

025 Tumor-stromal cell interactions modulate metalloproteinase and kalli Krein expression in direct and indirect co-culture cell models

B. Brillet, S. Petiot, S. Iochmann, G. Gaud, C. Planque, C. Blechet, N. Heuze-Vourc'h, Y. Gruel, Y. Courty, P. Reverdiau

Inserm U618, Université François-Rabelais de Tours, France.

iochmann@med.univ-tours.fr

Introduction: The crosstalk between tumor cells and surrounding stromal fibroblasts is now considered crucial for cancer progression, particularly in invasive tumors such as lung carcinomas. Tumor-stromal cell interactions might provide signal for regulating protease and protease inhibitor secretion in the tumoral microenvironment and modulate extracellular matrix (ECM) proteolysis and then tumor invasion. The aim of this study was to develop co-culture models with cancer cells, derived from a non-small cell lung carcinoma (NSCLC), and fibroblast cells. Expression of several MMPs, kalli crein 6 (KLK) and Tissue Factor Pathway inhibitor 2 (TFPI-2) was then measured in these models.

Material and methods: Two *in vitro* co-culture models were developed to evaluate the effects of direct or indirect contact between NSCLC NCI-H460 cells and CCD19-Lu fibroblast cells. In direct co-culture, both cells (ratio 1 :1) were cultured for 24 h in serum free medium. In indirect co-culture, conditioned media were collected from either confluent tumoral cells or fibroblasts grown in serum free medium during 24 h. Transcript levels of MMP-1, -2, -3, -9, -13 and -14, EMMPRIN (Extracellular Matrix MetalloProteinase Inducer), KLK6 and TFPI-2 were measured using specific quantitative real-time RT-PCR. Protein expressions were evaluated by Western Blotting and immunofluorescence staining.

Results: We found a 3-fold and 8-fold increase of MMP-3 and MMP-9 expression respectively in the direct co-culture compared to cells grown alone. Although the level was lower, KLK6 mRNA was also enhanced in direct co-culture. In indirect co-culture with CCD19Lu cultured with NCI-H460 conditioned medium, we observed an increase in MMP-1, -3, -9 and TFPI-2 transcripts. Except for MMP3 and KLK6, no difference in transcripts level were observed in the other indirect co-culture model, i. e NCI-H460 grown in CCD19Lu conditioned medium.

Conclusion: Our results indicate that direct or indirect contacts between tumors and surrounding fibroblasts modulate the expression of various proteinases. This effect might be mediated by soluble or/and cell surface factors. Further investigations will be required to identify them.

026 Impact de l'expression d'un inhibiteur de protéases, le TFPI-2, dans le micro-environnement tumoral pulmonaire

G. Gaud¹, S. Iochmann¹, B. Brillet¹, S. Petiot¹, C. Blechet¹, V. Chabot², N. Heuze-Vourc'h¹, Y. Gruel¹, P. Reverdiau¹

¹ Unité Inserm U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires » et IFR 135 Tours, France.

² EFS Centre-Atlantique, Tours, France.

guillaume.gaud@etu.univ-tours.fr

Introduction : Le TFPI-2 (*tissue factor pathway inhibitor 2*) est un inhibiteur de protéases à sérine majoritairement sécrété vers la matrice extra-cellulaire (MEC). En inhibant la plasmine, le TFPI-2 peut limiter l'activation des métalloprotéases matricielles (MMP), responsables de la dégradation de la MEC, et ainsi réduire l'invasion tumorale. Le TFPI-2 est, en effet, faiblement synthétisé par les cellules tumorales, particulièrement invasives, et très exprimé dans les cellules peu invasives. Nous avons donc évalué l'impact de l'inactivation stable du TFPI-2 sur l'invasion de cellules tumorales pulmonaires en mettant en œuvre une stratégie d'ARN interférence basée sur des micros ARN.

Méthodes : Le TFPI-2 a été inactivé *via* l'expression de miRNA spécifiques dans des cellules humaines NCI-H460, issues d'un carcinome pulmonaire à grandes cellules. Plusieurs clones (1b et 2b) ont été retenus pour étudier l'impact de cette inhibition sur les fonctions des cellules NCI-H460. Parallèlement, l'effet de cette inhibition sur les interactions cellules tumorales/fibroblastes du stroma a été étudié. L'expression transcriptionnelle des gènes du TFPI-2, des MMP-1, -2, -3, -7, -9, -13, -14 et de l'EMMPRIN a été quantifiée par RT-PCR en temps réel, dans les clones et les cellules en coculture. Le potentiel invasif des cellules a été mesuré par migration à travers la membrane poreuse d'un insert nu ou recouvert de Matrigel, mimant la MEC. L'adhérence des cellules à différentes protéines de la MEC a également été évaluée et la prolifération cellulaire mesurée par un test MTT.

Résultats : Le pouvoir invasif des clones 1b et 2b, pour lesquels l'expression du TFPI-2 a été inactivée de plus de 90 %, est augmenté de 2 à 3 fois, ce qui pourrait être expliqué par une augmentation de l'adhérence des cellules aux protéines de la MEC, et notamment à la laminine et au collagène IV. De plus, nous avons montré que les clones 1b et 2b sur-expriment les MMP-1 et -3 et sous-expriment les MMP-2 et -7. En revanche, le niveau d'expression du TFPI-2 n'a eu aucun effet sur la prolifération cellulaire. En condition de coculture, mettant en jeu des fibroblastes et des cellules tumorales, nous avons observé une potentialisation de l'expression transcriptionnelle des MMP-1, -3, -7 et -13 lorsque les cellules tumorales sont inactivées pour le TFPI-2.

Conclusions : Cette étude nous a permis de démontrer que le TFPI-2 a un impact sur les gènes impliqués dans le remodelage de la MEC et pourrait jouer un rôle inhibiteur de la protéolyse péri-cellulaire notamment lors des interactions cellules tumorales/stroma. Ceci suggère un rôle inhibiteur important du TFPI-2 vis-à-vis de la progression tumorale expliquant l'agressivité des tumeurs l'exprimant faiblement.