in collagen fibrillogenesis regulation in the dermis (2, 3) and in the cornea (4). It regulates keratocyte migration (5, 6).

Lumican expression has been reported in many types of cancer (7) including breast carcinoma (8, 9); colorectal (10, 11) and pancreatic cancer (12). It was described in stromal melanoma tissue (13) and melanoma cells (14). Its expression in cancer is believed to be related to a tumour suppressor activity. We previously demonstrated that lumican expression reduced the ability of B16F1 mouse melanoma cells to invade Matrigel[®] *in vitro* and to inhibit primary tumour growth by inducing melanoma cells apoptosis in syngenic mice (1). The melanoma cell migration was decreased on lumican substratum through $\alpha 1$ integrin (15). Moreover, lumican affects cytoskeleton organization in human melanoma A375 cells (16).

Lumican was suggested to be a major component of the ECM proteoglycans in adult human lungs. It was detected as a single component of molecular weight 65 to 90 kD (17). Immunohistochemistry showed that lumican was mainly present in vessel walls. In lung cancer tissues, it was localized in the cytoplasm of cancer cells and/or stromal tissues adjacent to cancer cells (9).

Anti-angiogenic and pro-apoptotic drugs have been developed to inhibit lung cancer progression (18). The *in vivo* anti-cancer effect of these drugs was associated with a decreased microvessel density as well as a reduction of tumour cell proliferation and increased tumour cell apoptosis. In avian embryo model, gene expression profiling of the angiogenic switch in experimental glioma suggested that lumican could be a potential regulator of the invasive process (19). Transcriptome analysis of endothelial cell gene expression identified lumican as a novel regulator of angiogenesis. Lumican was described to inhibit endothelial cell activation

of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), as well as their invasion, angiogenic sprouting, and vessel formation in mice (20).

Since lumican was suggested to be a major component of the proteoglycan matrix in healthy adult human lungs (17), we investigated whether human recombinant lumican was able to decrease the number and the size of lung metastasis and to study the mechanism of its action. Using lumican-expressing B16F1 melanoma cells injected in the tail vein of mice, we demonstrated that lumican decreased the number and the size of lung metastasis nodules by inducing tumour cell apoptosis and inhibited the release of VEGF, therefore decreasing the density of blood vessels in the lung metastasis nodules. *In vitro*, using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), we demonstrated that lumican inhibited endothelial cell tube formation and endothelial cell migration. Therefore, we suggest that lumican might be a powerful and effective anti-tumour agent against melanoma, due to its inhibition of both primary tumour growth and metastatic spreading to the lungs, associated with a pro-apoptotic and angiostatic effect.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Recombinant human lumican core protein was produced as previously described (1). Type I Collagen was prepared from rat tail tendon by extraction with 0.1 M acetic acid (21). Human plasma fibronectin and propidium iodide were obtained from AbCys (Paris, France). Hoechst³³³⁴² was obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Doxorubicin was obtained from Pharmacia and UpJohn (St Quentin en Yvelines, France). Matrigel[®] (ECM gel) was purchased from BD Biosciences (Bedford, MA, USA). VEGF and basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

(The following rabbit polyclonal primary antibodies were used : anti-human actin (A5060, Sigma), anti-human lumican (1); anti-human caspase-3, anti-human cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Anti-human vWF was provided by Millipore (Molsheim, France). Rabbit polyclonal antibody anti-mouse Cyclin D1 (SP4) was obtained from Labvision Westinghouse, CA, USA).

The following mouse monoclonal primary antibody were used: anti-human poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), anti-human cleaved PARP (Cell Signaling Technology), anti-human VEGF (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Mouse isotype control IgG1, κ fraction (MOPC-21) (Sigma[®], Saint-Quentin Fallavier, France).

Cells and Cell Culture

B16F1 cells, a lung metastatic subline of murine B16 melanoma, were kindly provided by Dr M. Gregoire (INSERM UMRS 419, Nantes, France). They were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS). Mock-transfected B16F1 cells (Mock-B16F1, transfected with pcDNA3 vector) and HLum-transfected B16F1 cells (Lum-B16F1, transfected by pcDNA3-HLum construct) were cultured as already described (1). The

pcDNA3-HLum construct used was full length and included the signal peptide of human lumican (GenBank accession number U18728) in the open reading frame as already described (1). HUVEC were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and were cultured in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM PromoCell), supplemented with 0.4 % (w/v) endothelial cell growth supplement/heparin, 5% (v/v) FBS, 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF), 1 µg/ml hydrocortisone, and 50 ng/ml amphotericin B. The medium was supplemented with VEGF or bFGF (15 ng/ml).

Matrigel[®] (BD Biosciences) (10 mg/ml), mixed or not with lumican (10 µg/ml in 18 mM acetic acid), was added to a 24-well plate, (Nunc, Roskilde, Denmark), (300 µl per well). After 30 min of incubation at 37°C, 5×10^4 HUVEC cells were suspended either in a serum free endothelial cell growth medium or in the same medium supplemented with either bFGF (15 ng/ml) or VEGF (15 ng/ml) and then seeded onto the gel. Pseudotube formation was observed after 24h.

Animals

Female C57BL/6 mice 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 one week before starting the experiments. The experiments were conducted according to the recommendations of the Centre National de la Recherche Scientifique. At day 0, 10^5 B16F1 melanoma cells were injected in the tail vein of mice (n=5 for each group). At day 14th, mice were sacrificed and lungs collected for histological examination.

Histological stainings

Mice lung sections (5 µm) were stained with standard Hematoxyline Phloxin Safran solution (HPS). Masson's Trichrome staining was also performed to visualize collagen fibres and blood vessels.

Immunohistochemistry

Tissue samples were fixed with 4% fresh paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 at 4°C overnight. Serial sections (5 µm) of paraffin-embedded samples were processed for immunohistochemical studies as already described (1). After deparaffinisation, the sections were treated with 0.3% H₂O₂ for 10 min at room temperature to block endogenous peroxidase. The slides were heated in a pressure cooking in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0), then washed in PBS and incubated with normal serum from the Vectastain® Universal Quick kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 20 min at room temperature to block non specific binding. Then, the sections were incubated with the indicated primary antibodies at 4°C overnight. After washing with PBS, the slides were treated for 1 h at room temperature with the secondary antibody, either goat anti-rabbit (Vector Laboratories) or goat anti-mouse immunoglobulin (Vector Laboratories), depending on the primary antibody used. All secondary antibodies were peroxidase-labelled and stained with 3-amino-9-ethylcarbazole (Vector Laboratories). Counterstaining was performed with Harris hematoxyline.

Western immunoblotting

Increasing concentrations of human lumican core protein, (0, 10, 50 µg/ml), were added to the B16F1 cell culture medium for sixteen hours. Cells were harvested by scrapping and

subjected to protein extraction as already described (1). The protein concentration was determined by Bradford method (22). Following electrophoresis, proteins were transferred from polyacrylamide gels to nitrocellulose by electroblotting. 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 2h. After washing, the membranes were incubated with primary antibodies at a final dilution of 1:1000 overnight at 4°C. The membranes were washed with TBS-T and probed with a 1:10000 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. After washing in TBS-T, the bands were revealed by the ECL Plus Chemiluminescence Detection kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Cell migration quantification using time-lapse microscopy

HUVEC cells were seeded on uncoated, type-I collagen-coated or lumican-coated wells (120 µg per well in 12-well plates in 2 ml/well containing 5000 cells). 24h after seeding, cell motility analysis was performed using an inverted microscope (Axiovert 200M; Zeiss, Oberkoken, Germany) equipped with a small transparent environmental chamber (Climabox; Zeiss) with 5% (v/v) CO₂ in air at 37°C. The microscope was driven by the Metamorph software (Roper Scientific, Evry, France), and images were recorded with a charge-coupled device camera (CoolsnapHQ; Roger Scientific). Cell migration was characterized and quantified using an interactive tracking method as already described (23).

For each individual cell, on each substratum, the following parameters of cell locomotion were studied: (i) the average migration speed of a single cell (µm/h) including the stationary phases or breaks in which the cell is not motile; (ii) the frequency of breaks (number/4h) and their mean length (min); and (iii) the velocity (µm/h) which represents for each cell its period of actual movement excluding breaks (24).

Image analysis

The mean area of lung metastasis nodules was calculated from 7 different sections for each nodule by image analysis using ImageJ software (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij>; developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD) and was expressed as a number of pixels. VEGF staining in lung metastasis nodules sections was quantified from the pictures by ImageJ software. The mean number of blood vessels was analysed from vWF-positive endothelial cells staining after retrieval of the melanin pigment background by threshold engineering with ImageJ software (NIH). The network of the capillary pseudotubes formed after 24h by HUVEC seeded on Matrigel[®] was quantified by computer analysis ImageJ software and NeuronJ plug-in tool (25).

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. Differences with $P < 0.01$ were considered significant. Statistical analysis of morphological data of lung metastasis nodules sections was performed using the non-parametric Mann-Whitney *U* rank sum test. The P value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

1) Lumican inhibits lung metastasis development.

B16F1 melanoma cells injected in the mouse tail vein two weeks later developed lung metastasis nodules (Fig. 1). The mean number of lung metastasis nodules was significantly ($P<0.001$) decreased in mice injected with Lum-B16F1 cells compared to mice injected with Mock-B16F1 cells (Fig. 1C). Immunohistochemistry analysis showed that, in comparison to Mock-B16F1 cells (Fig. 1D), lumican was overexpressed in the metastatic nodules obtained with Lum-B16F1 cells (Fig. 1E). Lumican was found in the cytoplasm of the Lum-B16F1 cells but also in the stroma of the nodules, suggesting a secretion of lumican due to the presence of the signal peptide. Figure 2 shows Masson's Trichrome stainings of representative lung metastasis from a Mock-B16F1 cells-injected mouse (Fig. 2A a-e) and a Lum-B16F1 cells-injected mouse (Fig. 2B a-d). The metastatic nodules were characterized by numerous melanin-positive B16F1 cells surrounding pre-existing blood vessels or bronchial epithelia. Small blood vessels and capillaries were visible inside the nodules. Necrotic plaques could be observed in the Lum-B16F1 cells mice group (Fig. 2B a). Large variations in the number and in the size of the nodules within one section but also within one mice group were observed. To better characterize the lung metastasis nodules of each mice group, the mean number and the mean area of lung metastasis nodules were measured. The mean area of the nodules was significantly lower ($P<0.05$) in the lumican-overexpressing mice group ($5.3 \times 10^6 \pm 3.0 \times 10^6$) in comparison to the control mice group ($13.3 \times 10^6 \pm 10.8 \times 10^6$), although large variations from one mouse to another within the same group was observed (Fig. 2C). Therefore, the microscopic results confirmed the macroscopic observations and suggested that overexpression of lumican might inhibit lung metastasis development.

2) Lumican induces B16F1 melanoma cell apoptosis in lung metastasis nodules.

The proliferation of B16F1 melanoma cells within the nodules was investigated by immunohistochemistry with an antibody raised against cyclin D1 (Fig. 3A,B). The percentage of cyclin D1-positive nuclei was similar in both types of B16F1 cells independently of their lumican expression (34.1 ± 15.0 and 38.8 ± 14.4 , respectively). Therefore, lumican expression seemed to have no significant effect on the proliferation of B16F1 melanoma cells within the nodules. The apoptosis of B16F1 was then investigated by immunohistochemistry on lung metastasis nodule sections with antibodies raised against apoptosis cell markers: cleaved caspase 3 and cleaved PARP. In contrast to Mock-B16F1 cells (Fig. 3C,E), metastasis nodules of Lum-B16F1 cells exhibited cleaved caspase 3 and cleaved PARP stainings in the cytoplasm and in the nucleus, respectively (Fig. 3D,F).

In order to analyse whether the build up of lumican caused the enhanced apoptosis and whether the pro-apoptotic effect is specific to lumican, wild type B16F1 melanoma cells were incubated *in vitro* in the presence of increasing concentrations, (0, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$), of recombinant human lumican core protein for sixteen hours. The expression of total caspase 3 and cleaved PARP was then analysed by Western immunoblotting from whole cell extract (Fig. 4). Total caspase 3 expression was down-regulated in the presence of increasing concentrations of lumican while, concomitantly, cleaved PARP expression was up-regulated, confirming a pro-apoptotic effect of lumican on B16F1 cells.

These results suggest that lumican inhibits lung metastasis nodule growth by inducing tumour cell apoptosis within the metastatic nodules.

3) Lumican expression decreases VEGF expression and blood vessels density in lung metastasis nodules.

VEGF expression in lung metastasis nodules was analysed by immunohistochemistry (Fig. 5A,B). The intensity of the staining was quantified by image analysis software in each mice group as shown in the upper right diagram. In comparison to Mock-B16F1 cells (Fig. 5A), Lum-B16F1 cells nodules (Fig. 5B) exhibited significantly lower ($P<0.05$) expression of VEGF. This result led us to investigate the density of the blood vessels network within the nodules of the lung metastasis of each mice group. Blood vessels were visualized using an antibody directed against vWF, a marker of endothelial cells (Fig. 5C,D) and the number of blood vessels within the nodules was counted, as shown in the lower right diagram. A significant ($P<0.05$) decrease of the mean number of blood vessels was observed in the metastasis nodules of Lum-B16F1 cells compared to the Mock-B16F1 cells control nodules. This result suggested that lumican might inhibit neo-angiogenesis in the metastasis nodules.

4) Lumican inhibits pseudotube formation *in vitro*.

The ability of HUVEC to form pseudotubes on Matrigel[®] *in vitro* (Fig. 6A,B) was studied after addition of 10 $\mu\text{g/ml}$ of recombinant lumican core protein within the gel (Fig. 6B). Twenty four hours after seeding, the presence of lumican within Matrigel[®] impaired pseudotube formation by the endothelial cells (Fig. 6B). The inhibitory effect of lumican in the endothelial basal cell medium was abolished by the presence of bFGF (15 ng/ml) or VEGF (15 ng/ml) (data not shown). These *in vitro* results confirmed the angiostatic effects of lumican previously observed *in vivo*.

5) Lumican inhibits *in vitro* endothelial cell migration

The proliferation of endothelial cells was investigated by immunohistochemistry with an antibody raised against cyclin D1 (data not shown). The percentage of positive cyclin D1 nuclei in endothelial cells was not significantly affected by lumican coating compared to controls (16.4 ± 4 and 17.5 ± 3 , respectively). Therefore, lumican had no significant effect on the proliferation of endothelial cells. The apoptosis of endothelial cells was then investigated by Hoechst labelling. The percentage of endothelial cells with moon shape nuclei or condensed chromatin was very low (3%) and was not affected by the presence of lumican. The absence of effect of lumican on HUVEC cell proliferation and apoptosis led us to study the effects of lumican on endothelial cell migration. Continuous single cell tracking permitted to visualize the trajectories of cells grown on plastic, type I collagen, or lumican coatings. In contrast to uncoated surfaces (Fig. 7A) or type I collagen (Fig. 7B), lumican drastically decreased the trajectory of endothelial cells (Fig. 7C). On plastic or type I collagen, cells moved along a more linear path or a more winding path, while cells cultured on lumican exhibited shorter or circular trajectories around their starting points (Fig. 7A). The migration speed of endothelial cells on plastic or on type I collagen was 28 % higher ($P < 0.01$) than on lumican (Fig. 7D). In addition to the migration speed ($\mu\text{m/h}$) which denotes the average speed of a single cell over the whole observation time, the stationary phases or breaks (frequency and length), in which the cell is not motile, and the velocity ($\mu\text{m/h}$) which represents for each cell its period of actual movement excluding breaks, were analysed (24). As shown in Fig. 7E, which represents the distance of migration every 30 min for 24h, no break was detected whatever the nature of the substratum. The migration of endothelial cells was 25 % higher on a collagen matrix or on plastic than on lumican ($P < 0.05$).

Altogether, these results indicate that lumican inhibits lung metastasis nodules growth not only by inducing melanoma cell apoptosis but also by inhibiting endothelial cell migration and therefore angiogenesis within the lung metastasis nodules.

DISCUSSION

In this study, we showed that the ECM protein lumican, decreased experimental lung metastasis development in mice by increasing tumour cell apoptosis, by decreasing VEGF expression and by decreasing the neovascularization.

The development of tumour metastasis is a multistep process. Key step of this process is the interaction of tumour cells with the extracellular matrix macromolecules. On the other hand, ECM influences the behaviour of tumour cells. We previously demonstrated that recombinant human lumican inhibited the development of B16F1 primary tumours in mice by inducing tumour cell apoptosis (1). This effect was characterized by an increase of cell adhesion mediated by $\alpha 1$ integrin expression and an inhibition of the migration of melanoma cells (15). The apoptosis in lumican-expressing tumour nodules was characterized by enhanced immunostaining of cleaved PARP and cleaved caspase 3. This pro-apoptotic effect was not due to the build up of lumican since it was reproduced by addition of extracellular lumican to tumor cell cultures. *In vitro*, a significant decrease of caspase 3 expression and an increased expression of cleaved PARP in wild type B16F1 cells incubated with increasing amounts of lumican core protein were observed without alteration of the proliferation rate. Pro-apoptotic effect of lumican was already described in cornea (26-28) and in melanoma primary tumours (1). Data from Goldoni et al (2008 a and b), suggest a role for decorin, another member of the SLRP family, as a powerful and effective therapeutic agent against breast cancer due to its inhibition of both primary tumour growth and metastatic spreading to the lungs associated with a pro-apoptotic effect (29, 30). In our study, apoptotic melanoma effect was not observed in the control mice group.

In contrast, the VEGF immunostaining and the number of blood vessels within the lung metastasis nodules were decreased in the lumican-expressing nodules. *In vitro*, pseudotube formation on Matrigel[®] by human endothelial cells (HUVEC) was inhibited by lumican.

Moreover, in comparison to type I collagen coating or plastic, lumican coating induced a significant alteration of the endothelial cell trajectory and a decrease of their migration speed. B16F1 cells induce angiogenesis in metastatic nodules by stimulation of VEGF expression in distant organs. Angiogenic capacity of metastatic B16F1 cells has been widely described (31, 32). B16F1 cells metastatic potential can be increased by their enhanced release of bFGF and VEGF after phorbol ester treatment (33). Compared to mock-transfected B16F1 cells, a significant decrease of the mean number of blood vessels was observed in lung metastatic nodules developed from lumican-transfected B16F1 cells. Thus, the inhibition of the metastatic spreading to the lungs might also depend on the anti-angiogenic properties of lumican (19, 20, 34). It must be pointed out that decorin, another member of the SLRP family, was also described to suppress tumour cell-mediated angiogenesis (35). Decorin was shown to inhibit endothelial cell migration by interfering with VEGF-stimulated NO release (36-38). In our study, the VEGF staining intensity was significantly decreased in the nodules obtained with lumican-transfected cells. This decreased VEGF expression may contribute to the decreased nodule vascularization that we observed. It will be interesting to assess if lumican inhibits the angiogenesis in another type of tumours (39-41). Moreover, the decreased vascularization might depend on a direct inhibition of neoangiogenesis by lumican, as suggested by its capacity to inhibit *in vitro* pseudotube formation by endothelial cells. Albig and collaborators (20), monitored the effects of recombinant lumican on human microvascular endothelial cells (HMEC) and HUVEC. Recombinant lumican significantly diminished the activation of p38 MAPK in response to VEGF or bFGF in HMEC cells. In that study, lumican inhibited the invasive capacities of HMEC only, whereas HUVEC appeared insensitive to its angiostatic activity. These observations suggest that lumican mediates angiostasis in an endothelial cell- and context- specific manner, confirming the observation that lumican

inhibited angiogenic sprouting of HUVEC cells was inefficient after treatment with VEGF or bFGF.

Lumican was able to inhibit pseudotube formation in Matrigel[®] without affecting endothelial cell apoptosis and/or proliferation. Therefore, we investigated whether lumican could interfere with the motility of endothelial cells. For that purpose, HUVEC were tracked by videomicroscopy for 24h on glass coverslips or on type I collagen coating, or lumican coating. The trajectory of endothelial cells was completely different in the presence of lumican compared to glass or collagen substratum. Cell mobility was poor on lumican coating, most of the cells making shorter or circular trajectories around their starting points. Their mean speed was also significantly decreased. These results show that the endothelial cell migration is strongly decreased in the presence of lumican. We recently showed that melanoma cell migration was also inhibited by lumican. This inhibition was correlated with altered cytoskeleton network (16). The inhibition of the migration of endothelial cells in presence of lumican might also be involved in angiostatic activity. Similar activity was previously described for decorin (36, 37, 42-46) and for the NC1 domain of type XIX collagen (47).

Taken together, our data demonstrate that lumican expression inhibits the formation of lung metastatic nodules in a mouse experimental model of melanoma. This effect seems to be due to a pro-apoptotic effect on tumour cells and to an inhibition of tumour neoangiogenesis in the metastasis nodules. Further investigations will be necessary to analyse the signalling pathway and the molecular mechanisms by which lumican exerts its angiogenic activities within normal and diseased vascular microenvironments.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of the Institut National du Cancer (ACi 2007-2009 Cancéropôle Grand-Est), FEDER (CPER 2007) Région Champagne-Ardenne, and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité de la Marne) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- 1) Vuillermoz B, Khoruzhenko A, D'Onofrio MF, 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.
- 2) Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1997; 32(2): 141-174.
- 3) 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.
- 4) Cornuet PK, Blochberger TC, Hassell JR. Molecular polymorphism of lumican during corneal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35(3): 870-877.
- 5) Yeh LK, Chen WL, Li W, Espana EM, Ouyang J, Kawakita T, Kao WW, Tseng SC, Liu CY. Soluble lumican glycoprotein purified from human amniotic membrane promotes corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46(2): 479-486.
- 6) Seomun Y, Joo CK. Lumican induces human corneal epithelial cell migration and integrin expression via ERK 1/2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 372(1): 221-225.
- 7) Naito Z. Role of the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth. *J Nippon Med Sch*. 2005; 72(3):137-145.
- 8) Leygue E, Snell L, Dotzlaw H, Troup S, Hiller-Hitchcock T, Murphy LC, Roughley PJ, Watson PH. Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol*. 2000; 192(3): 313-320.
- 9) Matsuda Y, Yamamoto T, Kudo M, Kawahara K, Kawamoto M, Nakajima Y, Koizumi K, Nakazawa N, Ishiwata T, Naito Z . Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2008; 33(6):1177-1185.
- 10) Lu YP, Ishiwata T, Kawahara K, Watanabe M, Naito Z, Moriyama Y, Sugisaki Y, Asano G. Expression of lumican in human colorectal cancer cells. *Pathol Int*. 2002; 52(8): 519-526.
- 11) Seya T, Tanaka N, Shinji S, Yokoi K, Koizumi M, Teranishi N, Yamashita K, Tajiri T, Ishiwata T, Naito Z. Lumican expression in advanced colorectal cancer with nodal metastasis correlates with poor prognosis. *Oncol Rep*. 2006; 16(6): 1225-1230.
- 12) Köninger J, Giese T, di Mola FF, Wente MN, Esposito I, Bachem MG, Giese NA, Büchler MW, Friess H. Pancreatic tumor cells influence the composition of the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 322(3): 943-949.
- 13) Brézillon S, Venteo L, Ramont L, D'Onofrio MF, 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.

- 14) Sifaki M, Assouti M, Nikitovic D, Krasagakakis 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.
- 15) D'Onofrio MF, 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.
- 16) Radwanska A, Baczynska D, Nowak D, Brézillon S, Popow A, Maquart FX, Wegrowski Y, Malicka-Blaszkiewicz M. Lumican affects actin cytoskeletal organization in human melanoma A375 cells. *Life Sci*. 2008; 83(19-20): 651-660.
- 17) 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.
- 18) Lee HJ, Lee HJ, Song GY, Li G, Lee JH, Lü J, Kim SH. 6-(1-Oxobutyl)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone inhibits lewis lung cancer by antiangiogenesis and apoptosis. *Int J Cancer*. 2007; 120(11): 2481-90.
- 19) Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, Bikfalvi A. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(5): 1643-1648.
- 20) Albig AR, Roy TG, Becenti DJ, Schiemann WP. Transcriptome analysis of endothelial 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.
- 21) Piez KA. The amino acid chemistry of some calcified tissues. *Ann N Y Acad Sci*. 1963; 109: 256-68.
- 22) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- 23) Zahm JM, Kaplan H, Hérard AL, Doriot F, Pierrot D, Somelette P, Puchelle E. Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1997; 37(1): 33-43.
- 24) Fourre N, Millerot-Serrurot E, Garnotel R, Zahm JM, Bonnet N, Millot JM, Jeannesson P. Extracellular matrix proteins protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin. *Cancer Sci*. 2008; 99(8): 1699-1705.
- 25) Meijering E, Jacob M, Sarria JC, Steiner P, Hirling H, Unser M. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A*. 2004; 58(2): 167-176.

- 26) 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.
- 27) Chakravarti S. Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J.* 2002; 19(4-5): 287-293.
- 28) Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995; 267(5203): 1449-56.
- 29) Goldoni S, Iozzo RV. Tumor microenvironment: Modulation by decorin and related molecules harboring leucine-rich tandem motifs. *Int J Cancer.* 2008; 123(11): 2473-2479.
- 30) Goldoni S, Seidler DG, Heath J, Fassan M, Baffa R, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am J Pathol.* 2008; 173(3): 844-855.
- 31) Berston ED, Ramos DM, Kramer RH. Metastatic melanoma cells interact with the reticular fibres of the lymph node. *Melanoma Res.* 1994; 4(2): 115-125.
- 32) La Porta CA, Di Dio A, Comolli R. Inhibition of PKCalpha decreases the gelatinase activity and the angiogenic and metastatic ability of the highly metastatic B16 murine melanoma cells. *Angiogenesis.* 1999;3(3): 241-247.
- 33) La Porta CA, Comolli R. Angiogenic capacity and lung-colonizing potential in vivo is increased in weakly metastatic B16F1 cells and decreased in highly metastatic BL6 cells by phorbol esters. *Clin Exp Metastasis.* 1998;16(5): 399-405.
- 34) Schaefer L, Raslik I, Grone HJ, Schonherr E, Macakova K, Ugorcakova J, Budny S, Schaefer RM, Kresse H. Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin. *FASEB J.* 2001; 15(3): 559-561.
- 35) Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene.* 2002; 21(31): 4765-4777.
- 36) Fan H, Sulochana KN, Chong YS, Ge R. Decorin derived antiangiogenic peptide LRR5 inhibits endothelial cell migration by interfering with VEGF-stimulated NO release. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(10): 2120-2128.
- 37) Sulochana KN, Fan H, Jois S, Subramanian V, Sun F, Kini RM, Ge R. Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. *J Biol Chem.* 2005; 280(30): 27935-27948.
- 38) 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.
- 39) Czekierdowski A, Czekierdowska S, Danilos J, Czuba B, Sadowski K, Sadowska H, Szymanski M, Kotarski J. Microvessel density and CpG island methylation of the THBS2 gene in malignant ovarian tumors. *J Physiol Pharmacol.* 2008; 59 Suppl 4:53-65.

- 40) Czekierdowski A, Czekierdowska S, Czuba B, Cnota W, Sadowski K, Kotarski J, Zwirska-Korczala K. Microvessel density assessment in benign and malignant endometrial changes. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59 Suppl 4:45-51.
- 41) Lebelt A, Dzieciol J, Guzińska-Ustymowicz K, Lemancewicz D, Zimnoch L, Czykier E. Angiogenesis in gliomas. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008; 46: 69-72.
- 42) Järveläinen H, Puolakkainen P, Pakkanen S, Brown EL, Höök M, Iozzo RV, Sage EH, Wight TN. A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen*. 2006; 14(4): 443-452.
- 43) Schönherr E, Sunderkötter C, Schaefer L, Thanos S, Grässel S, Oldberg A, Iozzo RV, Young MF, Kresse H. Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea. *J Vasc Res*. 2004; 41(6): 499-508.
- 44) Schönherr E, Levkau B, Schaefer L, Kresse H, Walsh K. Decorin affects endothelial cells by Akt-dependent and -independent pathways. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 973:149-152.
- 45) Fiedler LR, Schönherr E, Waddington R, Niland S, Seidler DG, Aeschlimann D, Eble JA. Decorin regulates endothelial cell motility on collagen I through activation of insulin-like growth factor I receptor and modulation of alpha2beta1 integrin activity. *J Biol Chem*. 2008; 283(25): 17406-17415.
- 46) Nelimarkka L, Salminen H, Kuopio T, Nikkari S, Ekfors T, Laine J, Pelliniemi L, Järveläinen H. Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis. *Am J Pathol*. 2001; 158(2):345-353.
- 47) Ramont L, Brassart-Pasco S, Thevenard J, Deshorgue A, Venteo L, Laronze JY, Pluot M, Monboisse JC, Maquart FX. The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(2): 506-514.

FIGURE LEGENDS

Fig.1: The influence of lumican on the formation of lung metastasis nodules.

Lung metastasis nodules were obtained after injection of 10^5 mock-transfected (Mock-B16F1) (A) or HLum-transfected (Lum-B16F1) (B) B16F1 cells in the tail vein of syngenic C57BL6 mice, as described in Material and Methods. Lungs were collected at day 14th and the number of lung metastasis nodules was counted in each mice group (C). The bars represent median values. ** : $P < 0.001$. The immunohistochemical staining of lumican expressed in mock-B16F1 (D) and Lum-B16F1 cells (E). Magnification X20 (D,E).

Fig. 2: Inhibition by lumican of the size of lung metastasis nodules observed after Masson's Trichrome staining of the sections.

Lung metastasis nodules were obtained as described in Fig. 1. Standard Masson's Trichrome staining was performed on lung metastasis nodule sections. A representative series of nodules from one section of Mock-B16F1 cells mouse is illustrated (A, a-e). The histology of the nodules was characterized by numerous melanin positive B16F1 cells surrounding pre-existing blood vessels and/or bronchial epithelia (A c,d). Small blood vessels and capillaries were visible inside the nodules. A representative series of nodules from one section of one Lum-B16F1 cells mouse is illustrated (B, a-d). The mean area of lung metastasis nodules (\pm SD) is shown in the diagram, expressed as pixel numbers (C). * : $P < 0.05$. Magnification X5 (A,a), X10 (A,d; Ba-d), X20 (A,b,c,e).

Fig. 3: Lumican induces B16F1 cells apoptosis in mouse lung metastasis nodules.

Lung metastasis nodules from Mock-B16F1 cells (A,C,E) or from Lum-B16F1 cells (B,D,F) were obtained as described. Immunohistochemistry was performed on lung metastasis nodule sections with antibodies directed against cyclin D1 (A,B), cleaved caspase 3 (C,D) and cleaved PARP (E,F). Magnification X40 (A-C, E), X100 (D,F).

Fig. 4: Effect of lumican on total caspase 3 and cleaved PARP expression in wild type B16F1 cells.

Increasing concentrations of human lumican core protein, as described below the blots, were added to the cell culture medium for sixteen hours. Cells were collected, proteins extracted and subjected to Western immunoblotting as described in Materials and Methods. The migration position of the Mr 35,000-caspase 3, 89,000-cleaved PARP and 44,000-actin bands are indicated.

Fig. 5: Lumican inhibits VEGF expression and decreases blood vessels density in lung metastasis nodules.

Representative stainings of lung metastasis nodules from Mock-B16F1 cells (A,C) and from Lum-B16F1 cells (B,D). Immunohistochemistry was performed on lung metastasis nodules sections with antibodies directed against VEGF (A,B). VEGF staining was detected in nodules obtained with Mock-B16F1 cells and Lum-B16F1 cells. The quantification of the intensity of the staining by image analysis is shown in the upper right diagram. * : $P < 0.05$.

Blood vessels were labelled using an antibody directed against vWF, a specific marker of endothelial cells (C,D). The number of blood vessels within the nodules was counted by image analysis. Results are shown in the lower right diagram. * : $P < 0.05$. Magnification X10 (A,B), X20 (C,D).

Fig. 6: Lumican inhibits *in vitro* pseudotube formation by endothelial cells.

Pseudotube formation on Matrigel[®] (A) or Matrigel[®] ECM gel mixed with 10 µg/ml of lumican (B) was observed twenty four hours after HUVEC seeding. Magnification X40. The semi-quantitative evaluation of the pseudotube network was performed using ImageJ software and NeuronJ plugin and is shown in the diagram.* : $P < 0.05$.

Fig. 7: Lumican inhibits endothelial cell migration.

Cells were plated on a 12-well plate at 5000 cells per well. The migration of individual living cells was determined by means of computer-assisted phase contrast videomicroscopy during 24 hours as described in Materials and Methods. Frames (A), (B), and (C) illustrate the trajectories of endothelial cells cultured on plastic or type I collagen- or lumican- coated surfaces. Frame (D) shows the mean migration speed of endothelial cell population cultured on plastic (1) or type I collagen- coated (2) or lumican- coated (3) surfaces. Frame (E) represents the distance of migration every 30 min for 24h. No break was detected whatever the nature of the substratum. The graph shows the mean values of three independent experiments. (15 cells were analysed per substratum). ** : $P < 0.01$.

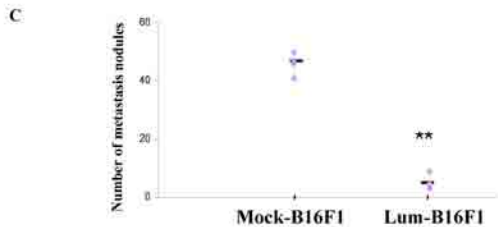


Figure 1.
Brézillon et al.

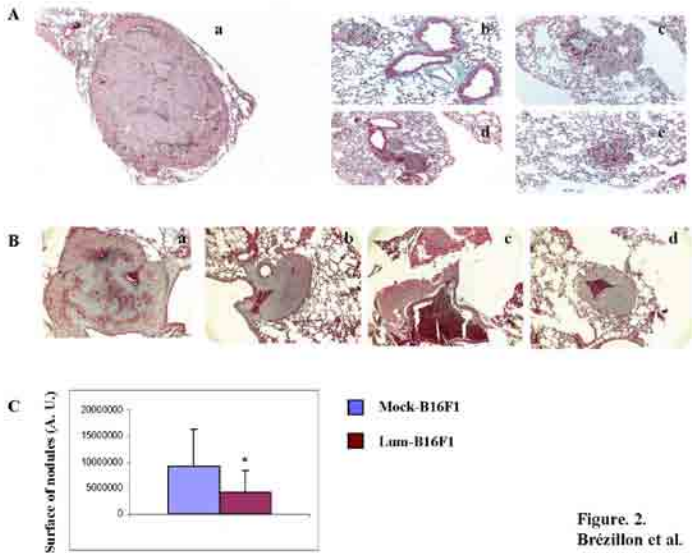


Figure 2.
Brézillon et al.

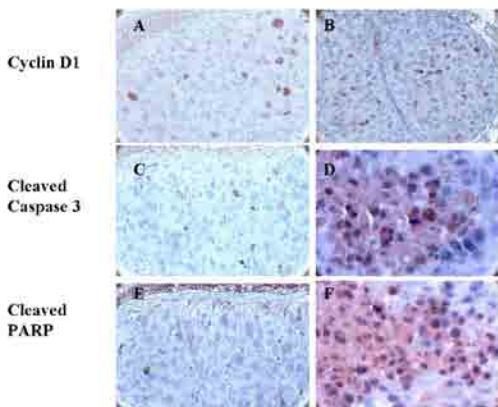


Figure. 3.
Brézillon et al.

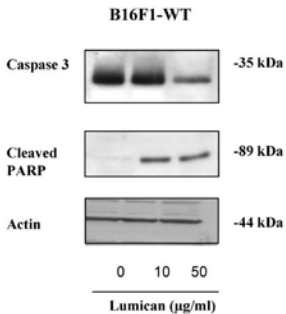
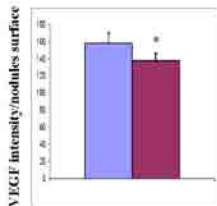
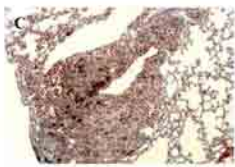
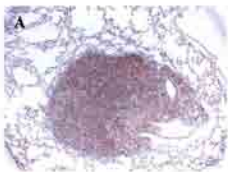


Figure. 4.
Brézillon et al.



■ Mock-B16F1
■ Lum-B16F1

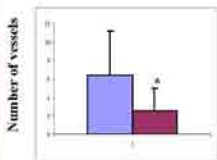


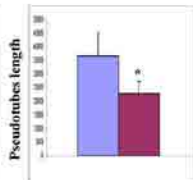
Figure 5.
Brézillon et al.



Control



Lumican



Control
Lumican

Figure 6.
Brézillon et al.

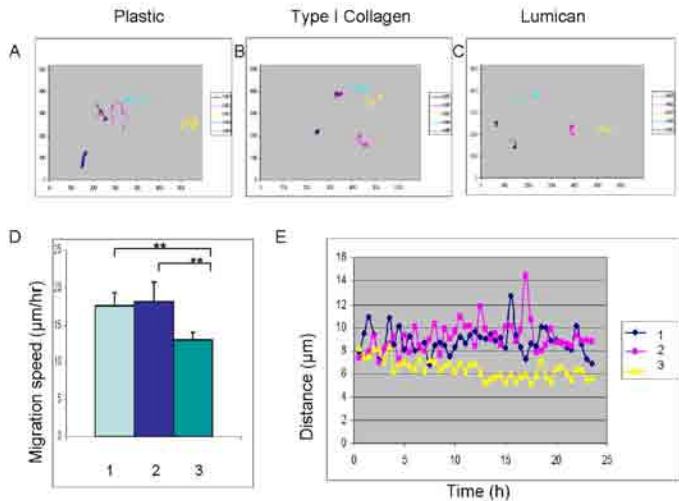


Figure 7.
Brézillon et al.



Lumcorin: A leucine-rich repeat 9-derived peptide from human lumican inhibiting melanoma cell migration

Cédric Zeltz^{a,1}, Stéphane Brézillon^{a,1}, Corinne Perreau^a, Laurent Ramont^{a,b}, François-Xavier Maquart^{a,b}, Yanusz Wegrowski^{a,*}

^aLaboratoire de Biochimie Médicale et de Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6237, Université Reims-Champagne-Ardenne, F-51095 Reims, France

^bCHU de Reims, F-51095 Reims, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2009

Revised 31 July 2009

Accepted 7 August 2009

Available online 15 August 2009

Edited by Veli-Pekka Lehto

Keywords:

Lumican

Melanoma

Cell migration

Anti-tumor peptide

Leucine-rich repeat

ABSTRACT

We previously showed that lumican decreases melanoma progression. The aim of the present study was to determine the active sequence of the lumican core protein responsible for the inhibition of melanoma cell migration. Using different recombinant and synthetic peptides derived from lumican, we localized an active site in the leucine-rich repeat 9 domain of the lumican core protein. We propose the name lumcorin (fragment of lumican core protein) for the active peptide derived from this site. Lumcorin was able to inhibit melanoma cell migration in vitro.

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lumican is an extracellular matrix (ECM) protein present in normal adult skin as a glycoprotein with a 37 kDa core protein. It was first identified in the cornea, where it is expressed as a proteoglycan with keratan sulfate chains [1]. Lumican belongs to the small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family which also includes decorin, biglycan and fibromodulin [2]. A signature characteristic for the SLRP family is the leucine-rich repeat (LRR) domains which consists of internal tandem repeats rich in leucine. These repeats contain the 11-amino acid hallmark motif LxxLxLxxNxL/L [3]. Lumican contains 11 LRR motifs [4]: six of them are constituted by the exact sequence LxxLxLxxNxL and five by a close sequence. There is a correlation between internal repeats and the “banana-shaped” tertiary structure of the SLRP, thought to be involved in protein–protein interactions [5]. Some LRR of SLRP have biological activities: LRR 5 and 6 from decorin and LRR 11 from fibromodulin are involved in collagen type I binding [6,7]. Moreover, the decorin LRR 5 shows anti-angiogenic properties [8,9]. Like decorin and

fibromodulin, lumican contributes to collagen fibrillogenesis [10]. Knock-out mice for lumican have a fragile dermis due to irregular fibrillar meshwork. In addition to its role in collagen fibrillogenesis, lumican possesses anti-tumor activity. It inhibits melanoma progression in vivo and in vitro [11–13]. In breast cancer, a low expression of lumican correlates with poor outcome of invasive carcinoma [14].

So far, the specific amino-acid sequence of the lumican core protein responsible for inhibiting lumican-dependent tumor cell migration has not been determined. The aim of the present study was to identify the active amino-acid sequence of lumican. We demonstrated that a peptide from the LRR 9 domain of human lumican inhibits melanoma cell migration. We propose the name of lumcorin (fragment of lumican core protein) for this anti-migratory peptide.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis

The peptides corresponding to LRR motif lumican sequences LQHNRLKEDAVS (peptide 5), VSLTLYLDNNKISNIP (peptide 7), NALQYLRSLSHNELADSG (peptide 8), SSLVELDLSYNKLNIP (peptide 9, lumcorin), SYSKIKHLRLDGNRISE (peptide 11) and the scrambled peptide LPSVSILEKLYNNLSKD (peptide 9 SCR), were obtained from

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; ECM, extracellular matrix; LRR, leucine-rich repeat; SLRP, small leucine-rich proteoglycan

* Corresponding author. Fax: +33 326 918055.

E-mail address: yanusz.wegrowski@univ-reims.fr (Y. Wegrowski).

¹ These two authors contributed equally to this work.

GenScript Corporation (Piscataway, NJ, USA). Peptides were dissolved in 18 mM acetic acid.

2.2. Cell culture

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 recommended by supplier.

2.3. Cell viability and apoptosis assay

For measuring cell viability, cells (15×10^3 per well) were plated into 96-well plates. At the 2nd day, peptide 9 or 9 SCR (100 μ M) were added into the wells. The toxicity of the peptides was then measured using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

For apoptosis assay, cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (1 μ g/ml) 24 h after incubation of the cells with peptide 9 or 9 SCR. Doxorubicin (2 μ M), a pro-apoptotic drug, was used as positive control [15]. Nuclear morphology (nuclear fragmentation) was visualized with an inverted fluorescence microscope (Axiovert 200M, Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.4. Expression and purification of recombinant lumican core protein and its fragments

Recombinant human lumican core protein (37 kDa) was produced as previously described [12]. Recombinant lumican fragment, L1–9 (Gly#15–Leu#266), was obtained after digestion of the human lumican cDNA by KpnI and HindIII and cloned into the multiple cloning site of PQE-30 vector (Qiagen, Courtaboeuf, France).

L1–6 fragment (Gly#15–Ser#206) was obtained using 5'-gagctcgtaccagtgccagctactat-3' forward and 5'-tggtgaagcttagagacagggagaccaga-3' reverse primers. The obtained cDNA fragment was cloned into the KpnI/HindIII site of PQE-30. The sequence of both constructs was checked by sequencing. The recombinant lumican and fragments were purified on Ni-NTA resin superflow affinity chromatography via their 6 \times Histidine tag as already described [12]. Lumican core protein and fragments were dissolved in 18 mM acetic acid.

2.5. Western immunoblotting

The rabbit polyclonal antibody raised against the synthetic human lumican peptide (17 amino acids: YLDNNKISNIPDEYFKR), used in our previous works [11], does not recognize L1–6 fragment. Immunoreactive serum raised against human lumican was prepared after three intra-dermal injections of human lumican core protein every 3 weeks in a rabbit. First injection contained complete Freund's adjuvant and the boosters incomplete Freund's adjuvant. The serum was purified through DEAE-Affi-gel Blue gel column (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). The specificity of the purified serum was checked by Western immunoblotting on total protein extracts from bovine cornea and on human recombinant lumican core protein. The immunoreactivity efficiency of this immunopurified serum was compared to the rabbit polyclonal antibody raised against the synthetic human lumican peptide used in our previous works.

Following electrophoresis, recombinant human lumican core protein and fragments were transferred from the polyacrylamide gels to nitrocellulose by electroblotting. The membranes were soaked in TBS-T solution (0.005% Tween 20, 20 mM Tris and 140 mM NaCl, pH 7.6) containing 5% bovine serum albumin

(BSA) for 2 h. After washing, the membranes were incubated with the immunopurified serum raised against the recombinant human lumican at a final dilution of 1:500 overnight at 4 °C with constant agitation. The membranes were washed with TBS-T and probed with 1:10 000 dilution of a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase in a solution of 1% BSA in TBS-T for 45 min at room temperature. After washing in TBS-T, the complexes were revealed by the Amersham™ ECL Chemiluminescence Detection kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

2.6. Cell migration assay

Cell migration stimulated by serum gradient were performed in Transwell® chambers (Greiner Bio-one, Courtaboeuf, France) as previously described [13]. Transwell® chambers were coated either with 10 μ g of recombinant human lumican core protein or equimolar amounts of BSA or 10 μ g of type I collagen. Cells (5×10^4) in 100 μ L medium supplemented with 0.2% BSA were placed into the upper chamber of the Transwell® device. Six hundred and fifty microliters of medium containing 2% BSA and 10% FBS were placed into the lower chamber. To investigate the effect of the different synthetic peptides, cells were pre-incubated for 2 h with peptides 5, 7, 8, 9, 11 or 9 SCR (100 μ M) before being added to the upper chamber of the Transwell®. After 24 h of incubation, the cells were fixed with methanol and stained with crystal violet. The cells remaining in the upper chamber were removed by cotton swab. Migrated cells, on the lower side of the filter, were counted in five random fields using the Cell Counter plugin of the ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2008).

2.7. Homology modeling of lumican

The 3D structure of lumican was obtained using Swiss-Pdb Viewer software [16] from the crystal structure of decorin and biglycan (PDB # 1xku and PDB # 2ft3) as template.

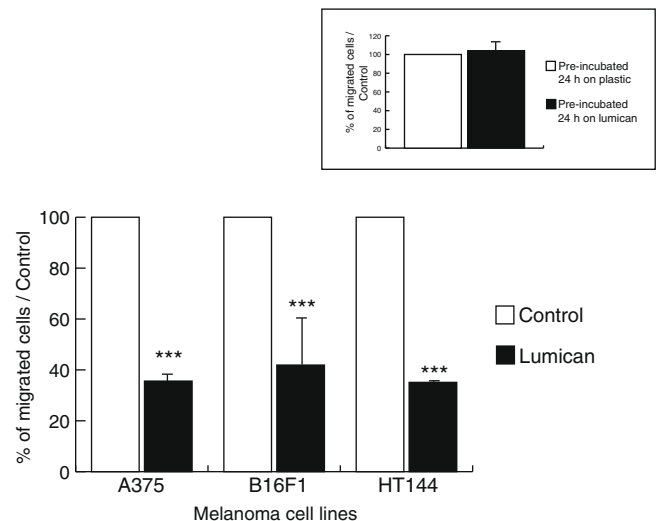


Fig. 1. Reversible inhibition of melanoma cell migration by lumican core protein. Recombinant lumican core protein inhibits melanoma cell migration. Cells (5×10^4) were seeded on Transwell® membranes coated with lumican (10 μ g) or equimolar amount of BSA (controls) and incubated for 24 h at 37 °C. The cells were stained with crystal violet and were counted in five random fields. Insert: A375 cells were pre-incubated on plastic or on lumican coating for 24 h. Cells were then detached and seeded on Transwell® membranes without any coating. The percentage of migrated cells was quantified after 24 h of migration. *, significantly different from the control (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

2.8. Statistical analysis

Results were expressed as the means \pm S.D. of three replicates and are representative of three independent experiments. Statistical significance was assessed, by the comparison of each group to the control group, by unpaired Student's test, with $P < 0.05$ being considered as significant. Analysis of variance (ANOVA) was performed using the Fisher's test.

3. Results

3.1. The human lumican core protein inhibits melanoma cell migration in a reversible manner

To study the effect of the lumican core protein on melanoma cell migration, we selected three melanoma cell lines: Human melanoma A375 and HT144 cells and murine melanoma B16F1 cells. Lumican significantly inhibited the three melanoma cell line migration in Transwell® devices (Fig. 1). The inhibitory effect of lumican was reversible: the migration of A375 cells, pre-incubated for 24 h on a lumican-coated plate, was not affected when these cells were no longer in contact with the lumican core protein (Fig. 1, insert).

3.2. Identification of an active fragment within lumican core protein able to inhibit melanoma cell migration

In order to identify the sequence responsible for the inhibition of tumor cell migration within the lumican core protein, two recombinant fragments of lumican: L1–9 (30.5 kDa, containing the LRR 1–9) and L1–6 (23.9 kDa, containing the LRR 1–6) were produced (Fig. 2A and B). Transwell® membranes were coated with these fragments, or the complete lumican core protein, in equimolar amounts. As shown in Fig. 2C, L1–9 fragment inhibited A375 cell migration by 60% ($P < 0.01$), whereas L1–6 fragment had no effect, indicating that an active site for migration inhibition was present within the LRR 7–9 domain of lumican.

3.3. The LRR 9 motif inhibits melanoma cell migration

Lumican, decorin, biglycan and fibromodulin belong to SLRP family and have similar biological activities, particularly anti-tumor properties [17,18]. A sequence with an important function such as the inhibition of cell migration, should be conserved among the SLRPs. Thus, we aligned the amino acid sequences of these four SLRPs and focused on the LRR 7–9 region (Fig. 3A). The sequence alignment showed 54% (6/11) of conserved amino acids in the LRR 9 motif, whereas 27% only (3/11) were conserved

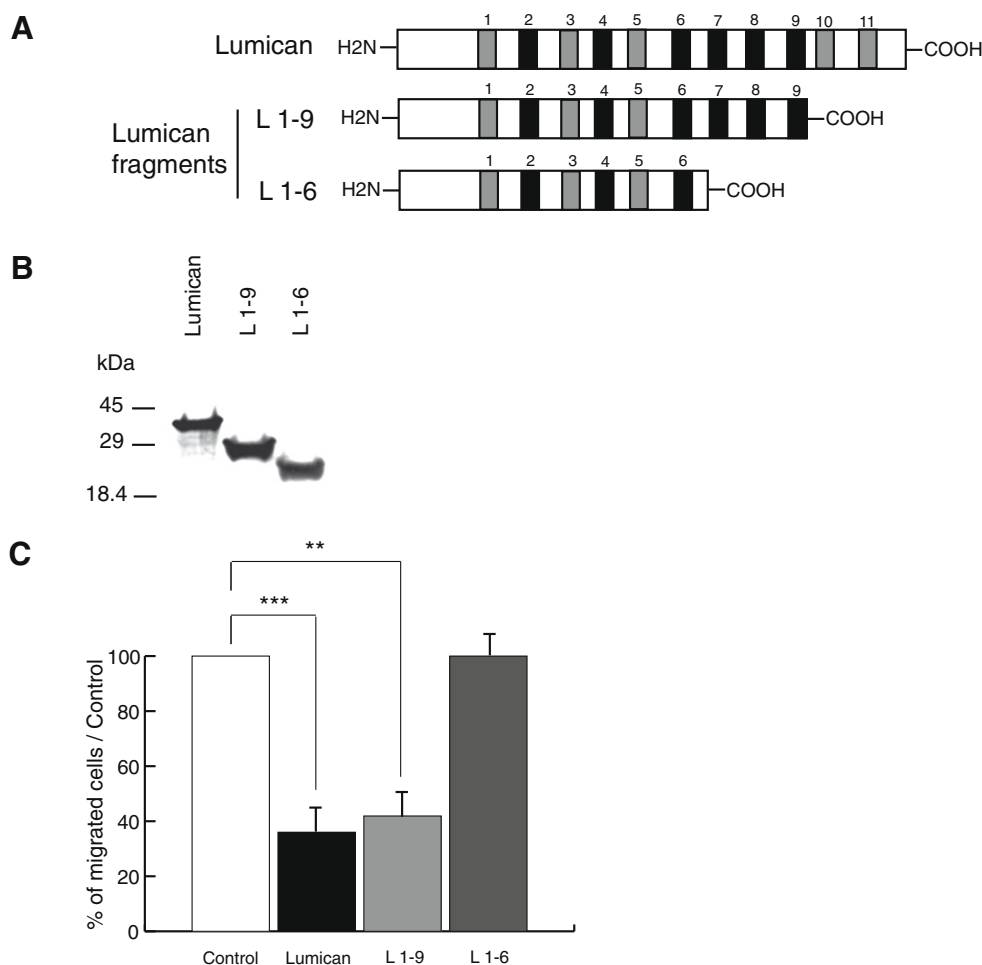


Fig. 2. Identification of an active domain within the lumican core protein able to inhibit melanoma cell migration. (A) Schematic representation of the human recombinant lumican core protein and its fragments used for this study. The LxxLxLxxNxL motifs are represented by the numbered black (consensus) and grey (partial consensus) boxes. (B) Western immunoblotting detection of the lumican core protein and the L1–6 and L1–9 fragments. The position migration of size markers are depicted on the left margin. (C) Effect of the recombinant lumican fragments on A375 melanoma cell migration. The migration assay was processed as described in Section 2, using Transwell® membranes coated with BSA (control), lumican or lumican fragments. Analysis of variance (ANOVA) performed with the Fisher's test confirmed that the four groups of data were significantly different for one group to another one ($F_{36}^3 = 9.56$, $P < 0.001$). *, significantly different from the control by unpaired Student's test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

in both LRR 7 and 8 motifs. Therefore, the LRR 9 motif was considered as a good candidate to lead the anti-migratory effects of the complete lumican core protein. Accordingly, a synthetic peptide (peptide 9), corresponding to the LRR 9 motif with its flanking sequences was studied for its anti-migratory properties. As controls, we also used two other peptides (peptide 5 and peptide 11) chosen outside the active LRR 7–9 fragment and corresponding to the LRR 5 and LRR 11 motifs of human lumican, respectively. The localization and amino-acid sequence of these peptides on the lumican core protein are presented in Fig. 3B. Homology modeling showed that the amino acid residues of peptides 8, 9 and 11 were located in the concave side of lumican, whereas most of residues from peptide 5 were in the convex side (Fig. 3C).

The three synthetic peptides (5, 9 and 11) were tested at a 100 μ M concentration on A375 cell migration in Transwell® devices. As shown in Fig. 4A, peptide 9, but not peptides 5 or 11, significantly decreased A375 cell migration compared to the control, with a dose-dependent response (correlation coefficient $r = 0.994$, $P < 0.001$). Thus, a concentration of 100 μ M for the peptide 9 was chosen for the following experiments. None of the studied peptides showed any cytotoxic or pro-apoptotic effects, as appreciated by the MTT test or Hoechst staining, respectively (data not shown).

Migration assays with other melanoma cell lines (Fig. 4B) showed that peptide 9 significantly inhibited the migration of A375, HT144 and B16F1 cells (-60% , $P < 0.001$; -30% , $P < 0.05$; -30% , $P < 0.05$, respectively), whereas the corresponding scramble peptide had no effect on cell migration.

Altogether, these results indicate that the LRR 9 motif sequence of lumican is responsible for the inhibition of the melanoma cell migration. We propose the name of lumcorin (fragment of lumican core protein) for this peptide.

Complementary experiments showed that lumcorin does not influence cell adhesion on lumican (Supplementary material, Fig. 1) or type I collagen (Supplementary material, Fig. 2). On the other hand, it was able to inhibit cell migration through collagen-coated Transwell® membranes (Supplementary material, Fig. 3).

To address the question of the function of LRR 7 and LRR 8 domains, we performed additional migration assays comparing lumcorin effect to LRR 7-derived peptide (peptide 7) and LRR 8-derived peptide (peptide 8). Results are shown in Supplementary material, Fig. 4. Peptide 7 exhibited high hydrophobic properties and aggregated melanoma cells in a non specific way. Therefore, it was not suitable for our experiments. Peptide 8 did not decrease

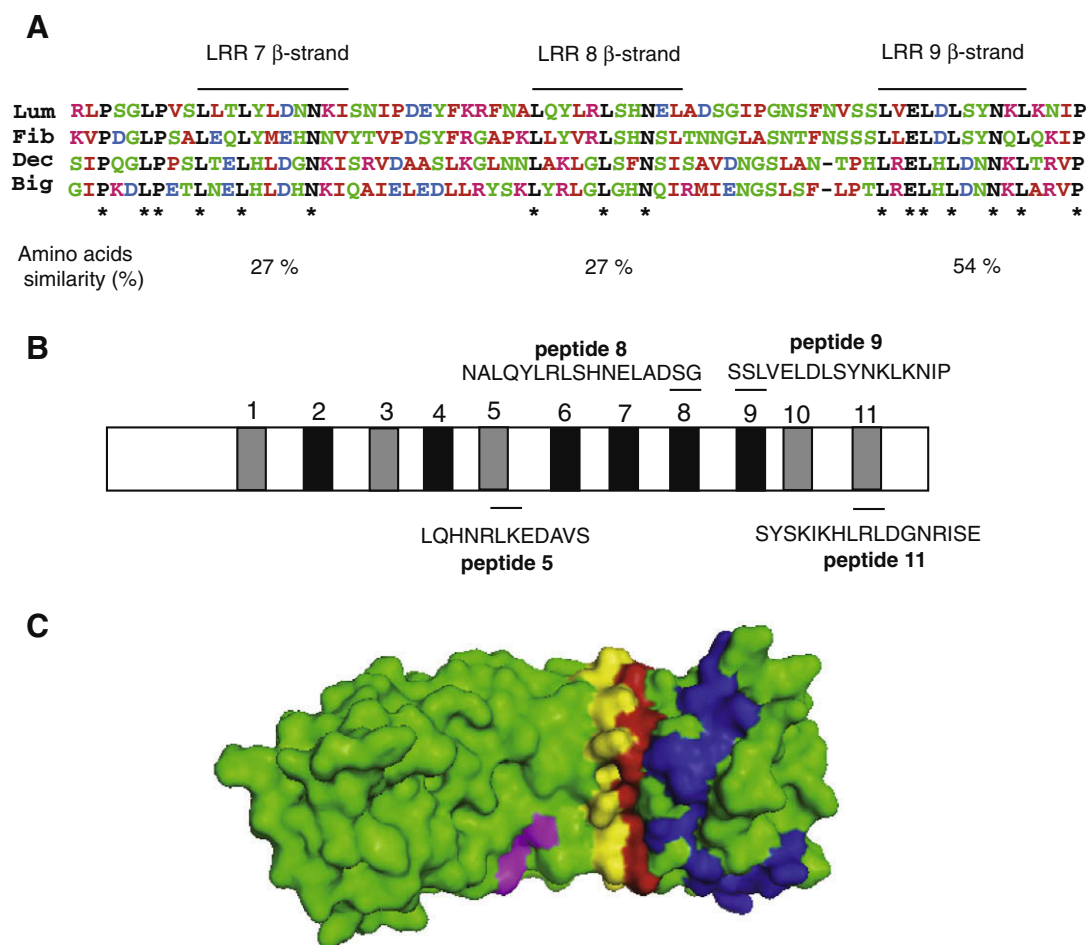


Fig. 3. Lumican amino acid sequence analysis. (A) Alignment of the partial protein sequences of four human SLRPs (lumican (Lum), fibromodulin (Fib), decorin (Dec) and biglycan (Big)) including the LRR 7–9 domains. LRR consensus sequences are indicated by stars and identical amino acids by black letters (blue: acidic amino acids, magenta: basic amino acids, red: small (small and hydrophobic) amino acids, green: remaining amino acids). The amino acid sequence similarity (%) between the four SLRPs for each LRR consensus motif is indicated below the sequences. The analysis was done using ClustalW2 software accessible at the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk>). (B) Sequences and localization of the different synthetic peptides used in this study. The amino acid sequence and its location are represented for each peptide. (C) View of the concave side of lumican molecule, modeled after decorin and biglycan crystal structures (PDB # 1xku and PDB # 2ft3). Part of peptide 5 and peptides 8, 9 and 11 residues are shaded in pink, yellow, red and blue respectively.

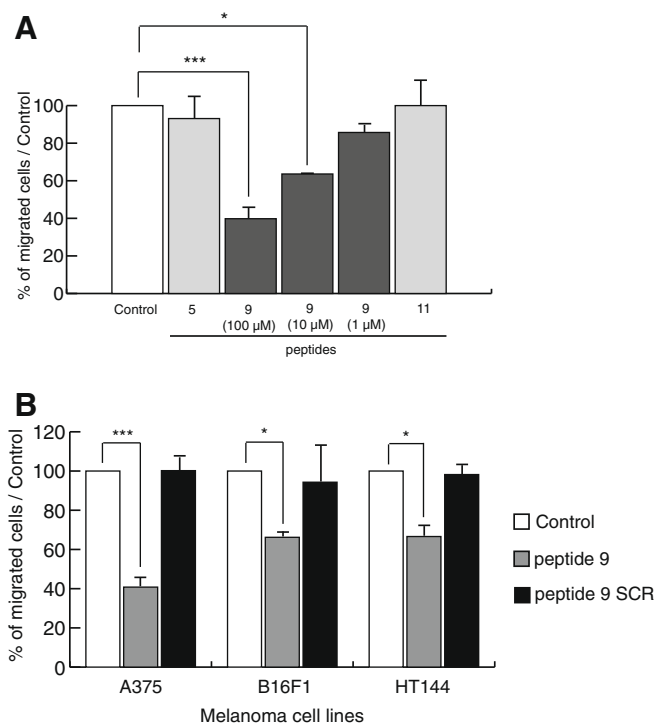


Fig. 4. LRR 9 motif inhibits melanoma cell migration. (A) Effect of the three synthetic peptides (5, 9 and 11) on A375 melanoma cell migration. Cells (5×10^4 per dish) were pre-incubated for 2 h at 37 °C in suspension with either the peptide 5 or 11 at concentrations 0 (control) or 100 μ M or the peptide 9 at a concentration of 0 (control), 1, 10 or 100 μ M (grey columns) and then seeded for 24 h at 37 °C on BSA-coated Transwell® membranes. (B) Effect of peptide 9 (100 μ M) on the migration of different melanoma cell lines. Cells were incubated with either the peptide 9 or peptide 9 scramble (9 SCR) (100 μ M) or without peptide (control) before being seeded on Transwell® membranes. The migration was measured as described in Fig. 1. ANOVA performed with the Fisher's test confirmed that the groups of data were significantly different for one group to another one (Fig. 4A, $F_{84}^2 = 15.93$, $P < 0.001$; Fig. 4B, $F_{42}^2 = 9.1$, $P < 0.001$, $F_{15}^2 = 6.76$, $P < 0.01$; $F_{15}^2 = 39.8$, $P < 0.001$ for A375, B16F1 and HT144, respectively). *, significantly different from the control by unpaired Student's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

significantly B16F1 cell migration compared to control. A375 cell migration was inhibited by peptide 8, but to a lesser extent than lumcorin.

4. Discussion

Tumor cell migration is an important process during melanoma progression, leading to invasion and metastasis. ECM macromolecules may be involved in the control of this process [19]. Lumican, a component of the ECM, may be considered as an anti-tumor molecule, since it is able to decrease melanoma progression in vivo [12]. Lumican is located in the dermis and in the peritumoral stroma of malignant melanoma, suggesting a defense mechanism against melanoma progression [11]. Here, we demonstrate that the migration inhibition is due to a specific sequence of the lumican core protein located in the LRR 9 domain. We propose to give it the name of lumcorin (fragment of lumican core protein).

In SLRPs, protein binding sites are located in the concave side of the molecule. This side is formed by parallel β -sheets, formed by the LRR motif sequences LxxLxLxxNxL [5,20]. For this reason, we focused on LRR motifs to determine the active site of lumican responsible for migration inhibition. The alignment results of the four main SLRPs suggested the LRR 9 motif as a potential target. Lumcorin affected cell migration only without any alteration of cell adhesion on lumican or type I collagen substrata (Supplementary material, Figs. 1 and 2). The fact that lumcorin did not compete

with the lumican protein in the adhesion assays, indicates the presence of distinct site(s) in lumican for cell adhesion and cell migration.

Collagen is the major component of the extracellular matrix. As lumican is known to interact with type I collagen [10], an interference could occur on the inhibitory effect of lumican. Here, we observed that lumcorin inhibited the migration of melanoma cell, through collagen-coated Transwell® membranes (Supplementary material, Fig. 3), showing that the presence of collagen does not jeopardize the inhibitory effect of lumcorin on cell migration. We previously showed that the presence of type I collagen did not affect the remodeling effect of lumican core protein on melanoma cell cytoskeleton [21].

Lumcorin displayed different migration inhibitory efficiencies, as compared to lumican, depending on the cell line. Particularly, it decreased the migration of B16F1 and HT144 cells by 30% whereas lumican core protein inhibited the migration of these cells by about 60%. This might mean that other lumican domains, especially LRR 7 and LRR 8 might be involved in the inhibition of cell migration. Results that we obtained with peptide 8, however, did not confirm this hypothesis, at least for B16F1 cells (Supplementary material, Fig. 4). We cannot exclude an effect of peptide 7 since we were not able to test it in the migration assays, due to its highly hydrophobic properties. Another explanation could be that adhesion receptor expression might be different between the three cell lines. We observed that the adhesion of B16F1 cells on lumican was three times higher compared to A375 cells (Supplementary material, Fig. 1). We previously showed that adhesion of melanoma cells to lumican may impair cell migration [13]. In contrast, A375 cells could have more receptors for lumcorin than B16F1 and HT144 cells. Further studies will be necessary to test this hypothesis.

Tumor progression could also be controlled by induction of apoptosis and lumican has been reported to facilitate the induction of the pro-apoptotic receptor Fas [22]. In our model, the inhibition of melanoma migration by lumican was not due to a pro-apoptotic effect. On the contrary, a rapid rearrangement of actin filament organization was observed when melanoma cells were grown on lumican [23]. Previous data from our laboratory suggest that this interaction could induce a reorganization of focal adhesions, leading to an immobilization of melanoma cells [21]. This could contribute to slow-down melanoma progression.

Decorin and biglycan, two other members of the SLRP family, were also described as anti-tumor molecules. We suggest that these SLRPs might have similar anti-migratory properties through their own LRR 9 motifs. Particularly, it could be interesting to focus on the fibromodulin LRR 9, which differs from lumcorin by four amino acids only.

Acknowledgements

We thank the Institut National du Cancer (INCa) (ACI Cancéropôles 2007–2009), the Région Champagne-Ardenne, the FEDER and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité de la Marne) for their financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2009.08.012.

References

- [1] Hassel, J.R., Newsome, D.A., Krachmer, J.H. and Rodrigues, M.M. (1980) Macular corneal dystrophy: failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3705–3709.

- [2] Hocking, A.M., Shinomura, T. and McQuillan, D.J. (1998) Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol.* 17, 1–19.
- [3] Kajava, A.V. (1998) Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J. Mol. Biol.* 277, 519–527.
- [4] Chakravarti, S., Stallings, R.L., Sundarraj, N., Cornuet, P.K. and Hassell, J.R. (1995) Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3–q22. *Genomics* 27, 481–488.
- [5] McEwan, P.A., Scott, P.G., Bishop, P.N. and Bella, J. (2006) Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J. Struct. Biol.* 155, 294–305.
- [6] Kalamajski, S., Aspberg, A. and Oldberg, A. (2007) The decorin sequence SYRIADTNIT binds collagen type I. *J. Biol. Chem.* 282, 16062–16067.
- [7] Kalamajski, S. and Oldberg, A. (2007) Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. *J. Biol. Chem.* 282, 26740–26745.
- [8] Fan, H., Sulochana, K.N., Chong, Y.S. and Ge, R. (2008) Decorin derived anti-angiogenic peptide LRR5 inhibits endothelial cell migration by interfering with VEGF-stimulated NO release. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40, 2120–2128.
- [9] Sulochana, K.N., Fan, H., Jois, S., Subramanian, V., Sun, F., Kini, R.M. and Ge, R. (2005) Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 280, 27935–27948.
- [10] Chakravarti, S., Magnuson, T., Lass, J.H., Jepsen, K.J., LaMantia, C. and Carroll, H. (1998) Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J. Cell. Biol.* 141, 1277–1286.
- [11] Brézillon, S., Venteo, L., Ramont, L., D'Onofrio, M.F., Perreau, C., Pluot, M., Maquart, F.X. and Wegrowski, Y. (2007) Expression of lumican, a small leucine-rich proteoglycan with antitumour activity, in human malignant melanoma. *Clin. Exp. Dermatol.* 32, 405–416.
- [12] Vuillermoz, B., Khoruzhenko, A., D'Onofrio, M.F., Ramont, L., Venteo, L., Perreau, C., Antonicelli, F., Maquart, F.X. and Wegrowski, Y. (2004) The small leucine-rich proteoglycan lumican inhibits melanoma progression. *Exp. Cell Res.* 296, 294–306.
- [13] D'Onofrio, M.F., Brézillon, S., Baranek, T., Perreau, C., Roughley, P.J., Maquart, F.X. and Wegrowski, Y. (2008) Identification of beta-1 integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 266–272.
- [14] Troup, S., Njue, C., Kliewer, E.V., Parisien, M., Roskelley, C., Chakravarti, S., Roughley, P.J., Murphy, L.C. and Watson, P.H. (2003) 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, 207–214.
- [15] Zwelling, L.A., Altschuler, E., Cherif, A. and Farquhar, D. (1991) N-(5,5-diacetoxypentyl)doxorubicin: a novel anthracycline producing DNA interstrand cross-linking and rapid endonucleolytic cleavage in human leukaemia cells. *Cancer Res.* 51, 6704–6707.
- [16] Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723.
- [17] Goldoni, S., Seidler, D.G., Heath, J., Fassan, M., Baffa, R., Thakur, M.L., Owens, R.T., McQuillan, D.J. and Iozzo, R.V. (2008) An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 173, 844–855.
- [18] Weber, C.K., Sommer, G., Michl, P., Fensterer, H., Weimer, M., Gansauge, F., Leder, G., Adler, G. and Gress, T.M. (2001) Biglycan is overexpressed in pancreatic cancer and induces G1-arrest in pancreatic cancer cell lines. *Gastroenterology* 121, 657–667.
- [19] Pasco, S., Ramont, L., Maquart, F.X. and Monboisse, J.C. (2004) Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49, 221–233.
- [20] Kobe, B. and Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725–732.
- [21] Brézillon, S., Radwanska, A., Zeltz, C., Malkowski, A., Ploton, D., Bobichon, H., Perreau, C., Malicka-Blaszkiewicz, M., Maquart, F.X. and Wegrowski, Y. (2009) Lumican core protein inhibits melanoma cell migration via alterations of focal adhesion complexes. *Cancer Lett.* 283, 92–100.
- [22] Vij, N., Roberts, L., Joyce, S. and Chakravarti, S. (2005) Lumican regulates corneal inflammatory response by modulating Fas-Fas ligand signaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 88–97.
- [23] Radwanska, A., Baczynska, D., Nowak, D., Brézillon, S., Popow, A., Maquart, F.X., Wegrowski, Y. and Malicka-Blaszkiewicz, M. (2008) Lumican affects actin cytoskeletal organization in human melanoma A375 cells. *Life Sci.* 83, 651–660.

Appendix A. Supplementary data

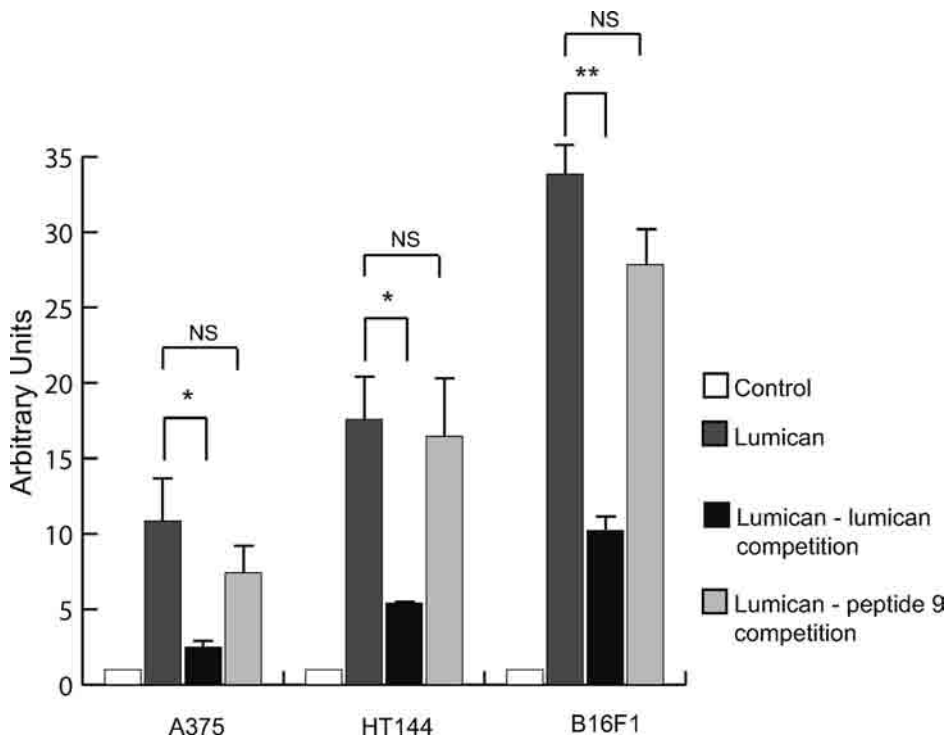


Fig. S1. Lumcorin does not inhibit melanoma cell adhesion on lumican. Without treatment, melanoma cell adhesion was increased on lumican coating (dark grey columns), compared to the corresponding controls. When the cells were pre-incubated 1h with soluble lumican and then seeded on lumican coating, we observed a decrease of cell adhesion on this coating due to the competition between soluble and coated lumican (black columns). Pre-incubation with the lumcorin (peptide 9) showed no inhibition of cell adhesion on lumican, indicating that there was no competition between lumcorin and lumican for cell adhesion (light grey columns). ANOVA performed with the Fisher's test confirmed that the groups of data were significantly different for one group to another one ($F^3_8 = 12.2, 16.2$ and $103.69, P < 0.01$ for A375, HT144 and B16F1, respectively). *, significantly different from cell adhesion on lumican by unpaired Student's test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; NS, not significant).

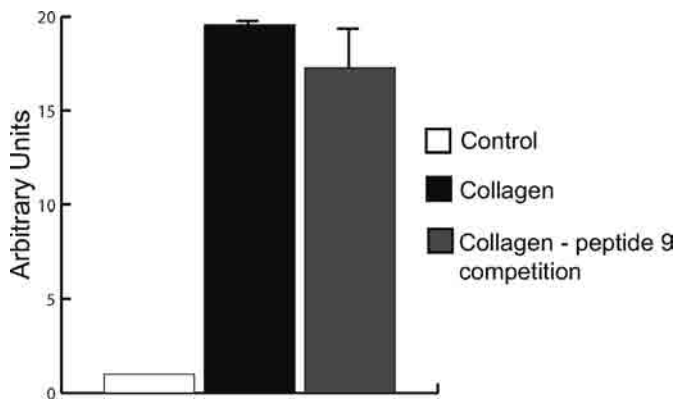


Fig. S2. Lumcorin does not inhibit melanoma cell adhesion on type I collagen. Without treatment, A375 melanoma cell adhesion was increased on type I collagen coating (black column) as compared to BSA control. Pre-incubation with lumcorin (peptide 9) showed no inhibition of cell adhesion, indicating there was no competition between lumcorin and collagen for cell adhesion.

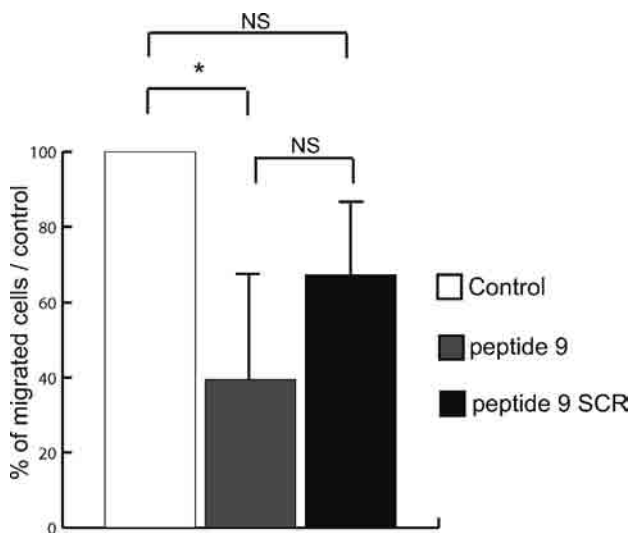


Fig. S3. Lumcorin inhibits melanoma cell migration in presence of type I collagen. A375 melanoma cell migration through type I collagen-coated Transwell® filters was significantly inhibited in the presence of lumcorin compared to the control. Scramble peptide had no significant effect. *, significantly different from the control ($*P < 0.05$; NS, not significant).

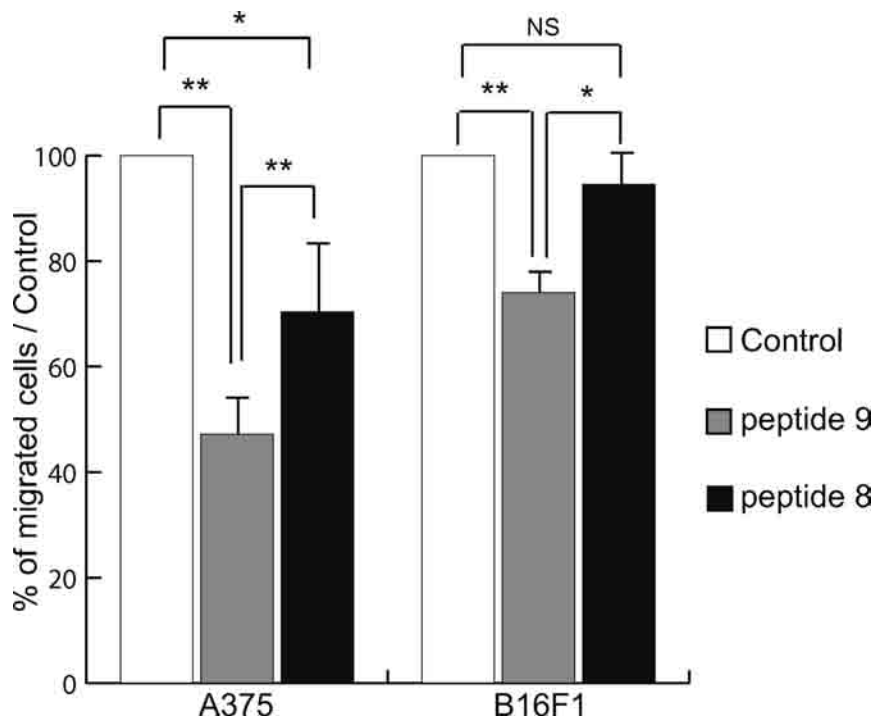


Fig. S4. Peptide 8 inhibits A375 but not B16F1 melanoma cell migration. The peptide 8 did not decrease significantly B16F1 cell migration compared to control. A375 cell migration was inhibited by peptide 8, but to a lesser extent than by lumcorin (peptide 9). ANOVA performed with the Fisher's test confirmed that the groups of data were significantly different for one group to another one ($F^2_{15} = 17.56$, $P < 0.001$ and $F^2_6 = 21.06$, $P < 0.01$ for A375 and B16F1, respectively). *, significantly different from the control by unpaired Student's test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$; NS, not significant).



Lumican core protein inhibits melanoma cell migration via alterations of focal adhesion complexes

Stéphane Brézillon^{a,*}, Agata Radwanska^b, Cedric Zeltz^a, Andrzej Malkowski^d,
Dominique Ploton^{a,c}, Hélène Bobichon^a, Corinne Perreau^a, Maria Malicka-Blaszkiwicz^b,
François-Xavier Maquart^{a,c}, Yanusz Wegrowski^a

^aLaboratoire de Biochimie Médicale et Biologie Moléculaire, CNRS UMR 6237, Faculté de Médecine, Université de Reims-Champagne-Ardenne, 51095 Reims Cedex, France

^bDepartment of Cell Pathology, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Poland

^cCentre Hospitalier Universitaire de Reims, 51095 Reims Cedex, France

^dDepartment of Medical Biochemistry, Medical University of Białystok, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2008

Received in revised form 16 March 2009

Accepted 18 March 2009

Keywords:

Extracellular matrix

Focal adhesion

Integrin

Lumican

Melanoma

ABSTRACT

Lumican is a small leucine-rich proteoglycan (SLRP) of the extracellular matrix (ECM) with anti-tumor activity. We recently demonstrated that lumican inhibits the migration of melanoma cells and identified $\beta 1$ integrin as mediator of this effect [M.F. D'Onofrio, S. Brézillon, T. Baranek, C. Perreau, P.J. Roughley, F.X. Maquart, Y. Wegrowski, Identification of $\beta 1$ integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 266–272]. The aim of the present work was to study $\beta 1$ integrin, focal adhesion complexes, actin distribution and expression in the presence of lumican substratum in comparison to type I collagen or fibronectin substrata in A375 human melanoma cells. The protein distribution was investigated by immunocytochemistry and confocal microscopy. In parallel, their expression was evaluated by Western immunoblotting and Real-time Reverse Transcription-PCR analyses. The interaction of melanoma cells with the lumican substratum resulted in heterogeneous distribution of $\beta 1$ integrin on cell membrane after 24 h of seeding. Concomitantly, a reorganization of actin stress fibers and a significant decrease in vinculin immunostaining at focal adhesion complexes were observed. No alteration of the expression was detected at protein and mRNA levels. However, a cytosolic accumulation of vinculin focal adhesion protein was observed on lumican substratum by confocal microscopy. Moreover, vinculin expression was significantly increased in cytosolic fractions in comparison to cells seeded on type I collagen or fibronectin substrata. Our results suggest that lumican induces an alteration of the link between actin filaments and $\beta 1$ integrin, characterized by a cytosolic accumulation of vinculin focal adhesion protein, which could lead to a destabilization of focal adhesion complexes. In addition, focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosine-397 (pFAK) was significantly decreased. Therefore, the cytoskeleton remodeling and the decreased pFAK phosphorylation induced by lumican in melanoma cells might explain, at least in part, the anti-invasive effect of this SLRP.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. 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,

* Corresponding author. Tel.: +33 326 913532; fax: +33 326 918055.

E-mail address: stephane.brezillon@univ-reims.fr (S. Brézillon).

Abbreviations: SLRP, small leucine-rich proteoglycan; ECM, extracellular matrix; FAK, focal adhesion kinase; BSA, bovine serum albumin; PBS, phosphate buffered saline; FBS, foetal bovine serum; DMSO, dimethyl sulfoxide; PCR, Polymerase chain reaction.

lumican, biglycan and others [1–3], constitutes an abundant component of skin extracellular matrix [4]. Generation of knock-out mice has proven the role of lumican in the regulation of the formation of collagen fibrillar networks in skin [4].

Recent studies showed that, in addition to the control of collagen fibril assembly, SLRPs may have other important functions. In particular, lumican and decorin inhibit tumor cell growth [5–7]. We previously demonstrated that lumican inhibits melanoma progression in a mouse experimental model and identified $\beta 1$ integrin as mediator of this effect [5,6].

Integrins interact, via their cytoplasmic domains, with components of the actin cytoskeleton and signaling molecules within the cell [8–12]. The focal adhesion complex proteins, including paxillin and vinculin, interact with the cytoplasmic domain of $\beta 1$ integrin [13–16]. Paxillin is a cytoskeletal component which is localized at the interaction between focal adhesions and the ends of actin stress fibers [13,14]. It binds to the rod domain of vinculin. Vinculin is a possible link between ends of the bundles of actin filaments and the plasma membrane during cell spreading [15–17]. During cell adhesion and spreading on ECM, the remodeling of the actin cytoskeleton is a highly dynamic process which mediates cell motility and cell shape changes [18–22].

Focal adhesion kinase (FAK) plays a central role in cell spreading, differentiation, migration, cell death and cell cycle. Activation of FAK by integrin clustering leads to phosphorylation of FAK, which creates a binding site for the SRC kinase family, and activates cell migration [21]. So, lumican interaction with $\beta 1$ integrin may influence on the cell adhesion and migration.

The aim of this study was to analyze focal adhesion complexes and actin distribution in presence of lumican substratum in comparison to type I collagen or fibronectin substrata.

A375 human melanoma cells are a good model for cell–substratum interaction study because they do not secrete ECM macromolecules [6]. Here, we provide evidence that A375 cells, when in contact with lumican core protein substratum, exhibit a change in the distribution of the $\beta 1$ integrin subunit and a reorganization of actin stress fibers. In parallel, we observed a decrease of the immunostaining of vinculin in focal adhesion complexes without any alterations of the focal adhesion protein and RNA expression. However, in presence of lumican, vinculin accumulated in the cytoplasm, as observed by confocal microscopy. Moreover, vinculin expression was significantly increased in cytosolic fractions in comparison to the cells seeded on type I collagen or fibronectin substrata. In addition, focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosine-397 (pFAK) was significantly decreased. These lumican-induced alterations within melanoma cells might explain, at least in part, the lumican anti-tumor effects.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

Recombinant human lumican core protein was produced as previously described [5]. Type I Collagen was pre-

pared from rat tail tendon by extraction with 0.1 M acetic acid [23]. Human plasma fibronectin and propidium iodide were obtained from AbCys (Paris, France). Hoechst 33342 was obtained from Invitrogen (Cergy-pontoise, France). Doxorubicin was obtained from Pharmacia and UpJohn (St Quentin en Yvelines, France).

The following mouse monoclonal antibodies were used: Anti-human $\alpha 2$ (P1E6) and $\beta 1$ (6S6) subunits of integrins were purchased from Chemicon (Souffelweyersheim, France). Anti-human talin was obtained from AbCys. Anti-human vinculin was obtained from Serotec (Oxford, United Kingdom). The following rabbit polyclonal antibodies were used: Anti-FAK, anti-SRC and anti-SRC phosphorylated at tyrosine-416 (pSRC) from Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, USA); Anti-pFAK from Santa Cruz Biotechnology (Le Perray en Yvelines, France); Anti-human paxillin from Biologend (San Diego, CA, USA); Anti-Ki-67 (clone Mib1) from Dako (Carpinteria, USA). Non-immune mouse IgG (MOPC-21) was purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Alexa Fluor®488-conjugated goat anti-mouse IgG₁ ($\gamma 1$) and Alexa Fluor®488-conjugated goat anti-rabbit IgG (H + L) secondary antibodies were obtained from Invitrogen. To visualize filamentous pool of actin, Alexa Fluor®568-conjugated phalloidin (Invitrogen) was used.

2.2. Migration assays

A375 human melanoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1619) and cultured as recommended by supplier. For migration assays, Transwell® polycarbonate membranes (8 μm pore size, 6.5 mm in diameter) (Costar, Fisher Scientifique Labosi, Elancourt, France) were coated with bovine serum albumin (BSA) or increasing doses of lumican as already described [6]. Fifty thousand cells in 100 μl of DMEM containing 0.2% BSA, were added to the upper chamber. The lower chamber contained 800 μl of medium with 2% BSA and 10% foetal bovine serum (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 [24,25]. Each assay was performed in triplicate. Cell proliferation was appreciated by labelling cell nuclei with anti-Ki-67 antibody and calculating the percentage of positive nuclei on a total of 200 cells.

2.3. Scanning laser confocal microscopy

Sterile glass coverslips, 12 mm in diameter, were coated with either 10 μg of lumican, type I collagen, fibronectin or with a mixture of 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of type I collagen and increasing concentrations of lumican from 5 to 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Non-coated coverslips were used as controls. A375 cells were grown to 80% confluence on coverslips for 24 h. Cells were fixed in ice-cold 4% paraformaldehyde. Integrins were immunodetected using the primary antibodies (1:100 dilution) after overnight incubation at 4 °C. For the detection of focal adhesions [13–17,21], cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: anti-FAK, anti-pFAK, anti-

vinculin, anti-paxillin, anti-talin, anti-SRC, anti-pSRC, and anti-Ki-67. Negative controls were performed using non-immune IgG or by omission of the primary antibody. The second Alexa Fluor®488-conjugated antibodies were used at a dilution of 1:200. The number of positive spots in focal adhesions was counted per A375 cell on each substratum, after determination of a fixed fluorescence intensity threshold via ImageJ software from three random 40× microscope fields of three independent experiments [26]. For double immunolabelling, A375 cells grown for 24 h on coverslips were fixed and then permeabilized as above. Cells were incubated with anti-β1 integrin, vinculin, paxillin, or talin, antibodies overnight at 4 °C and with Alexa Fluor®488-conjugated goat anti-mouse IgG. Alexa Fluor®568-conjugated phalloidin was used to stain filamentous actin [18–20,27–30]. Slides were observed under confocal laser scanning microscope (Olympus FV500). Alternatively, the double immunolabellings presented in the videos (Supplementary material) were performed as follows: Alexa Fluor®488-conjugated phalloidin (Invitrogen) was used and β1 integrin or vinculin was detected via biotinylated secondary antibody (Jackson, West Grove, PA, USA) with Alexa Fluor®568-streptavidin (Invitrogen).

2.4. Western immunoblotting

After 24 h of incubation in a 6-well plate coated with type I collagen, fibronectin or lumican (240 µg/well), 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 Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin and aprotinin]. Total cell proteins (10 µg) were 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 as already described [5]. The following primary antibodies were used for immunoblot analysis: anti-FAK (1:1000 dilution), anti-pFAK (1:200), anti-SRC (1:5000), anti-pSRC (1:200), anti-β1 integrin subunit (1:1000), anti-vinculin (1:1000), anti-talin (1:200) and anti-paxillin (1:1500). The cytosolic protein fractions were obtained as already described [22]. β actin expression was used to normalize cytosolic protein expression [22].

2.5. Real-time Reverse Transcription-PCR analyses

RNA isolation was done using Qiagen RNeasy kit (Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared from 1 µg of total RNA by reverse transcription. FastStart DNA Master hybridization kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) was used for the PCR. The Roche Diagnostics LightCycler was used for amplification and data collection. The primers were F: 5'-GGAGGAATGTTACACGGCT-3' and R: 5'-TTCCTACTGCTGAC TTAGGGATC-3' for human β1 integrin (NM_002211); F: 5'-GCATCGTCTGGCTAATGTTATGAT-3' and R: 5'-TGCTC GTGCTGAGGACTCT-3' for human vinculin (NM_014000); F: 5'-GAAGTCTTCAGGGTCCGATTG-3' and R: 5'-CATTCT CGTACACCTTATCATTCG-3' for human focal adhesion kinase (FAK) (NM_153831); 5'-ATTCCTATGTGGCGACGAG-3'

5'-ATGGCTGGGGTGTGAAG-3' (NM_001101.2), and 5'-AAGATGGGTACCAGCAGCTCTACTG-3' and 5'-AGACGCGCAA GAGCGAGAA-3' for the house keeping gene RPS29 (NM_001032). The denaturation step was 8 min at 94 °C. The amplification step was 50 cycles of 95 °C for 0 s, 60 °C for 10 s, and 72 °C for a time depending on the fragment length.

Fluorescence acquisition was carried out at 72 °C in single mode at the end of the elongation step. The fusion step was done at 65–95 °C (temperature transition 0.2 °C/s) with stepwise fluorescence acquisition. Product specificity was evaluated by melting curve analysis and by electrophoresis in 2% agarose gel. Fluorescence was analyzed by the LightCycler Data Analysis software (Roche Diagnostics). Crossing points were established using the second derivative method. Results were expressed as the target/internal standard (RPS29) concentration ratio of the sample divided by the target/internal standard concentration ratio of the calibrator [31].

2.6. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation. Statistical significance between groups was assessed by unpaired Student's *t*-test. Differences with *P* < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Lumican significantly decreases A375 cell migration

The effect of lumican on A375 cell migration through Transwell® filters is shown in Fig. 1. A significant dose-response inhibition of cell migration was observed when the membrane was coated with increasing amounts of recombinant human lumican. Cell migration was decreased by approximately 30% and 65%, compared to the control, for 5 and 10 µg lumican, respectively.

Ki-67 immunolabelling showed no alteration of A375 cell proliferation when seeded on the lumican substratum (data not shown).

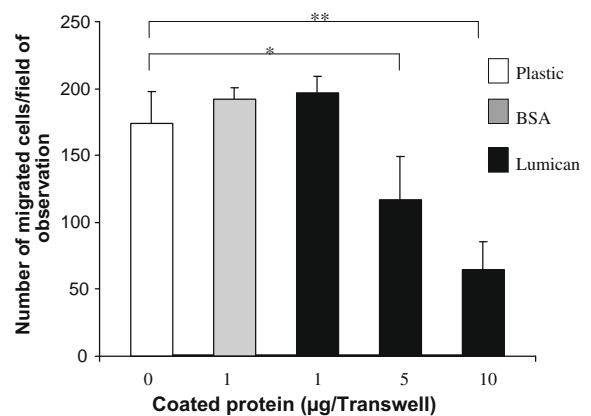


Fig. 1. Recombinant human lumican decreases A375 melanoma cell migration. The chemotactic migration of 5×10^4 cells through Transwell® membranes non-coated or pre-coated with BSA or lumican (1, 5 and 10 µg) was measured after 24 h of incubation at 37 °C. After staining of the cells with crystal violet, the migrated cells were counted in five random fields. The data were expressed as the mean ± SD of three independent experiments done in triplicate. *, significantly different from control (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01).

3.2. Lumican induces altered $\beta 1$ integrin distribution and actin stress fibers reorganization

Previous works from our laboratory showed that $\alpha 2\beta 1$ integrin may be a mediator of A375 cells interaction with lumican [6]. 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 Fig. 2. In comparison to non-coated coverslips (Fig. 2A), type I collagen (Fig. 2B), and fibronectin (Fig. 2C), lumican strongly altered the distribution of $\beta 1$ integrin, which made clusters along the plasma membrane (Fig. 2D, arrows). In contrast, the distribution of $\alpha 2$ integrin was homogeneous along the membrane of A375 cells grown on non-coated coverslips (Fig. 2E), type I collagen (Fig. 2F), fibronectin (Fig. 2G) and lumican (Fig. 2H). In comparison to non-coated coverslips (Fig. 2I), type I collagen (Fig. 2J), and fibronectin (Fig. 2K), lumican strongly altered the organization of thin filaments of F-actin which formed thick submembrane cortical bundles (Fig. 2L, arrowheads). Disturbance of actin integrity was accompanied with a heterogeneous $\beta 1$ integrin distribution as shown by 3D imaging (Supplementary material, Fig. 6 and movies 1–4). Clusters of $\beta 1$ integrin along the plasma membrane without labelling in the cytosol was observed (Fig. 6H, L and movie 4).

There was no change in the distribution of αv , $\alpha 4$ and $\alpha v\beta 3$ integrins along the plasma membrane (data not shown), showing that the alteration of integrin distribution was not a general phenomenon. A375 cells did not express $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ and $\beta 2$ integrin subunits.

3.3. Lumican inhibits A375 cells actin stress fibers and focal adhesions formation

A375 cells seeded on non-coated coverslips, type I collagen, or fibronectin exhibited numerous thin filaments of F-actin stress fibers (Fig. 3A–C) which were arranged towards the vinculin immunolocalizations, (Fig. 3H–J) as demonstrated also in the merge images (Fig. 3O–Q).

In contrast, A375 cells grown on lumican exhibited impaired actin organization, different from that observed in cells grown on other ECM substrata. Cells became rounded in shape and exhibited submembrane actin condensation (Fig. 3D–F), as demonstrated also in the merge images (Fig. 3R–T). This phenomenon was enhanced in a lumican dose-dependent manner.

Disturbance of actin integrity was accompanied with a relocation of vinculin from focal adhesion complexes to the cytoplasm as shown by 3D imaging (Supplementary material, Fig. 7 and movies 5–8). Vinculin labelling in the cytosol was observed on lumican coating (Fig. 7H, L and movie 8).

Vinculin, paxillin and talin are proteins involved in the link between actin filaments and the $\beta 1$ integrin subunit [13–17]. As already described [27], vinculin was observed in focal adhesions at an optical Z plan corresponding to cell attachment to coverslips (Fig. 3H–N). After 24 h of adhesion, the number of positive spots for vinculin per A375 adherent cell was counted. While numerous spots of vinculin were observed on non-coated coverslips (Fig. 3H), type I collagen (Fig. 3I) and fibronectin (Fig. 3J), a significant ($P < 0.01$) decrease of the number of vinculin spots was observed in cells grown on lumican coating in a lumican dose-dependent manner as demonstrated in Fig. 3K–M and also in the merge images (Fig. 3R–T). Similar results were observed for paxillin and talin immunolabellings (data not shown). In addition, A375 cells were plated on a mixture of type I collagen and lumican ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, each). Rounded cells were observed on type I collagen and lumican mixture after 24 h (Fig. 3G, N, U) where decreased F-actin stress fibers were arranged towards the vinculin immunolocalizations (Fig. 3N), as demonstrated also in the merge image (Fig. 3U). Therefore, the lumican-induced submembrane actin cytoskeleton condensation and the decrease of vinculin immunolabelling in focal adhesion complexes were not altered in presence of type I collagen. As shown in the diagram (inset, Fig. 3), the vinculin immunolabelling decreased by approximately 30% and 50%, compared to the control, for 10 and $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ lumican, respectively.

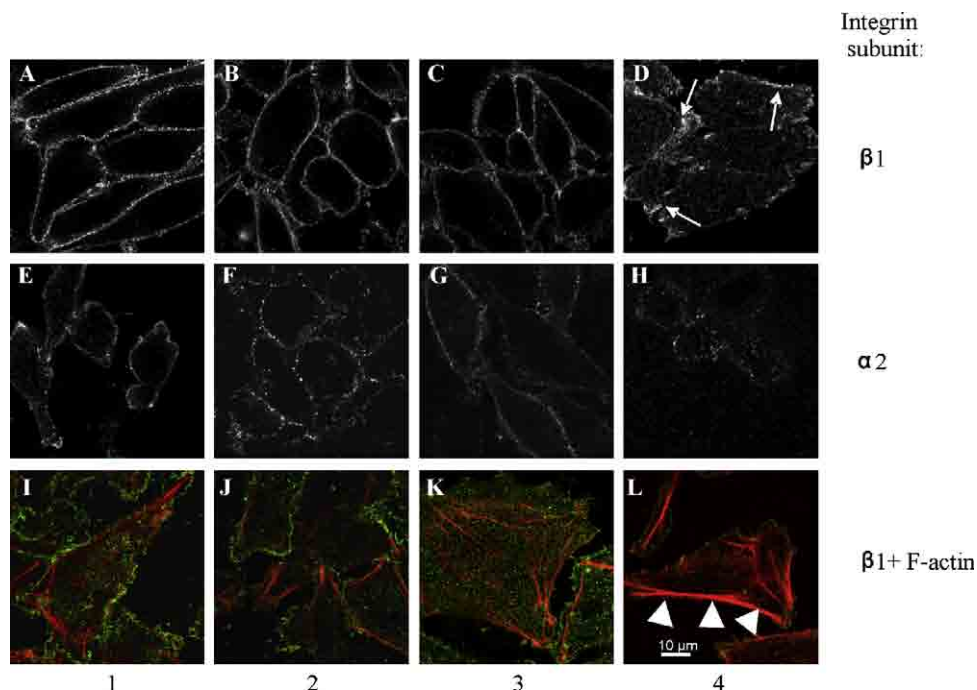


Fig. 2. Effect of different ECM substrata on $\beta 1$, $\alpha 2$ integrin subunits and F-actin distribution of A375 cells. Cells (2×10^4) were seeded either on (1) glass or on coverslips coated with different proteins ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$): (2) type I collagen; (3) fibronectin; (4) lumican. Twenty four hours later, cells were fixed and stained for the different proteins indicated on the right margin, as described in Section 2. Note the clusters of $\beta 1$ subunits (arrows) and the submembrane condensation of actin filaments (arrowheads) in the cells seeded on (4) lumican. Scale bar: $10 \mu\text{m}$. The 3D-reconstructions of actin and $\beta 1$ integrin distribution are included as Supplementary material (Fig. 6, movies 1–4).

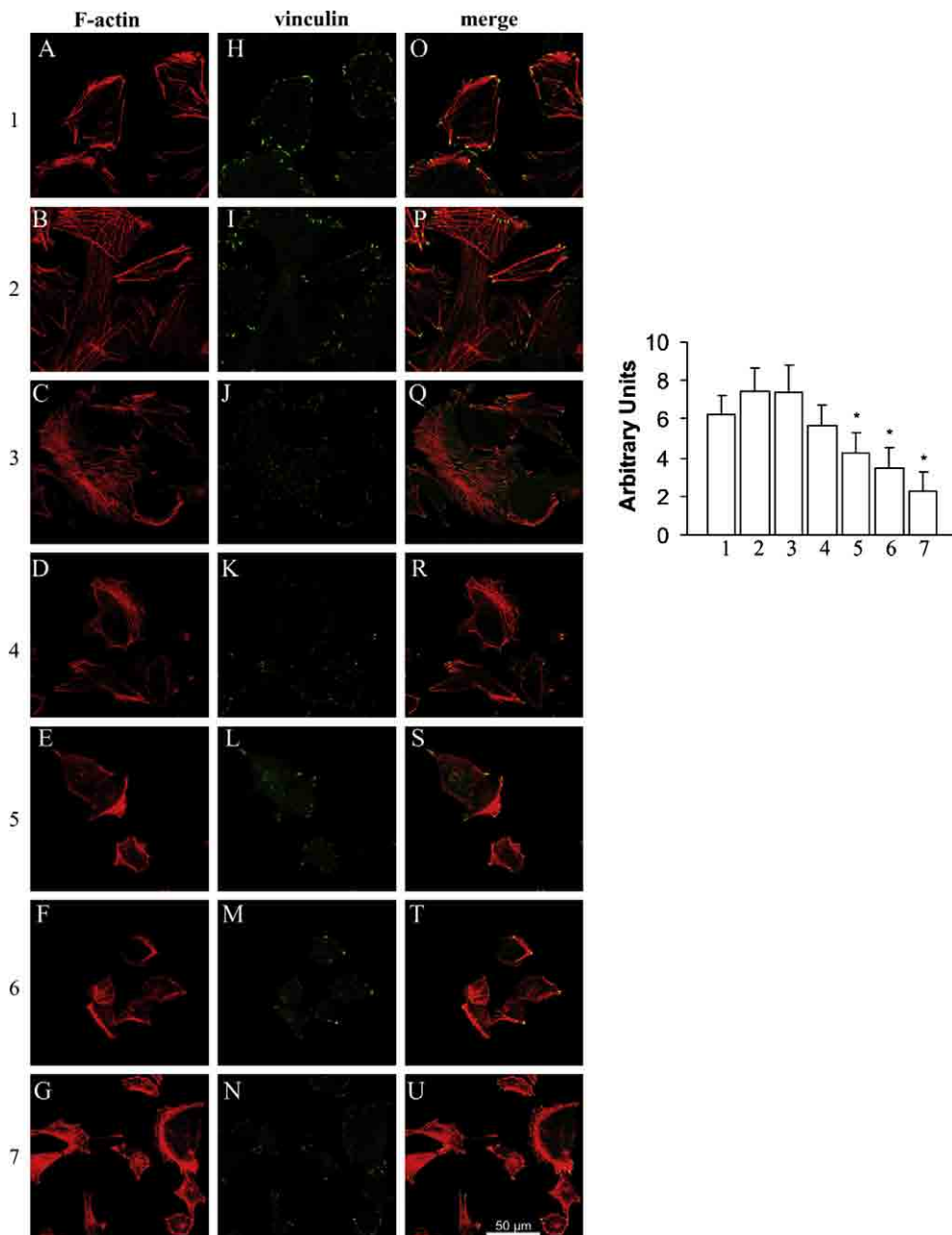


Fig. 3. Effect of different ECM substrata on F-actin and vinculin distribution. A375 cells were plated on (1) glass; (2) type I collagen ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$); (3) fibronectin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$); and (4) increasing quantity of lumican: $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; (5) $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; (6) $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ or on (7) a mixture of type I collagen/lumican ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ each) for 24 h, then fixed and stained for F-actin (A–G, red) or vinculin (H–N, green) as described in Section 2. Right pictures show merged images. Scale bar: $50 \mu\text{m}$. The 3D-reconstructions of actin and vinculin distribution are included as Supplementary material (Fig. 7, movies 5–8). Inset: Quantification of vinculin spots. The positive spots were counted by ImageJ program from three random fields of three independent experiments (*, $P < 0.05$).

3.4. Lumican inhibits the immunolabelling of pFAK in focal adhesions of A375 cells

FAK is a crucial kinase in intracellular cascade activation events initiated by focal adhesions [21]. Activation of FAK by integrin clustering leads to autophosphorylation at tyrosine-397 (FAK-pY397) followed by SRC binding and phosphorylation [21]. Localization of pFAK (Fig. 4A; a–d)

and pSRC (Fig. 4A; e–h) by immunofluorescence confirmed that these proteins were primarily found in focal adhesions [21,27,36]. In comparison to lumican coating, the number of positive spots of focal adhesions in A375 cells was significantly decreased ($P < 0.01$) in cells grown on non-coated coverslips, on type I collagen, and on fibronectin. Lumican significantly inhibited the localization of pFAK (Fig. 4B, upper diagram) and pSRC (Fig. 4B, lower diagram) in focal adhesions.

3.5. Lumican coating does not alter the expression of $\beta 1$ integrin and focal adhesions

No difference was observed by Western immunoblotting of the protein level of $\beta 1$ integrin subunit in A375 cells seeded on type I collagen, fibronectin or lumican, showing that abnormal distribution of $\beta 1$ integrin did not result from changes of this protein content in total proteins from the whole cell extract (Fig. 4C and D). Similar results were observed for vinculin, paxillin, talin, pFAK, total FAK and actin proteins (Fig. 4C and D). In presence of lumican, the pFAK/FAK ratio was slightly decreased (Fig. 4D) but not significantly.

In cytosolic fractions (Fig. 4E and F), the vinculin/ β actin ratio was significantly increased ($P < 0.05$) in the presence of lumican in comparison to type I collagen or fibronectin substrata. The ratio of $\beta 1$ integrin/ β actin ratio did not exhibit significant changes in the presence of lumican coating. These biochemical data confirmed the observations made by 3D imaging (Supplementary material, Fig. 7 and movies 5–8).

No alteration of $\beta 1$ integrin, vinculin, total FAK and actin RNA expression was observed by Real-time Reverse Transcription-PCR analyses (Fig. 5).

4. 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-tumor component from the ECM [5]. Moreover, we recently identified $\beta 1$ integrin as mediator of A375 melanoma cell interaction on lumican [6]. These melanoma cells constitute a good model to study cell–substratum interactions because they do not express endogenous ECM proteins such as lumican, type I collagen or fibronectin, which might interfere in the experiments.

Ki-67 staining demonstrated that the cell proliferation rate was similar from one ECM substratum to another, showing that A375 cells viability and proliferation were not altered on the lumican substratum [34].

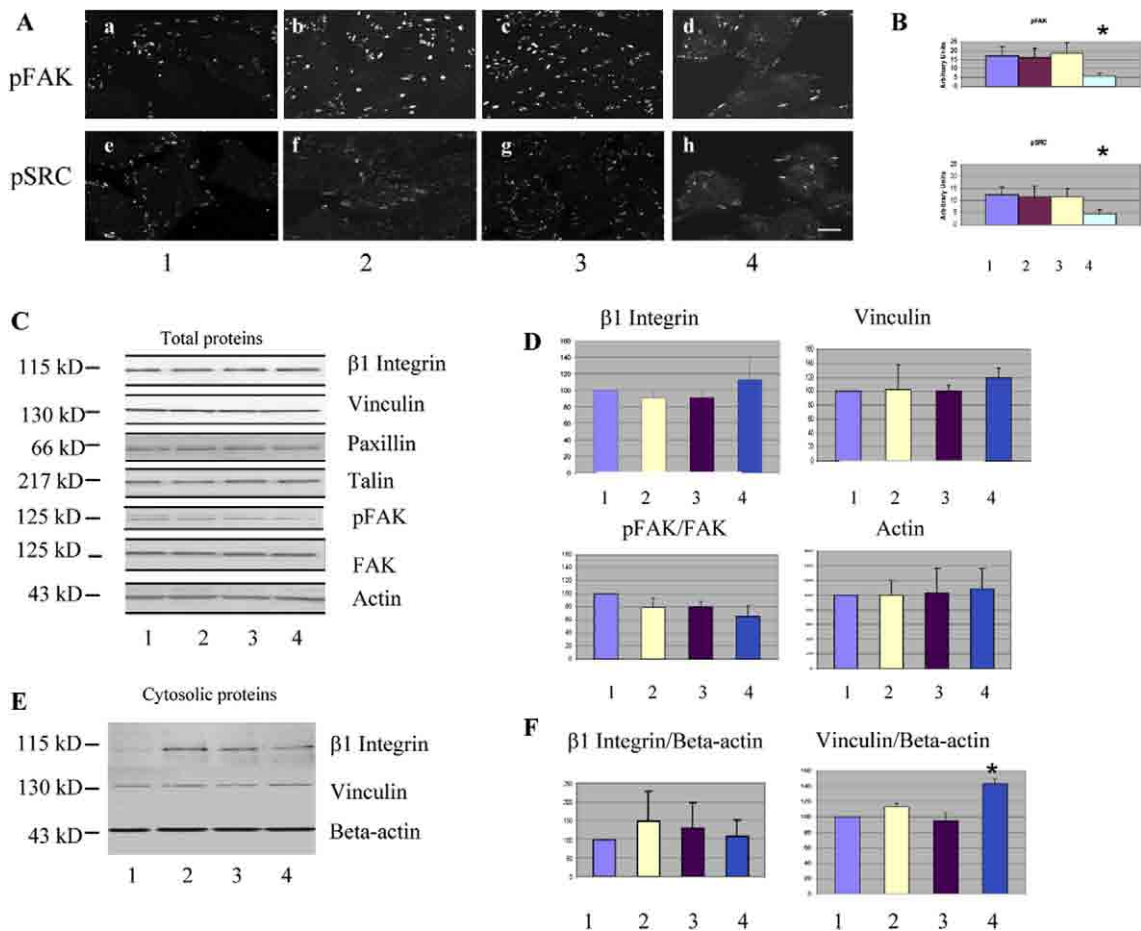


Fig. 4. Expression of pFAK and pSRC in focal adhesions of cells plated on different substrata. (A) Cells were plated on (1) glass, (2) type I collagen ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), (3) fibronectin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) or (4) lumican ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) for 24 h. pFAK (a–d) and pSRC (e–h) were detected with specific antibodies as described in Section 2. The typical picture from one Z plan corresponding to cell–substratum interaction is shown. Scale bar: $10 \mu\text{m}$. (B) Quantification of positive spots of pFAK (upper diagram) and pSRC (lower diagram) in cells plated on the different substrata (as above). Other conditions are the same as on Fig. 3. (C, D) Western immunoblotting (C) of proteins from whole cell extract grown on the different substrata (1–4 as in A) and densitometric estimation (D) of the intensity of the bands for $\beta 1$ integrin, vinculin, pFAK, total FAK and β actin proteins in A375 cells. The migration position of the band and the name of the protein are given on the left and right margins, respectively. (E, F) Western immunoblotting (E) of $\beta 1$ integrin, vinculin, and β actin proteins in cytosolic fractions of A375 cells grown on the different substrata (1–4 as in A) and densitometric estimation (F) of the $\beta 1$ integrin to β actin and vinculin to β actin vinculin ratios.

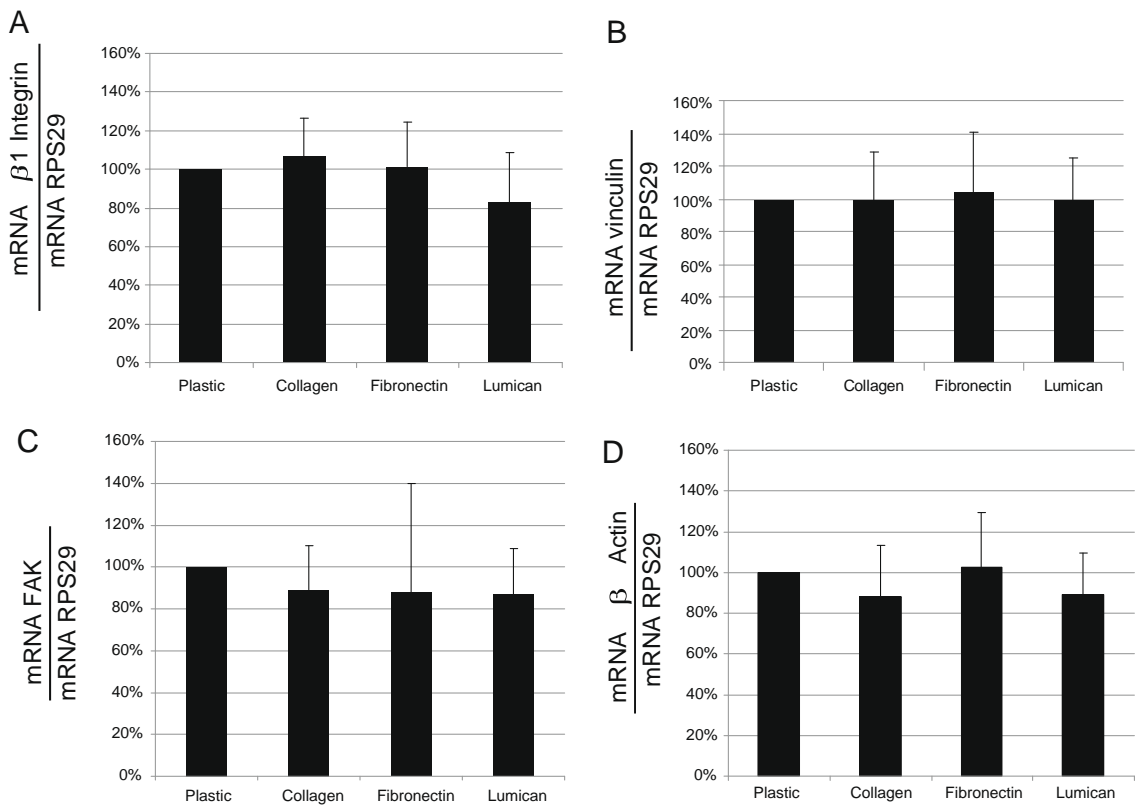


Fig. 5. Evaluation of $\beta 1$ integrin, vinculin, FAK and β actin mRNA levels in A375 cells. Total RNA was isolated from A375 cells grown on plastic or on type I collagen or fibronectin or lumican coatings ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), and then used for cDNA synthesis, as described in Section 2. mRNA levels of $\beta 1$ integrin (A), vinculin (B), FAK (C) and β actin (D) were analyzed by Real-time RT-PCR assay. Results were expressed as the target/internal standard (RPS29) concentration ratio of the sample divided by the target/internal standard concentration ratio of the calibrator. No difference was observed between the ECM substrata.

Integrins have been described to modulate melanoma cell invasion [6,8,9]. We observed a heterogeneous distribution of $\beta 1$ integrin subunit in A375 cells seeded on lumican substratum. The lack of alteration of αv , $\alpha 4$, and $\alpha v\beta 3$ integrin distribution showed that the alteration of $\beta 1$ integrin distribution was specific. A375 cell adhesion on the different ECM substrata was similar (data not shown). Therefore, we investigated whether the anti-invasive effect of lumican on melanoma cells might result from an impaired migratory cell phenotype. Indeed, we observed that the actin network was reorganized in the presence of lumican with a disappearance of the developed stress fibers and a reorganization in large bundles of actin filaments, as already described [22]. Lumican mixed with type I collagen induced changes in actin cytoskeleton similar to those observed in A375 cells grown on lumican only, which suggests that the interaction between lumican and collagen in vivo do not jeopardize the lumican-induced cytoskeletal alterations observed in vitro.

Interactions between integrins and ECM components involve focal adhesion contacts connecting the cytoskeleton [35,36]. Focal adhesions were observed at an optical Z level corresponding to the contact between cells and coverslips. Lumican induced a significant decrease of vinculin, paxillin, and talin immunolabelling in focal adhesions. On the contrary, no change at the protein level

was observed by Western immunoblotting. This result might be explained by the fact that only the positive spots at the Z plan, which correspond to the contact between cells and substratum, were counted by immunocytochemistry while total proteins from permeabilized cells were analyzed by Western immunoblotting. The absence of lumican-induced changes of the expression of $\beta 1$ integrin, vinculin, paxillin and talin proteins and RNA suggests a rapid cytoskeletal remodeling, without alterations of the protein pool, characteristic for the preliminary phase of migratory versus stationary phenotype conversion. We suggest that lumican might induce a heterogeneous distribution of $\beta 1$ integrin at the cell surface and an accumulation of focal adhesion proteins such as vinculin in the cytosol, as observed by confocal microscopy and illustrated in the videos (Supplementary material). The redistribution of vinculin in the cytoplasm of cells seeded on lumican was confirmed by the significant accumulation of vinculin in the cytosolic fraction, in comparison to cells seeded on the other ECM components. These results suggest that the presence of lumican in the ECM inhibits new focal adhesion formation by blocking the recycling of vinculin or the supply of vinculin to new focal adhesions. Another possibility is that a signal may be provided by lumican to induce the dismantling of the complexes. The disruption of vinculin links

between actin filaments and $\beta 1$ integrin could lead to a destabilization of focal adhesion complexes and an inhibition of cell motility. As reported by us and others [22,37–45], the major reorganization of cytoskeleton and the prevention of the adhesive complexes turnover may alter the ability of melanoma cells to migrate.

FAK co-localizes with integrins in focal adhesions and is an important regulator of cell attachment and spreading [21,27,36,41–49]. The phosphorylation of FAK was described to promote aggressive melanoma phenotype [43]. In our experiments, after 24 h of seeding, the number of pFAK positive focal adhesions at the protrusion edge was significantly increased in cells seeded on type I collagen or fibronectin-coated coverslips, compared to lumican-coated coverslips. These results are in agreement with those of Fu et al. [48], who reported phosphorylation of FAK-pY397 when A375 cells were plated on fibronectin-coated dishes and loss of phosphorylation of FAK-pY397 when A375 cells were in suspension. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK-pY397 was already described in human astrocytoma cells [36]. In this paper, Hamadi and collaborators showed that phosphorylation of FAK-pY397 specifically increased the time of residency of FAK at focal adhesions, but not in the cytosol, induced disassembly of focal adhesions at the cell tail, and promoted cell motility [36]. These data are in agreement with the significant decrease of pFAK expression that we observed by immunocytochemistry in A375 cells grown on lumican for 24 h. At shorter time of cell adhesion (5, 10, 15, and 20 min), a constitutive phosphorylation of pFAK was observed in A375 cells grown on every extracellular matrix substratum that we tested (lumican, type I collagen, or fibronectin), (data not shown). Constitutively active FAK was already described in human malignant melanoma [32]. Therefore, we suggest that lumican effect on cytoskeletal changes might involve pFAK-mediated signaling, even if the constitutive phosphorylation of pFAK in A375 melanoma cells did not allow us to observe a significant decrease of the pFAK/FAK ratio by Western immunoblotting. In contrast to the observations of Seomun and collaborators on human corneal epithelial cells [33], the pAKT and pERK transduction pathways did not exhibit any significant differences in the A375 cells grown on lumican substratum (data not shown). However, we can not exclude the involvement of other signals like the small GTPases RhoA and Rac1 pathway which may be involved in the inhibition by lumican of the A375 cell migration [42,50].

In conclusion, we showed that lumican induces a reorganization of actin cytoskeleton, reduces focal adhesions, and impairs $\beta 1$ integrin distribution in melanoma cells. The cytoskeletal changes and the down-regulation of pFAK transduction pathway induced by lumican substratum, may 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 inhibition of melanoma cell migration.

Conflicts of interest statement

None declared.

Acknowledgments

The financial support of the Institut National du Cancer (ACi 2007–2009 Cancéropôle Grand-Est), FEDER (CPER 2007), and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité de la Marne) is gratefully acknowledged. We thank Dr. C. Terryn and Dr. H. Kaplan for assistance in confocal microscopy. We thank S. Gobert for linguistic expertise.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.canlet.2009.03.032.

References

- [1] R.V. Iozzo, Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 609–652.
- [2] 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.
- [3] Z. Naito, The role of small leucine-rich proteoglycan (SLRP) family in pathological lesions and cancer cell growth, *J. Nippon Med. Sch.* 73 (2005) 137–145.
- [4] S. Chakravarti, W.M. Petroll, J.R. Hassell, J.V. Jester, J.H. Lass, J. Paul, D.E. Birk, Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000) 3365–3373.
- [5] 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.
- [6] M.F. D'Onofrio, S. Brézillon, T. Baranek, C. Perreau, P.J. Roughley, F.X. Maquart, Y. Wegrowski, Identification of $\beta 1$ integrin as mediator of melanoma cell adhesion to lumican, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365 (2008) 266–272.
- [7] E. Schonherr, C. Sunderkotter, L. Schaefer, S. Thanos, S. Grässel, A. Oldberg, R.V. Iozzo, M.F. Young, H. Kresse, Decorin deficiency leads to impaired angiogenesis in injured mouse cornea, *J. Vasc. Res.* 41 (2004) 499–508.
- [8] D.M. Ramos, E.D. Bertson, R.H. Kramer, Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells, *Cancer Res.* 50 (1990) 728–734.
- [9] I.R. Hart, M. Birch, J.F. Marshall, Cell adhesion receptor expression during melanoma progression and metastasis, *Cancer Metastasis Rev.* 10 (1991) 115–128.
- [10] F.G. Giancotti, E. Ruoslahti, Integrin signalling, *Science* 285 (1999) 1028–1032.
- [11] A.E. Aplin, A. Howe, S.K. Alahari, R.L. Juliano, Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 197–263.
- [12] M.J. Humphries, Cell adhesion assays, *Mol. Biotechnol.* 18 (2001) 57–61.
- [13] L. Lamorte, S. Rodrigues, V. Sangwan, C.E. Turner, M. Park, Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/ β -PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts, *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 2818–2831.
- [14] A.M. Vallés, M. Beuvin, B. Boyer, Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 44490–44496.
- [15] R.M. Ezzell, W.H. Goldmann, N. Wang, N. Parasharama, D.E. Ingber, Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton, *Exp. Cell Res.* 231 (1997) 14–26.
- [16] W.H. Ziegler, R.C. Liddington, D.R. Critchley, The structure and regulation of vinculin, *Trends Cell Biol.* 16 (2006) 453–460.
- [17] G. Giannone, G. Jiang, D.H. Sutton, D.R. Critchley, M.P. Sheetz, Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-

- cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 409–419.
- [18] A. Schmidt, M.N. Hall, Signaling to the actin cytoskeleton, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14 (1998) 305–338.
- [19] B. Geiger, A. Bershadsky, R. Pankov, K.M. Yamada, Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 793–805.
- [20] A. Lambrechts, M. Van Troys, C. Ampe, The actin cytoskeleton in normal and pathological motility, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 1890–1909.
- [21] J.T. Parsons, K.H. Martin, J.K. Slack, J.M. Taylor, S.A. Weed, Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement, *Oncogene* 19 (2000) 5606–5613.
- [22] A. Radwanska, D. Baczynska, D. Nowak, S. Brézillon, A. Popow, FX. Maquart, Y. Wegrowski, M. Malicka-Blaszkiewicz, Lumican affects actin cytoskeletal organization in human melanoma A375 cells, *Life Sci.* 83 (2008) 651–660.
- [23] K.A. Piez, E.A. Eigner, M.S. Lewis, *Biochemistry* 2 (1963) 58–66.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] E. Meijering, M. Jacob, J.C. Sarria, P. Steiner, H. Hirling, M. Unser, Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images, *Cytometry A* 58 (2004) 167–176.
- [27] X. Jiang, R. Jacamo, E. Zhukova, J. Sinnett-Smith, E. Rozengurt, 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.* 267 (2006) 816–828.
- [28] K.N. Sulochana, H. Fan, S. Jois, V. Subramanian, F. Sun, R.M. Kini, R. Ge, Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27935–27948.
- [29] N. Foure, J.M. Millot, R. Garnotel, P. Jeannesson, In situ analysis of doxorubicin uptake and cytotoxicity in a 3D culture model of human HT-1080 fibrosarcoma cells, *Anticancer Res.* 26 (2006) 4623–4626.
- [30] N. Foure, E. Millerot-Serruot, R. Garnotel, J.M. Zahm, N. Bonnet, J.M. Millot, P. Jeannesson, Extracellular matrix proteins protect human HT1080 cells against the antimigratory effect of doxorubicin, *Cancer Sci.* 99 (2008) 1699–1705.
- [31] L. Ramont, S. Brassart-Pasco, J. Thevenard, A. Deshorgue, L. Venteo, J.Y. Laronze, M. Pluot, J.C. Monboisse, FX. Maquart, The NC1 domain of type XIX collagen inhibits in vivo melanoma growth, *Mol. Cancer Ther.* 2 (2007) 506–514.
- [32] O. Kahana, M. Micksche, I.P. Witz, I. Yron, The focal adhesion kinase (P125FAK) is constitutively active in human malignant melanoma, *Oncogene* 21 (2002) 3969–3977.
- [33] Y. Seomun, C.K. Joo, Lumican induces human corneal epithelial cell migration and integrin expression via ERK 1/2 signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008) 221–225.
- [34] A.L. McKeague, D.J. Wilson, J. Nelson, Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines, *Br. J. Cancer* 88 (2003) 125–131.
- [35] R.O. Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* 69 (1992) 11–25.
- [36] A. Hamadi, M. Bouali, M. Dontenwill, H. Stoeckel, K. Takeda, P. Rondé, Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 4415–4425.
- [37] C. Helige, R. Hofmann-Wellenhof, R. Fink-Puches, J. Smoll, Mofarotene-induced inhibition of melanoma cell motility by increasing vinculin-containing focal contacts, *Melanoma Res.* 14 (2004) 547–554.
- [38] H. Yamaguchi, J. Condeelis, Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 642–652.
- [39] D. Dang, J.R. Bamburg, D.M. Ramos, Alphavbeta3 integrin and cofilin modulate K1735 melanoma cell invasion, *Exp. Cell Res.* 31 (2006) 468–477.
- [40] S. Wiesner, A. Lang, R. Fässler, Local call: from integrins to actin assembly, *Trends Cell Biol.* 16 (2006) 327–329.
- [41] Y. Hegerfeldt, M. Tusch, E.B. Brocker, P. Friedl, Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell–cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies, *Cancer Res.* 62 (2002) 2125–2130.
- [42] E. Tufvesson, G. Westergren-Thorsson, Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signaling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration, *J. Cell Sci.* 116 (2003) 4857–4864.
- [43] A.R. Hess, M.J. Hendrix, Focal adhesion kinase signaling and the aggressive melanoma phenotype, *Cell Cycle* 5 (2006) 478–480.
- [44] S. Dedieu, B. Langlois, J. Devy, B. Sid, P. Henriot, H. Sartelet, G. Bellon, H. Emonard, L. Martiny, LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities, *Mol. Cell Biol.* 28 (2008) 2980–2995.
- [45] R.L. Juliano, S. Haskill, Signal transduction from the extracellular matrix, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 577–585.
- [46] S.M. Frisch, K. Vuori, E. Ruoslahti, P.Y. Chan-Huy, Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase, *J. Cell Biol.* 134 (1996) 793–799.
- [47] D.D. Schlaepfer, K.C. Jones, T. Hunter, 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.* 18 (1998) 2571–2585.
- [48] Y.M. Fu, H. Zhang, M. Ding, Y.Q. Li, X. Fu, Z.X. Yu, G.G. Meadows, Specific amino acid restriction inhibits attachment and spreading of human melanoma via modulation of the integrin/focal adhesion kinase pathway and actin cytoskeleton remodelling, *Clin. Exp. Metast.* 21 (2004) 587–598.
- [49] S.K. Hanks, M.B. Calalb, M.C. Harper, S.K. Patel, Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 8487–8491.
- [50] E.A. Clark, T.R. Golub, E.S. Lander, R.O. Hynes, Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC, *Nature* 406 (2000) 532–535.

RESUME

Le lumicanne est une protéine riche en leucine, appartenant à la famille des SLRP, qui est retrouvé sous forme glycoprotéique dans la matrice extracellulaire du derme. Nous avons précédemment montré que le lumicanne inhibait la progression du mélanome *in vivo* (Vuillermoz et coll. 2004) et augmentait l'adhésion des cellules de mélanome (D'Onofrio et coll. 2008). Dans l'étude que nous présentons, nous avons caractérisé les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la migration cellulaire par le lumicanne. Nous avons identifié le médiateur du lumicanne dans cet effet inhibiteur. En utilisant des siRNA dans le but d'invalider la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$ des cellules A375, et en utilisant des cellules CHO-WT et CHO-A2, nous avons montré que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est essentielle pour médier l'inhibition de la migration par le lumicanne. De plus, le lumicanne est capable de se fixer sur un site de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ de manière indépendante des cations divalents et d'interagir avec le domaine $\alpha 2I$ (Kd=300 nm). Nous avons également localisé la séquence du lumicanne responsable de l'inhibition de la migration, en utilisant différents fragments recombinants et peptides synthétiques issus du lumicanne. La séquence est située au sein de la répétition riche en leucine (LRR) 9. Nous avons proposé le nom de lumcorine (lumicanne core protéine) pour le peptide dérivé de cette séquence. Lumcorine inhibe la migration des cellules de mélanome. Cette inhibition n'est pas dû à un effet cytotoxique ou apoptotique de lumcorine, ou a une inhibition de l'adhésion cellulaire, et n'est pas altéré en présence de collagène. A l'inverse, lumcorine inhibe la phosphorylation de la tyrosine 397 de la protéine FAK, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec le lumicanne (Brézillon et coll. 2009). Par ailleurs, les lysines présentes dans lumcorine et correspondantes au lysine 265 et 267 du lumicanne semblent être nécessaires pour induire l'inhibition de la migration. Le lumicanne et lumcorine sont capable d'inhiber la migration de cellules non transformées comme les fibroblastes dermiques, suggérant un rôle régulateur du lumicanne dans la migration cellulaire impliquée dans des processus physiologique autre que le cancer.

MOTS CLES

Lumicanne – SLRP – Migration cellulaire – Mélanome – Intégrine $\alpha 2\beta 1$

Coordonnées

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire
CNRS UMR 6237 MEDyC – IFR53 Interactions Cellules-Microenvironnement
UFR Médecine – 51 rue Cognacq-Jay
51095 Reims Cedex
E-mail : cedric.zeltz@wanadoo.fr