



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOLOGY

Etude des effets de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur des cellules endothéliales humaines en culture par l'approche protéomique

Ramelot, Nancy

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

**ETUDE DES EFFETS DE L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE (LPA) SUR DES CELLULES
ENDOTHELIALES HUMAINES EN CULTURE PAR L'APPROCHE PROTEOMIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Nancy RAMELOT

Septembre 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 – Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude des effets de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur des cellules endothéliales humaines en culture par l'approche protéomique

RAMELOT Nancy

Résumé

Le LPA est un métabolite lipidique ayant des effets pléiotropiques dans de nombreux types cellulaires. Il se lie à des récepteurs membranaires couplés à des protéines G et est capable d'induire l'expression de molécules d'adhérence, la prolifération et la migration cellulaires, l'agrégation des plaquettes, de diminuer la perméabilité endothéliale, de stimuler la formation de fibres de stress, ... Il semblerait également avoir un rôle dans l'athérosclérose et sa concentration augmente dans les plaques d'athérome.

Ce mémoire vise à mieux comprendre les effets du LPA sur un modèle de cellules endothéliales en culture, les cellules EAhy926 et ce, dans le but, à long terme, de mieux comprendre le rôle éventuel du LPA dans l'athérogenèse. Pour ce faire, ce travail a été divisé en deux parties. Dans un premier temps, nous avons étudié la sécrétion du MCP-1 par les cellules EAhy926 stimulées au LPA, à l'aide d'un ELISA MCP-1. Ce test a révélé que le LPA était capable de stimuler la sécrétion de cette chémokine. Ensuite, les effets du LPA ont été testés sur l'activation du facteur transcriptionnel AP-1 en présence ou non de divers inhibiteurs affectant principalement des cascades de kinases, via un test colorimétrique. Ce test a montré l'implication des MAPK. Enfin, un western blot a été effectué afin de vérifier que le LPA induisait bien la phosphorylation des MAPK de type ERK 1/2.

Dans une seconde étape, nous avons voulu mettre en évidence des variations d'expression au niveau protéique entre des cellules EAhy926 stimulées ou non au LPA. Pour cela, nous avons utilisé une approche sans *a priori* à l'aide des gels 2D via la méthode DIGE. Des résultats préliminaires montrent que le LPA diminue l'expression de plusieurs protéines, dont la vimentine.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2004

Promoteur : Prof. M. Raes

Liste des abréviations

AC	Adénylate Cyclase
Ac	Anticorps
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	Activated Protein-1
Apo	Apolipoprotéine
APS	Ammonium PerSulfate
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAEC	Bovine Aortic Endothelial Cells
BSA	Bovine Serum Albumine
BVA	Biological Variation Analysis
CML	Cellules Musculaires Lisses
CoA	Coenzyme A
CTL	contrôle
Cys	Cystéine
Da	Dalton
DAG	DiAcylGlycérol
DHG	Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose
DIA	Differential In-gel Analysis
DIGE	Difference In-Gel Electrophoresis
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	DiMethylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DO	Densité Optique
DOC	DéOxyCholate
DTT	DiThioTréitol
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDG	Endothelial Differentiation Gene
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétate de sodium
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
ERK 1	Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 ou p44
ERK 2	Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 ou p42
ESI	ElectroSpray Ionization
FBHE	Fœtal Bovine Heart Endothelial
FURA-2-AM	FURA-2-AcétoxyMethyl ester
GC	Chromatographie en phase Gazeuse
GDP	Guanosine DiPhosphate
GPCR	Récepteur Couplé aux Protéines G
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3	Glycogen Synthase Kinase-3
GTP	Guanosine TriPhosphate
HAEC	Human Aortic Endothelial Cells
HB	Hypotonic Buffer
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance

HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HRP	Horse Radish Peroxydase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
ICAT	Isotope Coded Affinity Tag
IEF	IsoElectroFocalisation
IgG	Immunoglobuline G
IL-1	Interleukine-1
IL-6	Interleukine-6
IL-8	Interleukine-8
IP ₃	Inositol triphosphate
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	kiloDalton
LCAT	Lécithine Cholestérol AcylTransférase
LDL	Low Density Lipoprotein
LPA	LysoPhospatidic Acid
LPS	LipoPolySaccharide
Lyso-PC	Lyso-Phosphatidyl Choline
Lyso-PE	Lyso-Phosphatidyl Ethanolamine
Lyso-PLD	Lyso-Phospholipase D
Lyso-PS	Lyso-Phosphatidyl Serine
MAG	MonoAcylGlycérol
MALDI	Matrix Assisted Laser Detection Ionization
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK	MAPK Kinase
MAPKKK	MAPK Kinase Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEK	MAPK ERK Kinase
Met	Méthionine
mm-LDL	Minimally modified LDL
MMP	Matrix MetalloProteinase
MOPS	acide 3-morpholino-propanesulfonique
Mox-LDL	LDL moyennement oxydée
MS	Spectrométrie de Masse
MUDPIT	MUlti-Dimensional Protein Identification Technology
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NO	Oxyde Nitrique
NP-40	Nonidet P-40
ox-LDL	LDL oxydée
PA	Phosphatidic Acid
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	PhosphatidylCholine
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PE	PhosphatidylEthanolamine
p-ERK 1	Phospho-ERK 1 (ou pp44)
p-ERK 2	Phospho-ERK 2 (ou pp42)
PH	Pleckstrin Homology
PI	Point Isoélectrique
PI ₃ K	PhosphatidylInositol 3 Kinase
PIP ₃	Phosphoinositol 3,4,5 triphosphate

PIB	Protease Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protéin Kinase C
PLA ₂	PhosphoLipase A2
PLC	PhosphoLipase C
PLD	PhosphoLipase D
PM	Poids Moléculaire
PMA	Phorbol Myristate Acetate
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PRDX	Péroxirédoxine
PS	PhosphatidylSérine
PTX	Toxine Pertussique
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
Q-TOF	Quadripole Time Of Flight
ROS	Reactive Oxygen Species
RPC	Reversed Phase Resine
RPM	Rotation Par Minute
S ₁ P	Sphingosine 1 Phosphate
SCX	Strong Cation Exchange
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium DodecylSulfate/polyacrylamide gel Electrophoresis
sPLA ₂	Phospholipase A ₂ sécrétoire
Ser	Sérine
SOS	Son Of Sevenless
SPC	SphingosylPhosphorylCholine
SRF	Serum Response Factor
TBS	Tris Buffer Saline
TEMED	TétraMéthyl Ethylène Diamine
TF	Facteur Tissulaire
Thr	Thréonine
TMB	TétraMethylBenzidine
TNF \square	Tumor Necrosis Factor \square
TOF	Time Of Flight
Tyr	Tyrosine
\square l	microlitre
\square g	microgramme
URBC	Unité de Recherche en Biologie Cellulaire
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	Facteur de von Willebrand

Table des matières

<u>I. Introduction</u>	1
<i>Avant-propos</i>	<i>1</i>
1. <u>L'athérosclérose</u>	<i>1</i>
1.1. <u>Lésions de l'athérosclérose</u>	<i>1</i>
1.1.1. <u>La strie lipidique (« Fatty streak »)</u>	<i>1</i>
1.1.2. <u>La lésion intermédiaire fibro-graisseuse (« Fibrofatty lesion »)</u>	<i>2</i>
1.1.3. <u>La plaque athéroscléreuse</u>	<i>2</i>
1.2. <u>Les principaux acteurs cellulaires impliqués dans les lésions de l'athérosclérose</u>	<i>2</i>
1.2.1. <u>Les cellules endothéliales</u>	<i>2</i>
1.2.2. <u>Les cellules musculaires lisses</u>	<i>3</i>
1.2.3. <u>Les monocytes</u>	<i>3</i>
1.3. <u>Les principales théories explicatives de l'athérosclérose</u>	<i>3</i>
2. <u>L'acide lysophosphatidique</u>	<i>5</i>
2.1. <u>Le LPA : une molécule pro- ou anti-athérogène ?</u>	<i>5</i>
2.2. <u>Synthèse du LPA</u>	<i>6</i>
2.3. <u>Isoformes du LPA</u>	<i>8</i>
2.4. <u>Récepteurs au LPA</u>	<i>8</i>
2.4.1. <u>Récepteurs membranaires au LPA : les récepteurs EDG</u>	<i>9</i>
2.4.1.1. <u>Revue des récepteurs EDG</u>	<i>9</i>
2.4.1.2. <u>Voies de signalisation</u>	<i>9</i>
2.4.2. <u>Récepteurs nucléaires au LPA : PPARα</u>	<i>11</i>
3. <u>Choix de l'approche protéomique pour étudier les effets du LPA</u>	<i>12</i>
3.1. <u>Protéomique et transcriptomique</u>	<i>12</i>
3.2. <u>Gels 2D et autres alternatives possibles</u>	<i>12</i>
3.2.1. <u>Les approches protéomiques gel-dépendants</u>	<i>12</i>
3.2.1.1. <u>Principe général</u>	<i>12</i>
3.2.1.2. <u>Electrophorèse 2D conventionnelle et DIGE (Difference In Gel Electrophoresis)</u>	<i>13</i>
3.2.2. <u>Les approches protéomiques gel-indépendants</u>	<i>14</i>
4. <u>Objectif du mémoire</u>	<i>16</i>
<u>II. Matériels et méthodes</u>	17
1. <u>Culture Cellulaire</u>	<i>17</i>
1.1. <u>Culture des cellules endothéliales EAhy926</u>	<i>17</i>
1.1.1. <u>Matériels</u>	<i>17</i>
1.1.2. <u>Méthodes</u>	<i>17</i>
1.1.2.1. <u>Repiquage des cellules EAhy926</u>	<i>17</i>
1.1.2.2. <u>Congélation des EAhy926</u>	<i>17</i>
1.1.2.3. <u>Décongélation des EAhy926</u>	<i>18</i>
2. <u>Caractérisation de l'état d'activation des cellules endothéliales EAhy926</u>	<i>18</i>
2.1. <u>Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription AP-1 par dosage colorimétrique</u>	<i>18</i>

2.1.1.	<u>Matériels</u>	18
2.1.1.1.	<u>Fixation des sondes de capture double brin</u>	18
2.1.1.2.	<u>Stimulation et extraction des cellules et dosage des protéines par la méthode de Bradford</u>	18
2.1.1.3.	<u>Dosage colorimétrique proprement dit</u>	19
2.1.2.	<u>Méthodes</u>	19
2.1.2.1.	<u>Fixation des sondes de capture</u>	19
2.1.2.2.	<u>Stimulation des cellules et extraction protéique</u>	19
2.1.2.3.	<u>Dosage colorimétrique proprement dit</u>	20
2.2.	<u>Dosage de la sécrétion de MCP-1 par test ELISA</u>	20
2.2.1.	<u>Matériels</u>	20
2.2.2.	<u>Méthodes</u>	20
2.2.2.1.	<u>Récupération du surnageant</u>	20
2.2.2.2.	<u>Dosage des protéines par la méthode de Folin</u>	21
2.2.2.3.	<u>Dosage du MCP-1 sécrété par utilisation du kit R&D Quantikine human MCP-1</u>	21
2.3.	<u>Mise en évidence des protéines ERK-1 et ERK-2 phosphorylées ou non par Western Blot</u>	21
2.3.1.	<u>Matériels</u>	21
2.3.2.	<u>Méthodes</u>	22
3.	<u>Approche protéomique par les gels 2D</u>	23
3.1.	<u>Coloration à l'argent</u>	23
3.1.1.	<u>Matériels</u>	23
3.1.1.1.	<u>Première dimension</u>	23
3.1.1.2.	<u>Deuxième dimension</u>	23
3.1.1.3.	<u>Révélation</u>	24
3.1.2.	<u>Méthodes</u>	24
3.1.2.1.	<u>Première dimension</u>	24
3.1.2.2.	<u>Deuxième dimension</u>	24
3.1.2.3.	<u>Coloration à l'argent</u>	25
3.2.	<u>Gels 2D en fluorescence</u>	25
3.2.1.	<u>Matériels</u>	25
3.2.1.1.	<u>Stimulation et extraction protéique</u>	25
3.2.1.2.	<u>Préparation des échantillons</u>	25
3.2.1.3.	<u>Première dimension : voir matériels et méthodes 3.1.1.1.</u>	26
3.2.1.4.	<u>Deuxième dimension : voir matériels et méthodes 3.1.1.2.</u>	26
3.2.1.5.	<u>Analyse des gels</u>	26
3.2.2.	<u>Méthodes</u>	26
3.2.2.1.	<u>Stimulation et extraction des protéines</u>	26
3.2.2.2.	<u>Première dimension :</u>	26
3.2.2.3.	<u>Deuxième dimension</u>	27
3.2.2.4.	<u>Analyse des gels</u>	27
<u>III. Résultats et discussion</u>		28
	<u>Avant-propos</u>	28
	<u>1. Caractérisation du modèle cellulaire</u>	28
	<u>2. Etude de l'activation des cellules endothéliales EAhy926 induit par le LPA</u>	29
2.1	<u>Evaluation de la cytotoxicité du LPA</u>	29
2.2	<u>Effets du LPA sur la sécrétion de MCP-1</u>	30

2.2.1.	<u>Résultats</u>	30
2.2.2	<u>Discussion</u>	30
2.3.	<u>Effets du LPA sur l'activation du facteur de transcription AP-1</u>	31
2.3.1.	<u>Effets au cours du temps du LPA sur l'activation de AP-1</u>	31
2.3.2.	<u>Effets de différents inhibiteurs de voies de signalisation sur l'activation d'AP-1 induite par le LPA</u>	32
2.3.2.1.	<u>Résultats</u>	32
2.3.2.2.	<u>Discussion</u>	33
2.4.	<u>Effets du LPA sur la phosphorylation de ERK 1/2</u>	34
2.4.1.	<u>Résultats</u>	35
2.4.2.	<u>Discussion</u>	36
3.	<u><i>Effets du LPA sur l'expression génique des cellules endothéliales EAhy926 : approche protéomique par les gels 2D</i></u>	37
3.1.	<u>Gels 2D colorés à l'argent (approche conventionnelle)</u>	39
3.2.	<u>Gels marqués en fluorescence (approche DIGE)</u>	40
3.2.1.	<u>Résultats</u>	40
3.2.2.	<u>Discussion</u>	41
	<u>IV. Conclusions et perspectives</u>	44
	<u>V. Bibliographie</u>	49

Avant-propos

L'introduction de ce travail va se diviser en trois chapitres.

Le premier va essentiellement se concentrer sur la problématique de l'athérosclérose, mettant en premier plan le rôle fondamental des cellules endothéliales au niveau de cette pathologie.

Cette brève introduction va nous permettre d'introduire une molécule au centre de ce mémoire, l'acide lysophosphatidique (LPA). Métabolite lipidique depuis longtemps connu en tant que facteur de croissance, il pourrait également être impliqué dans le processus athérosclérotique.

Cependant, les rôles de cette molécule dans cette pathologie ne sont pas encore clairement établis. En effet, certains auteurs lui attribuent un rôle pro-athérogène, alors que d'autres lui confèrent un rôle anti-athérogène. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les effets du LPA sur les cellules endothéliales, les données de la littérature étant encore très fragmentaires à ce sujet. Une approche protéomique a été privilégiée dans ce but. Cette dernière sera explicitée dans le troisième chapitre.

1. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire et dégénérative, caractérisée par un épaissement de la paroi des artères musculaires et élastiques, pouvant conduire entre autres à un infarctus ou à un accident vasculaire cérébral.

Elle est responsable de la plus grande partie des décès dans les pays occidentaux et progresse dans les pays en voie de développement (Bonnet, 2001).

Les lésions artérielles, bien que pouvant être ubiquitaires au niveau des artères, se développent préférentiellement dans les zones de turbulences, telles que les bifurcations (Ross, 1995). Le développement de l'athérome se fait de façon chronique, peut débuter dès l'enfance et évolue généralement de façon silencieuse durant de nombreuses années.

1.1. Lésions de l'athérosclérose

Les lésions de l'athérome évoluent selon plusieurs stades : la strie lipidique, la lésion intermédiaire fibro-graisseuse et la plaque athéroscléreuse.

1.1.1. La strie lipidique (« Fatty streak »)

La strie lipidique, de couleur jaune, est une lésion limitée, réversible mais qui peut évoluer vers la plaque d'athérome. La première étape est la pénétration de LDL à travers les cellules endothéliales (Libby, 2002). L'oxydation de celles-ci induit une activation de l'endothélium, en permettant l'expression entre autres de molécules d'adhérence (VCAM-1 ou ICAM-1) pour les monocytes et les lymphocytes T présents dans le sang (Tedgui and Mallat, 2001). Dans l'intima, les monocytes vont se différencier en macrophages. Ces derniers vont accumuler les LDL oxydées et devenir des cellules spumeuses (Ross, 1995) (Figure I.1).

1.1.2. La lésion intermédiaire fibro-graisseuse (« Fibrofatty lesion »)

Les cytokines sécrétées par les macrophages stimulent la prolifération des cellules de l'intima et incitent les cellules musculaires lisses de la média à migrer vers l'intima, à se multiplier et à produire une matrice fibreuse résistante (Libby, 2002). Ces lésions sont caractérisées par l'accumulation de cellules spumeuses, de débris cellulaires et de cristaux de cholestérol, le tout formant le cœur nécrotique (Ross, 1995).

1.1.3. La plaque athéroscléreuse

La progression de la plaque aboutit à une réduction progressive du calibre artériel dans un territoire donné, avec diverses complications (Bonnet, 2001). Des MMP (Matrix MetalloProteinases), sécrétées par les cellules spumeuses, fragilisent le revêtement en digérant la matrice et en endommageant les cellules musculaires lisses. Simultanément, les macrophages spumeux produisent du facteur tissulaire (TF) qui participe à la formation des caillots. Quand la plaque fragilisée se rompt, le TF interagit avec les éléments qui favorisent la coagulation sanguine, et un caillot, ou un thrombus, se forme (Libby, 2002). Si celui-ci est suffisamment important, il peut conduire à l'occlusion d'une artère et mener à des conséquences cliniques désastreuses.

1.2. Les principaux acteurs cellulaires impliqués dans les lésions de l'athérosclérose

Dans ce paragraphe, nous allons décrire très brièvement l'importance des principaux types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose ; à savoir, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les monocytes. Les lymphocytes T pourraient également jouer un rôle dans l'initiation des lésions, et les plaquettes, acteurs principaux de la coagulation, peuvent également aggraver les symptômes.

1.2.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont des cellules pavimenteuses reposant sur une lame basale (Stevens and Lowe, 1997). Elles ont la particularité de contenir des corps de Weibel-Pallade. Ces vésicules de sécrétion possèdent dans la lumière un multimère du facteur de von Willebrand, un agent procoagulant, et, au niveau de la membrane, de la P-sélectine. Dans les cellules activées, les vésicules de sécrétion fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent le facteur de von Willebrand agissant en tant que chaperon du facteur VIII de la cascade de coagulation. Lors de blessures endothéliales, il intervient également dans l'adhérence des plaquettes au niveau subendothélial. D'autre part, la P-sélectine, exprimée en membrane plasmique, va permettre l'interaction avec les leucocytes, permettant la première étape de la diapédèse.

Les cellules endothéliales sont les premières cellules, au niveau de la paroi vasculaire, à être impliquées dans le processus d'athérogenèse. Elles sont activées par les LDL (Low Density Lipoprotein) faiblement oxydées, conduisant à l'expression de molécules d'adhérence telles que VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ou ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) (Ross, 1993). Celles-ci vont permettre la diapédèse des monocytes à travers la barrière endothéliale. Elles libèrent également des facteurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF α ,...) et des agents chémoattractifs (IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1),...) qui entraînent un cercle vicieux.

1.2.2. *Les cellules musculaires lisses*

Elles se trouvent dans la média et sont responsables du tonus de la paroi artérielle (Stevens and Lowe, 1997). Les cellules musculaires lisses ont un rôle important dans le développement de la plaque. Outre une activité métabolique essentielle à la constitution de la matrice extracellulaire, elles ont la possibilité de se transformer en cellules spumeuses, après avoir migré et proliféré dans l'intima sous l'action de différents facteurs (LDL oxydées, PDGF, IL-1,...) (Ross, 1995).

1.2.3. *Les monocytes*

Les macrophages, dérivés de monocytes, sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines qui peuvent stimuler la migration et la prolifération des cellules musculaires dans les lésions de l'athérosclérose. De plus, le cholestérol et les ox-LDL s'accumulent dans les macrophages via les récepteurs « scavengers » et les macrophages deviennent alors des cellules spumeuses qui s'accumulent au cœur des lésions (Ross, 1995).

1.3. Les principales théories explicatives de l'athérosclérose

Plusieurs théories existent pour expliquer l'athérogenèse. Chacune de celles-ci, successivement reprise et modifiée, a contribué à une meilleure compréhension de cette pathologie. Il s'agit, en fait, d'une maladie plurifactorielle complexe. Cependant, deux hypothèses sont généralement les plus acceptées. Premièrement celle de l'infiltration lipidique dans laquelle la pénétration des LDL dans l'intima et leur oxydation, sont les éléments principaux déclenchant une suite d'événements pouvant mener à la formation des plaques d'athérosclérose. La seconde est celle d'une réponse à une blessure endothéliale. Dans ce cas, le dysfonctionnement de l'endothélium est l'élément déclencheur de la pathologie.

Les différentes théories sont décrites brièvement ci-dessous :

- L'hypothèse de prolifération clonale est basée sur le fait que, dans les plaques athéromateuses, les cellules musculaires lisses dérivent d'un clone cellulaire. Dans ce cas, l'athéromatose résulterait d'une anomalie primaire de la croissance de ces cellules (Stevens and Lowe, 1995).
- L'hypothèse thrombogénique suppose que des microthrombi se forment régulièrement, résultant de dépôts de fibrine, de plaquettes, ... Ces dernières libèrent des facteurs de croissance (PDGF) qui stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'intima (Stevens and Lowe, 1995).
- L'hypothèse virale est proposée depuis une quinzaine d'années. Plusieurs observations expérimentales indiquent que certains virus, dont les virus de type Herpes, pourraient infecter la paroi artérielle et modifier la biologie de ses cellules pour y favoriser le dépôt de lipides.
- L'hypothèse de l'infiltration lipidique est caractérisée par la pénétration des LDL dans l'intima. Lorsque celles-ci s'oxydent, elles deviennent toxiques et entraînent une réponse inflammatoire recrutant les différents acteurs présents dans les lésions.

- L'hypothèse de la réponse à une blessure endothéliale est l'hypothèse la plus établie. Elle intègre d'ailleurs divers aspects des autres hypothèses. Les causes du dysfonctionnement endothélial peuvent être multiples : perturbations du flux laminaire, présence de dérivés toxiques au voisinage des cellules endothéliales, excès plasmatique de LDL, infection microbienne,... Les conséquences de ce dysfonctionnement peuvent être importantes : vasodilatation, augmentation de la perméabilité qui favorise l'infiltration des LDL et l'apparition de protéines d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1), ... (Bonnet, 2001). Cette vasodilatation permet l'entrée des LDL au niveau de la paroi artérielle où elles vont s'oxyder (Figure I.2). Les monocytes sanguins vont ensuite adhérer à l'endothélium et migrer dans l'intima. En même temps, les plaquettes et les macrophages activés sécrètent divers facteurs qui entraînent la migration des cellules musculaires lisses de la média à l'intima (Cotran *et al.*, 1999).

L'oxydation des LDL est donc une étape essentielle dans les processus de l'athérosclérose. Elle se produit principalement au niveau de la subendothéliale, pauvre en anti-oxydants. En effet, de très faibles quantités de LDL oxydées sont retrouvées dans le sang alors qu'elles sont abondantes dans les plaques d'athérosclérose (Chisolm and Steinberg, 2000).

Les ox-LDL activent les cellules endothéliales, contribuant au dysfonctionnement de l'endothélium (Ross, 1993). Elles augmentent également sa perméabilité. De plus, les mm-LDL (minimally modified LDL) stimulent l'expression des molécules d'adhérence à la surface endothéliale, permettant l'adhérence et la transmigration des monocytes à travers la paroi artérielle (Berliner *et al.*, 1995).

La spectrométrie de masse a permis de préciser la nature des phospholipides et des acides gras modifiés présents au niveau des ox-LDL. En outre, un certain nombre des (phospho)lipides, oxydés ou modifiés, produits au cours de l'oxydation des LDL, semblent être bioactifs. De plus, ceux-ci agissent en particulier au niveau des cellules de la paroi vasculaire, des leucocytes et des plaquettes (Subbanagounder *et al.*, 2000) (Tableau I.1).

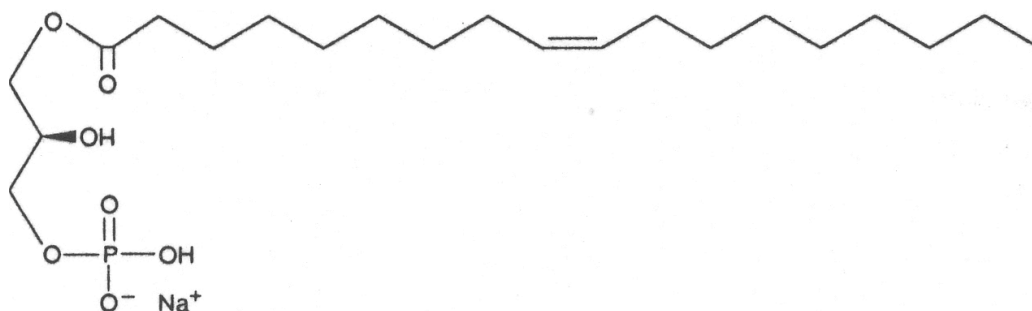
Parmi ces phospholipides bioactifs, nous allons nous focaliser sur le LPA, effectivement produit au cours de l'oxydation des LDL. Cette molécule est connue depuis longtemps comme un facteur de croissance (Moolenaar *et al.*, 1997). Son rôle dans l'athérosclérose est encore controversé : d'une part, le LPA favorise la prolifération et la migration endothéliale, ce qui est plutôt bénéfique (Panetti, 2002) ; d'autre part, le LPA pourrait entraîner un dysfonctionnement endothélial, avec hyperperméabilité, il est un activateur puissant des plaquettes et stimule la prolifération des CML (cellules musculaires lisses), ce qui est plutôt défavorable dans le contexte de l'athérosclérose (Siess, 2002). De plus, le LPA a été décrit récemment comme ligand intracellulaire pour le PPAR α , un facteur de transcription dont l'importance dans le contexte de l'athérosclérose ne fait que s'accroître (Barbier *et al.*, 2002).

Le chapitre suivant sera donc consacré à l'acide lysophosphatidique et plus précisément à sa structure, sa synthèse, ses fonctions, ses récepteurs et à la transduction du signal en aval de ceux-ci.

2. L'acide lysophosphatidique

L'acide lysophosphatidique (1-acyl-*sn*-glycéro-3-phosphate) est un métabolite lipidique soluble. Il s'agit d'un glycérophospholipide constitué d'un squelette glycérol présentant au niveau du carbone 3 un phosphate et au niveau du carbone 1, une chaîne carbonée saturée ou insaturée, et de taille variable (Jalink *et al.*, 1994a).

Durant ce mémoire, nous avons travaillé avec la forme oléoyl du LPA, dont voici la structure :



Cette forme de LPA est la plus utilisée comme agoniste expérimental et est capable d'activer les trois principaux récepteurs au LPA (Xie *et al.*, 2002).

2.1. Le LPA : une molécule pro- ou anti-athérogène ?

On sait depuis longtemps que le LPA est un facteur de croissance ubiquitaire et qu'il joue un rôle dans la **réparation vasculaire**. Le LPA a des effets sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales, ce qui est important pour la réparation vasculaire et la ré-endothélialisation des artères carotides, coronaires ou périphériques. Le LPA, libéré par les plaquettes activées, stimule la migration des cellules endothéliales vers la zone altérée. Ces cellules, en réponse au LPA, vont diffuser et ensuite proliférer (Siess, 2002).

Mais le LPA exerce également des effets négatifs. Au niveau des cellules endothéliales, le LPA augmente l'expression des E-sélectines et des VCAM-1 à la surface de ces cellules et stimule ainsi l'immobilisation des monocytes. Ces effets résultent de la stimulation de l'expression de gènes des **molécules d'adhérence**. En fait, le LPA accroît les taux d'ARNm codant pour les E-sélectines, ICAM-1, IL-8 et le MCP-1 (Palmetshofer *et al.*, 1999). Le LPA, présent au niveau des LDL oxydées, stimule aussi les cellules endothéliales à former des fibres de stress et des « gap » intercellulaires, ce qui accroît la **perméabilité endothéliale** (Essler *et al.*, 1999).

Les effets du LPA ont également été décrits pour d'autres types cellulaires.

Le LPA stimule la prolifération des cellules musculaires lisses. Il peut également agir directement ou indirectement sur celles-ci en libérant des substances vasoactives des cellules endothéliales. Le LPA favorise la surproduction de l'endothéline-1, molécule vasoconstrictrice (Siess, 2002).

Le LPA est aussi un puissant activateur des plaquettes, altérant leur morphologie et ce à faible concentration (Maschberger *et al.*, 2000). Le LPA induit également l'agrégation des plaquettes et ce à des concentrations à peine supérieures à celles présentes dans le sang. De plus, le LPA est le lipide principal présent au niveau des mox-LDL (midly oxidized-LDL) et au niveau des lésions de l'athérosclérose qui stimule les plaquettes (Siess *et al.*, 1999). L'ensemble de ces effets athéro-thrombogènes est illustré à la figure I.3.

On voit donc qu'il s'agit d'une molécule dont les effets sont ambigus dans le contexte de l'athérosclérose. L'objectif majeur de ce mémoire est donc précisément de mieux comprendre les effets du LPA sur les cellules endothéliales, en exploitant l'approche protéomique, sans *a priori*.

Mais avant d'aborder ce volet, nous allons rappeler la biosynthèse du LPA, les récepteurs au LPA et les mécanismes de transduction en aval de ces récepteurs.

2.2. Synthèse du LPA

Le LPA peut être produit au cours de la synthèse des triacylglycérols, par des plaquettes activées (par exemple, par la thrombine ou par les ionophores du calcium), par oxydation des LDL, par différents types cellulaires stimulés avec divers agonistes comme par exemple des fibroblastes stimulés par des facteurs de croissance ou des leucocytes stimulés par des cytokines (Goetzl and An, 1998). Mais les mécanismes de production du LPA *in vivo* sont loin d'être complètement élucidés.

Voici les mécanismes de synthèse du LPA les mieux connus :

- 1) Au niveau intracellulaire, le LPA est un intermédiaire de la synthèse *de novo* des triacylglycérols. L'étape initiale de cette biosynthèse se fait à partir de glycérol 3-phosphate. Dans le réticulum endoplasmique, ce dernier est acylé par la glycérol-3-phosphate acyltransférase utilisant comme forme activée de l'acide gras, un acyl-CoA, ce qui donne de l'acide lysophosphatidique (Figure I.4).

Alternativement, la synthèse du LPA peut se faire à partir du dihydroxyacétone phosphate, grâce aux réactions successives de la dihydroxyacétone phosphate acyltransférase et de l'acyl-dihydroxyacétone phosphate réductase (Figure I.4).

Ensuite, le LPA est transformé en acide phosphatidique (PA), puis en triacylglycérol grâce aux actions successives de l'acide phosphatidique phosphatase et de la diacylglycérol acyltransférase. Les acides phosphatidiques et diacylglycérols intermédiaires peuvent aussi être convertis en phospholipides (Voet et Voet, 1998).

- 2) Le LPA est également présent dans le sang, à une concentration de 80 à 600 nM dans le plasma et dans le sérum entre 1 et 5 μ M (Gaits *et al.*, 1997).
 - Les plaquettes activées constituent la première source de LPA dans le sérum. Par exemple, dans les plaquettes activées par la thrombine, l'hydrolyse du phosphoinositol biphosphate, catalysée par la phospholipase C (PLC), mène à la formation du diacylglycérol (DAG). Celui-ci peut être converti en PA par la DAG kinase présente au niveau des plaquettes (Figure I.5). Ensuite, une phospholipase A2 (PLA₂) ou phospholipase A1 hydrolyse le PA pour former du

LPA (Gaits *et al.*, 1997). Les sites de clivage des phospholipides sont illustrés à la figure I.6.

- Les plaquettes sécrètent également des lysophospholipides : la lyso-phosphatidyl choline (lyso-PC), la lyso-phosphatidylsérine (lyso-PS) (Aoki *et al.*, 2002). Ces lysophospholipides sont produits par diverses PLA₂. Les lysophospholipides sont ensuite convertis en LPA grâce à une lyso-phospholipase D (lyso-PLD), une enzyme circulante présente dans le sang (Figure I.7 et I.8).
 - La lyso-PC est produite non seulement par les plaquettes, mais également par le foie qui la libère dans le sang ou au niveau des HDL (High Density Lipoprotein), suite à l'action de la LCAT (Lecithin Cholesterol Acyl Transférase) (Luquain *et al.*, 2003). La LCAT permet la transestérification de la phosphatidylcholine (PC) au cholestérol, pour donner de la lyso-PC et du cholestérol estérifié (Sekas *et al.*, 1985) (Figure I.8).
 - Enfin, des ecto-enzymes sécrétoires comme la lyso-PLD ou la sPLA₂-II, agissent au niveau des phospholipides membranaires, par exemple des globules rouges. Le sPLA₂-II contribue à la formation de lyso-phospholipides et la lyso-PLD les convertit en LPA. La sPLA₂ peut également produire le LPA à partir de PA membranaire (Budnik, 2003) (Figure I.9).
 - Signalons que la formation accrue de LPA par la lyso-PLD a également été observée lors de conditions pathophysiologiques, par exemple dans le sérum et fluide ascitique de patientes atteintes de cancer de l'ovaire (Tokumura, 2002). On a aussi remarqué que l'activité de la lyso-PLD est augmentée lors de la grossesse.
- 3) Le LPA peut être également produit par d'autres types cellulaires. Cette voie de synthèse implique la phospholipase D (PLD). Celle-ci transforme la phosphatidylcholine en acide phosphatidique (Eder *et al.*, 2000). Ce dernier peut être converti en LPA par une phospholipase A₂. Le site de clivage de la PLD se trouve au niveau du phosphate et la PLA₂ hydrolyse le lien ester au niveau du carbone 2 (Hurt-Camejo *et al.*, 2001) (Figure I.7). Cette production peut d'ailleurs être induite par divers agonistes (Tableau I.2).
- 4) Le LPA peut être produit lors de l'oxydation des LDL. Siess *et al.* (1999) ont d'ailleurs démontré que les quantités de LPA augmentaient de manière significative dans les LDL moyennement oxydées (ou mox-LDL). Il est important de noter que le LPA a été détecté au niveau des lésions athérosclérotiques. En effet, Siess *et al.* (1999) ont montré que le taux de LPA est de l'ordre de 10 pmol/mg à 49 pmol/mg dans les plaques d'athérosclérose alors qu'il est de 1,2 pmol/mg à 2,8 pmol/mg dans un tissu artériel normal. Le taux de LPA serait donc jusqu'à 13 fois plus élevé dans les plaques d'athérome par rapport à un tissu non pathologique. Le LPA, au niveau des lésions pourrait également être généré par l'hydrolyse de lyso-PC par une PLD bactérienne. En effet, des *Chlamydia pneumoniae* ont souvent été décrites comme associées aux lésions athérosclérotiques et pourraient donc être impliquées dans cette pathogenèse (pour une revue, voir Siess 2002).

Signalons que le LPA peut être aussi dégradé en monoacylglycérol (MAG) par l'action d'une LPA phosphatase. Cette dégradation permet de limiter la durée et l'amplitude des réponses induites par le LPA (Jalink *et al.*, 1994a).

2.3. Isoformes du LPA

Différentes formes de LPA existent dans le sérum et le plasma. Dans la littérature, toute une série d'isoformes sont décrites (Figure I.10). Parmi ces isoformes, certains sont retrouvés majoritairement dans le plasma et le sérum. Les espèces de LPA avec les chaînes acyl saturées (palmitoyl et stéaroyl) ou insaturées (palmitoléoyl, oléoyl, linoléoyl et arachidonoyl) sont les plus présentes (Gerrard and Robinson, 1989). Ces différents acides gras peuvent se lier à un squelette glycérol soit en position *sn*-1, soit en position *sn*-2 (Bandoh *et al.*, 2000).

La longueur, le degré d'insaturation et la liaison des chaînes acyl au squelette glycérol modulent l'activité du LPA (Sugiura *et al.*, 1994). En général, plus la longueur de la chaîne d'acide gras est courte, plus l'activité biologique est réduite (Simon *et al.*, 1982). Une étude réalisée par van Corven et ses collègues (1992) sur la capacité des différents analogues du LPA à stimuler la synthèse d'ADN dans des fibroblastes, a montré qu'elle varie selon la longueur de la chaîne acyl et que l'ordre de puissance est comme suit : 1-oléoyl-LPA (18 :1) > 1-palmitoyl-LPA (16 :0) > 1-myristoyl-LPA (14 :0) > 1-lauroyl-LPA (12 :0) > 1-décanoyl-LPA (van Corven *et al.*, 1992).

Ces différents isoformes de LPA peuvent tous se lier aux récepteurs du LPA. Ceux-ci sont décrits dans le paragraphe suivant.

2.4. Récepteurs au LPA

Le LPA agit tout d'abord en se liant à des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (Figure I.11). Les membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont caractérisés par une structure tertiaire, composée de sept domaines transmembranaires liés entre eux par des boucles extracellulaires et intracellulaires (Dohlman *et al.*, 1987). L'extrémité amino-terminale du récepteur, extracellulaire, contribue souvent à la reconnaissance et à la liaison des ligands. L'extrémité carboxy-terminale, intracellulaire, intervient dans la liaison des effecteurs et à la propagation des signaux. Les régions transmembranaires, dans les domaines hautement conservés, sont composées de 20 à 25 acides aminés sous forme d'hélices α (Whitehead *et al.*, 2001).

Les GPCR s'associent avec les membres de la famille des protéines G hétérotrimériques qui sont ancrées à la surface intracellulaire de la membrane plasmique (Bourne, 1997). Ces protéines G sont composées d'une sous-unité α (G_α), qui lie la guanine, et d'un dimère constitué de deux sous-unités : β et γ ($G_{\beta\gamma}$). Les voies intracellulaires déclenchées par l'activation des protéines G hétérotrimériques sont déterminées par la combinaison particulière des sous-unités G_α et $G_{\beta\gamma}$ et par la disponibilité des effecteurs et des protéines de régulation spécifiques (Whitehead *et al.*, 2001).

En l'absence de ligand, les GPCR s'associent avec un complexe inactif lié au GDP. Lorsqu'un ligand vient se lier au récepteur, le GPCR prend une configuration active et catalyse l'échange du GDP par un GTP au niveau de G_α . Ensuite, la sous-unité β va se dissocier de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ et chaque composant va se lier à des effecteurs spécifiques.

En outre, récemment, McIntyre *et al.* (2003) ont proposé que le LPA était aussi un ligand naturel à haute affinité d'un récepteur nucléaire, le facteur PPAR α . Nous allons donc passer en revue ces deux systèmes de récepteurs.

2.4.1. Récepteurs membranaires au LPA : les récepteurs EDG

Le LPA se lie à divers récepteurs appartenant à la famille des récepteurs EDG (Endothelial Differentiation Genes). Ceux-ci reconnaissent divers lysophospholipides bioactifs : le LPA, la sphingosine-1-phosphate (S₁P) et la sphingosylphosphorylcholine (SPC).

2.4.1.1. Revue des récepteurs EDG

Ces récepteurs couplés aux protéines G sont codés par des gènes LP qui sont au nombre de neuf. Cinq de ceux-ci médient les effets du S₁P (S₁P₁₋₅) et quatre de ces gènes (LPA₁₋₄) codent pour des récepteurs ayant une forte affinité pour le LPA (Fukushima *et al.*, 2001). Les trois premiers (LPA₁₋₃) présentent des séquences homologues. Ceux-ci sont aussi connus sous le nom de EDG 2, EDG 4 et EDG 7 (Tableau I.3). Par contre, le LPA₄ présente une séquence divergente des trois autres (Anliker and Chun, 2004).

Les quatre récepteurs au LPA possèdent un poids moléculaire fort semblable. Chez l'homme, le LPA₁ (ou EDG 2), exprimé dans de nombreux tissus, contient une séquence de 364 acides aminés et possède un poids moléculaire de ~ 41 kDa. Le LPA₂ (ou EDG 4) contient 351 acides aminés avec un poids moléculaire de ~ 39 kDa. Comme le LPA₁, le LPA₂ se lie aux protéines G des familles G_{12/13}, G_q et G_i. Le LPA₃ est composé de 353 acides aminés et possède un poids moléculaire évalué à ~ 40 kDa. Ce récepteur diffère des deux autres du fait qu'il ne se lie pas à la protéine G_{12/13} et il a une préférence pour les molécules de LPA avec des chaînes acyl insaturées. Le LPA₄, composé de 370 acides aminés a un poids moléculaire de ~ 42 kDa. Il est plus faiblement exprimé et son rôle reste moins bien connu. Il s'associe aux protéines G_s. Cependant, la liaison des récepteurs aux protéines G dépend du type cellulaire.

Après avoir décrit les récepteurs au LPA, il est intéressant de s'attarder maintenant aux mécanismes qui se déroulent en aval. En effet, lorsque le LPA se lie à ses récepteurs, une série de processus est activée. Ceux-ci sont explicités dans le paragraphe suivant.

2.4.1.2. Voies de signalisation

Les voies de signalisation déclenchées par le LPA seront extrêmement diversifiées selon le type de protéines G associées au récepteur et selon l'effecteur qui lui est associé, comme illustré à la figure I.12.

Il y a cinq effecteurs principaux :

- Rho, activé par les protéines G_{12/13}.
- La PLC activée par les protéines G_q et G_i.
- La petite protéine G Ras, activée par les protéines G_i et qui activera à son tour la voie des MAPK.
- La PI₃K activée par les protéines G_i, en amont de la protéine kinase Akt et de la petite protéine G Rac.

- Et enfin l'adénylate cyclase (AC), qui contribue à produire l'AMPc, qui sera soit activée (protéines G_s), soit inhibée (protéines G_i).

Nous allons passer en revue ces cinq voies.

Voie de Rho

L'activation de Rho, une petite protéine G, se fait par la protéine G_{12/13}. En réponse au LPA, Rho peut induire des modifications au niveau du cytosquelette et au niveau de la forme cellulaire. Les protéines kinases Ser/Thr, associées à Rho appelées Rho kinases, phosphorylent et inhibent les phosphatases des chaînes légères de myosine (Kimura *et al.*, 1996). Il en résulte une accumulation de la forme phosphorylée de ces chaînes légères de myosine, menant à une augmentation de la contraction d'actomyosine (Figure I.13). Ceci conduit à la formation de fibres de stress, la rétractation des neurones, avec arrondissement cellulaire (Jalink *et al.*, 1994b).

Ras et la cascade des MAPK

Actuellement, trois cascades majeures de MAPK distinctes, mais parallèles, sont connues : celle des p42/p44 MAPK, la voie des JNK et celle de la p38 MAPK. Elles sont toutes caractérisées par une séquence de trois kinases qui se succèdent, les MAPKKK, les MAPKK et les MAPK.

La voie p42/p44 MAPK est la voie d'activation la mieux caractérisée. Elle dépend de la protéine G_{i/o}, sensible à la toxine pertussique. Cette voie des MAPK peut conduire à la translocation nucléaire des MAPK, suivie de la transcription de gènes et de la progression du cycle cellulaire.

Les récepteurs LPA couplés aux protéines G_i, stimulent l'accumulation de Ras-GTP. Ce processus est sensible à la toxine pertussique. L'activation de Ras fait intervenir une tyrosine kinase comme illustré à la figure I.14. Il pourrait s'agir de kinases de la famille Src ou même de récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque. Une fois Ras activé, il va interagir avec d'autres protéines, dont la sérine/thréonine kinase c-Raf. Raf activé phosphoryle les MAPKK (MEK1/2), qui, à leur tour, phosphorylent et activent les p42/p44 MAPK (Daum *et al.*, 1994). Ces dernières phosphorylent de nombreux substrats cytoplasmiques tels que la phospholipase A₂ cytosolique, les récepteurs à l'EGF, ... et des protéines nucléaires comme le facteur de transcription Elk-1, ... (Davis, 1994). Les mécanismes d'activation de Ras diffèrent cependant d'un type cellulaire à l'autre (Kranenburg and Moolenaar, 2001).

Voie de la PKC

L'activation de la PLC, conduisant à la formation du diacylglycérol et de l'inositol triphosphate (IP₃), est médiée par la sous-unité β de la protéine G_q et/ou par la sous-unité β de la protéine G_{i/o} (Contos *et al.*, 2000). Alors que le DAG reste associé à la membrane plasmique, l'IP₃, une petite molécule polaire, est libérée dans le cytosol. L'IP₃ permet une augmentation transitoire du Ca⁺⁺ à partir du réticulum endoplasmique et le DAG active la PKC.

Le LPA induit l'activation, PKC dépendante, de la phospholipase D cellulaire, laquelle hydrolyse la phosphatidylcholine en choline libre et PA .

PI₃K

Certains auteurs ont mis en évidence que la PI₃K pouvait intervenir dans différents processus cellulaires incluant la chimotaxie, la mitogenèse et l'activation de différentes molécules intervenant dans les voies de signalisation. Récemment, d'autres auteurs ont découvert un rôle de la PI₃K dans la voie de transduction du signal en réponse au LPA. Dans ce dernier cas, elle est activée par le complexe γ des protéines G (Yart *et al.*, 2002) (Figure I.14). Une fois activée, la PI₃K phosphoryle en position 3 l'anneau inositol des phosphoinositides générant du PI₃P (Domin and Waterfield, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Celui-ci lie un motif protéique conservé appelé domaine PH (Pleckstrin Homology), présent notamment au niveau d'Akt, ce qui permet d'induire entre autre son activation (Rameh and Cantley, 1999). Il est à remarquer que tous les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore peu connus. Akt régule de multiples processus biologiques tels que le métabolisme glucidique, l'apoptose, l'expression génique et la prolifération cellulaire.

L'adénylate cyclase

En réponse au LPA, l'adénylate cyclase (AC) peut soit être activée par la protéine G_s, soit être inhibée par la protéine G_i (Reithmann *et al.*, 1990). En effet, lorsque le LPA se lie aux récepteurs LPA₁₋₃, couplés aux protéines G_i, la sous-unité β va inhiber l'adénylate cyclase (Noguchi *et al.*, 2003). Par contre, lorsque le LPA se lie au récepteur LPA₄ couplé à des protéines G_s, il induit la stimulation de l'adénylate cyclase, d'où une augmentation de l'AMPc. Cette activation inhibe l'action proliférative des facteurs de croissance et celle du LPA (Jalink *et al.*, 1994a). Donc, selon que le LPA se lie à un récepteur couplé à une protéine G_i ou G_s, on pourra avoir une action pro-proliférative ou anti-proliférative.

2.4.2. Récepteurs nucléaires au LPA : PPAR α

Si le LPA se lie à des récepteurs membranaires, il pourrait également servir de ligand pour un récepteur nucléaire, le facteur transcriptionnel PPAR α

Il existe trois isoformes de PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) : PPAR α , PPAR β / δ et PPAR γ

PPAR α appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, est activé par la liaison de différents ligands naturels et synthétiques, dont les phospholipides oxydés, les acides gras, les éicosanoïdes, ... Ils sont exprimés dans les monocytes/macrophages, les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules endothéliales et jouent un rôle important dans l'adipogenèse. Mais, ils sont également hautement exprimés dans les lésions de l'athérosclérose (Lusis, 2000).

Récemment, certains auteurs ont montré que le LPA était un ligand naturel à haute affinité pour PPAR α (McIntyre *et al.*, 2003) (Figure I.15).

On voit donc que la biologie du LPA est complexe. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier les effets du LPA sur un modèle de cellules endothéliales en culture par une approche sans *a priori* : l'approche protéomique.

3. Choix de l'approche protéomique pour étudier les effets du LPA

Dans ce mémoire, nous avons favorisé l'approche protéomique par les gels 2D par rapport à l'approche transcriptomique. Ces deux approches complémentaires présentent chacune des avantages et des inconvénients.

3.1. Protéomique et transcriptomique

La transcriptomique étudie les ARNm. Mais on sait qu'il n'y a pas de parallélisme strict entre l'expression au niveau ARNm et celle au niveau des protéines. En effet, le taux d'expression des protéines n'est pas uniquement corrélé au taux de transcription et il dépend également des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. De plus, les ARNm ne permettent pas d'expliquer à eux seuls l'abondance relative des protéines exprimées.

La protéomique est, quant à elle, l'étude du protéome qui se définit comme l'ensemble des protéines présentes à un moment donné et sous certaines conditions, dans un type cellulaire ou un tissu donné. Les gels 2D sont une technique dite « sans *a priori* », c'est-à-dire qu'il s'agit d'une approche globale pour étudier la variation de l'expression des protéines dans des cellules soumises à un agent donné ou dans une condition pathologique donnée par rapport à une situation contrôle. La protéomique suppose une étape de séparation des protéines, une analyse d'expression différentielle et l'identification des protéines, étape qui fait généralement appel à la spectrométrie de masse.

3.2. Gels 2D et autres alternatives possibles

Dans l'approche protéomique, il existe des techniques gel-dépendantes et des techniques gel-indépendantes. Les techniques gel-dépendantes ont prédominé ces vingt dernières années. Mais depuis, plusieurs alternatives gel-indépendantes ont été proposées.

3.2.1. Les approches protéomiques gel-dépendantes

3.2.1.1. Principe général

L'analyse protéomique en gels bidimensionnels (gel 2D) se décompose en plusieurs étapes. La première est une étape de **séparation des protéines** permettant d'obtenir idéalement des polypeptides individualisés. Cette séparation se fait généralement selon deux dimensions, respectivement selon le point isoélectrique (PI) et ensuite selon le poids moléculaire (PM). La seconde étape consistera à **analyser les gels**, en vue de mettre en évidence des différences d'expression entre les cellules/tissus tests ou pathologiques et les cellules/tissus contrôles ou sains. Les variations de gel à gel, font qu'un certain nombre de gels est requis pour pouvoir déceler des différences significatives entre les gels dits « contrôles » et les gels « tests ». La troisième étape vise l'**identification des protéines** d'intérêt grâce à la spectrométrie de masse. Les protéines sont repérées sur le gel à l'aide d'une coloration. Ensuite, les spots, correspondant aux protéines d'intérêt, sont prélevés et digérés avec une enzyme, la trypsine.

Les différents peptides obtenus sont alors analysés par spectrométrie de masse (MALDI-TOF ou ESI-TOF).

La technique des gels 2D comporte plusieurs limites, même si beaucoup d'efforts sont produits pour les minimiser.

- La résolution reste insuffisante et il n'est pas rare qu'il y ait comigration de plusieurs protéines et donc de retrouver plus d'une protéine dans le même spot. La résolution des gels peut être améliorée en travaillant sur des zones de pH plus étroites. Par exemple, on peut passer d'un gel 3-10 à un gel 5-6 afin d'améliorer la résolution de la séparation des protéines dans cette zone.
- La forte variation de l'expression protéique : dans une cellule, certaines protéines, comme l'actine, sont fortement exprimées ($\sim 10^8$ molécules/cellule) alors que d'autres, comme les facteurs de transcription, le sont faiblement ($\sim 10^2$ molécules/cellule). Il y a donc des variations d'expression protéique très importantes. Le « dynamic range » dans une cellule se situerait de 1 à 10^5 - 10^6 , ce qui dépasse de loin les capacités des gels d'électrophorèse 2D (de l'ordre de 10^4). A ce niveau, les protéines en faible abondance sont peu visibles. Une des manières de contourner cette limite est d'envisager des stratégies d'enrichissement ou de pré-fractionnement afin d'enrichir les échantillons en protéines moins exprimées comme, par exemple, les protéines phosphorylées.
- La grande diversité chimique des protéines tant par leur point isoélectrique que par leur poids moléculaire, fait qu'une proportion des protéines ne pourra être analysée. Les progrès récents pour les gradients de pH ont cependant amélioré la "couverture" du protéome par les gels 2D.
- L'extraction et la solubilisation des protéines faiblement solubles, comme les protéines membranaires et nucléaires, restent délicates. A ce stade, des améliorations au niveau des détergents et des protocoles d'extraction ont été faites, mais l'optimisation au cas par cas reste critique.
- Les gels 2D se prêtent difficilement à l'automatisation, alors que les techniques de spectrométrie de masse en aval le permettent.

3.2.1.2. Electrophorèse 2D conventionnelle et DIGE (Difference In Gel Electrophoresis)

Au niveau des **électrophorèses 2D conventionnelles**, chaque gel représente une seule condition. Les gels sont colorés post-migration, en général, soit avec le Bleu de Coomassie, soit à l'argent, soit avec le Sypro Ruby (fluorescent). Les avantages et inconvénients liés à ces colorations sont résumés dans le tableau I.4. Après coloration, les gels sont analysés. Afin de minimiser les variations entre les gels, un certain nombre de gels est requis pour pouvoir établir, lors de l'analyse, un gel moyen de chaque condition « contrôle » et de chaque condition « test », pour ensuite pouvoir les comparer. En effet, il est souvent difficile de déterminer si les variations observées entre les spots sont dues à des différences biologiques ou plutôt à des différences de gel à gel (Figure I.16).

Récemment, une nouvelle technique a été introduite : la **technique DIGE**. Dans ce cas, les extraits protéiques sont marqués avec des fluorochromes Cy (Cy 2,3 ou 5), lors de la préparation des échantillons protéiques, avant la migration électrophorétique. Trois

échantillons protéiques (par exemple : contrôle, test, standard interne) sont marqués avec trois fluorochromes différents, puis mélangés et chargés sur un même gel. Le standard interne correspond à une quantité égale des différentes conditions « contrôles » et des différentes conditions « test ». Il représente l'avantage majeur de cette technique. En effet, le standard interne permet d'éliminer les variations dans un même gel et d'un gel à l'autre. C'est pourquoi, cette technique nécessite un moins grand nombre de gels par rapport aux techniques d'électrophorèses 2D conventionnelles (Figure I.16). En outre, grâce à une normalisation de l'abondance de chaque spot par rapport au standard interne, dit de référence, une variation d'expression protéique d'une condition à l'autre de 10% est fiable à 95%, ce qui n'est pas le cas dans les techniques 2D conventionnelles (Figure I.17). Cette technique présente donc de nombreux avantages : elle est très sensible, quantitative, rapide, Et elle constitue sans aucun doute une amélioration considérable pour les techniques gel-dépendantes. Elle requiert toutefois un équipement spécifique et les fluorochromes Cydye sont assez coûteux.

3.2.2. *Les approches protéomiques gel-indépendantes*

A côté des gels PAGE-bidimensionnels, la protéomique a explosé, grâce au développement de méthodes de séparation dites multi-dimensionnelles, puissantes et rapides, basées essentiellement sur :

- de la chromatographie en phase gazeuse (GC)
- de la chromatographie en phase liquide (HPLC)
- de l'électrophorèse capillaire

couplées entre elles et/ou avec des spectromètres de masse. Le spectromètre de masse servira dans ce cas non seulement à identifier les peptides, mais aussi en premier lieu à les séparer.

Ces techniques dépassent de loin le cadre de ce mémoire (pour une revue récente, voir Rabilloud, 2002, Guttman *et al.*, 2004). Elles génèrent également des quantités de données colossales, qui requièrent des ressources informatiques puissantes.

En guise d'illustration, nous décrirons rapidement deux techniques pour lesquelles, il y a déjà un peu de recul, les technologies MUDPIT et ICAT.

A. Technologie MUDPIT (MULTi-Dimensional Protein Identification Technology)

L'extrait protéique total est digéré par une ou plusieurs protéases, pour générer un mélange de fragments peptidiques. Celui-ci est alors chargé sur un système de séparation multi-dimensionnelle chromatographique en interface avec un spectromètre de type MS/MS. La séparation chromatographique combine une colonne échangeuse de cation (SCX = Strong Cation Exchange) et une colonne en phase inverse (Figure I.18). L'interface avec le spectromètre de masse, permet l'identification des peptides au fur et à mesure qu'ils s'éluent de la colonne en phase inverse. Cette technique est complexe à mettre en œuvre et une analyse peut durer jusqu'à 20 heures. Elle se prête bien à toute automatisation. Cette approche est donc recommandée pour l'analyse de protéome complet, mais dans le cas d'analyse de variation d'expression protéique, on ne peut que détecter la présence ou l'absence d'une protéine sans information quantitative. Elle a été appliquée avec succès pour décrire le protéome de levure (pour une revue, voir Rabilloud, 2002).

B. ICAT (Isotope Coded Affinity Tag)

La technologie ICAT, contrairement à la technologie MUDPIT, permet une analyse quantitative et des comparaisons entre échantillons. Elle utilise une sonde synthétique qui comporte trois éléments : un groupe réactionnel qui se lie aux cystéines (agent alkylant) et qui va permettre d'accrocher l'ICAT aux protéines. Un tag biotine qui va permettre, par chromatographie d'affinité, de récupérer les fragments protéiques ayant fixé l'ICAT et un support synthétisé en version légère (8 atomes d'hydrogène) ou lourde (8 atomes de deutérium). Les formes hydrogènes et deutérées ont une différence de masse de 8 Da détectable en MS.

Les protéines sont donc marquées au niveau de leur cystéines, avec la sonde lourde pour l'un des échantillons, et avec la sonde légère pour l'autre échantillon. Ensuite, les deux échantillons marqués, correspondant à deux états cellulaires différents, sont mélangés et digérés par la trypsine. Les peptides sont chargés sur une colonne d'affinité liée à l'avidine pour ne retenir que les peptides liés à l'ICAT. Après élution, ils sont analysés et quantifiés par MS/MS (Figure I.19). La sélection des peptides biotinylés fait qu'une seule étape de séparation est suffisante et simplifie le travail analytique des peptides générés.

Donc, cette technologie permet l'identification et la quantification rapide de plus d'une centaine de protéines différenciellement exprimées, dont les protéines membranaires. Cette technique présente un certain nombre d'avantages par rapport à la technique classique des gels 2D. Notamment, l'analyse des protéines est faite sans restriction sur le point isoélectrique. Les protéines hydrophobes deviennent accessibles ainsi que les protéines faiblement exprimées. Elle est sensible et automatisable. Par contre, une des plus importantes limitations est que l'ICAT ne travaille qu'avec des protéines contenant une cystéine, ce qui ne représente pas l'entièreté des protéines (85 à 90%). Il faut aussi tenir compte du fait que les protéines ne contenant qu'une cystéine ne seront identifiées que sur base d'un seul peptide, ce qui dans le cas d'une faible abondance peut poser problème. De plus, le tag ICAT est de ~ 500 kDa, ce qui peut interférer avec l'analyse par spectrométrie de masse des petits peptides. Cette technique est également coûteuse (pour une revue, voir Rabilloud, 2002).

En conclusion, les gels d'électrophorèse 2D ne sont plus la seule approche pour faire de la protéomique. S'ils ne constituent plus le premier choix quand on veut lancer un programme « all-proteome », ils restent cependant compétitifs pour analyser des profils d'expression différentiels et pour mettre en évidence une série de modifications post-traductionnelles, et ce d'autant plus avec le développement des gels DIGE. L'avenir des gels 2D passera sans doute par le préfractionnement des échantillons, ce qui simplifie l'analyse, élimine les protéines abondantes (actine, tubuline, ...) et augmente les chances de détecter les protéines d'intérêt peu abondantes.

4. Objectif du mémoire

Une des premières étapes pouvant mener à l'athérosclérose est le dysfonctionnement endothélial. De nombreux facteurs peuvent influencer les cellules endothéliales :

- les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL-1, ...
- des facteurs de croissance tels que les VEGF, FGF, ...
- des stress mécaniques (force de cisaillement, ...)
- le LPS d'origine bactérienne
- le tabagisme et l'hyperhomocystéinémie, deux facteurs de risque associés à l'athérosclérose
- les ox-LDL ainsi que divers lipides bioactifs produits lors de l'oxydation des LDL, tels que les isoprostanes ou encore le LPA, sur lequel se focalise ce travail, comme expliqué au point 2 de l'introduction.

Pour étudier les effets du LPA sur les cellules endothéliales, nous avons choisi le modèle des cellules EAhy926, qui résultent de la fusion entre des HUVEC et des cellules immortelles de carcinome A459.

Etant donné que les mécanismes moléculaires d'action du LPA restent mal connus, nous avons opté pour l'approche protéomique, sans *a priori*, via des gels d'électrophorèse bidimensionnels. Mais avant d'aborder ce volet protéomique, qui se prête mal à des mises au point des conditions expérimentales de stimulation, nous avons opté pour des approches à *a priori*.

Nous avons tout d'abord déterminé les effets du LPA sur la sécrétion du MCP-1. En effet, le MCP-1 joue un rôle important dans l'athérogenèse. Il permet le recrutement et l'infiltration des monocytes à travers la barrière endothéliale. Il est principalement induit par les cellules endothéliales en réponse à divers stimuli (IL- α , IL-1 α , TNF α , LPS) dont les LDL oxydées. Nous avons également étudié l'implication du facteur transcriptionnel AP-1, reconnu pour réguler l'expression du MCP-1, et celle des MAPK, activées via les récepteurs membranaires au LPA.

Suite à des résultats probants, nous avons alors entamé la deuxième partie de ce travail, l'approche protéomique afin d'étudier les effets du LPA sur l'expression au niveau protéinique.

Nous espérons, par cette approche, obtenir un meilleur éclairage moléculaire sur le dysfonctionnement que pourrait induire le LPA au niveau des cellules endothéliales.

1. Culture Cellulaire

1.1. Culture des cellules endothéliales EAhy926

1.1.1. Matériels

- Cellules endothéliales EAhy926 (fournies gracieusement par Coran-Jean S. Edgell de l'Université de Caroline du Nord)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm₂ (T25) ou de 75 cm₂ (T75) (Costar, USA)
- Solution stérile de trypsine-EDTA : trypsine à 0,05% ; EDTA 0,53 mM (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Milieu de rinçage préchauffé : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Tube de 10 ml (Becton Dickinson, Royaume-Uni)
- Centrifugeuse (Universal Hettich, Allemagne)
- Microscope inversé (Diavert, Leitz)
- Ethanol absolu (Merck, Allemagne)
- Sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Milieu DMEM (DHG) (Référence = 41966-029) (Gibco BRL, Royaume-Uni)
- Milieu DMEM (DHG) + Antibiotiques : Pénicilline (50 µg/ml), Streptomycine (50 µg/ml) (Bio Whittacker, Belgique) = **milieu stock**
- Milieu stock + 10% de sérum
- Ampoules à congélation (Nunc, Danemark)
- DMSO (Acros Chimica, Belgique)

1.1.2. Méthodes

1.1.2.1. Repiquage des cellules EAhy926

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture T75 stériles placées dans une étuve à 37°C et 5% de CO₂ afin d'ajuster le pH. La confluence dans les T75 est généralement atteinte après deux jours, ce qui représente environ dix millions de cellules par T75. Ces cellules sont alors repiquées en 2. Après avoir décanté le milieu de culture, les cellules sont rincées avec 10 ml de milieu de rinçage. Ensuite, les cellules sont détachées suite à une incubation d'une à deux minutes à 37°C avec 1 ml de trypsine-EDTA, puis, 9 ml de milieu stock + 10% sérum sont ajoutés afin d'inhiber son action. Le tout est récupéré dans un tube de 10 ml et centrifugé 10 minutes à 1.000 RPM. Le culot cellulaire obtenu est alors resuspendu dans 8 ml de milieu stock + 10% sérum, dans le cas d'un repiquage en 2. On reprend alors 4 ml de cette suspension dans 11 ml de milieu stock + 10% de sérum pour chaque nouvelle T75.

1.1.2.2. Congélation des EAhy926

Les cellules, confluentes, sont rincées, trypsinisées et recueillies dans 9 ml de milieu stock + 10% de sérum. Ensuite, elles sont centrifugées 10 minutes à 1.000 RPM. Le culot est alors resuspendu dans 1 ml de milieu DMEM (DHG) avec 20% de sérum et 10% de DMSO. L'équivalent de chaque T75 est transvasé dans un cryotube placé dans un système de refroidissement pour une nuit à -70°C. Par la suite, le cryotube est placé dans de l'azote liquide, à -196°C.

1.1.2.3. Décongélation des EAhy926

L'ampoule, contenant les cellules, est immédiatement plongée dans de l'eau à 37°C après l'avoir retirée de l'azote liquide. Ensuite, les cellules sont déposées dans une T75 contenant 15 ml de milieu stock + 10% de sérum. Le DMSO étant toxique pour les cellules, le milieu est changé dès que les cellules sont adhérentes.

2. Caractérisation de l'état d'activation des cellules endothéliales EAhy926

2.1. Mise en évidence de l'activation du facteur de transcription AP-1 par dosage colorimétrique

2.1.1. *Matériels*

2.1.1.1. Fixation des sondes de capture double brin

- Plaque 96 puits pré-conditionnés avec de la streptavidine (Roche, Allemagne)
- Sondes de capture double brin biotinylées contenant la séquence consensus pour AP-1 (Eurogentec, Liège, Belgique)
- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Eau distillée
- Tween 20 à 0,1% (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)

2.1.1.2. Stimulation et extraction des cellules et dosage des protéines par la méthode de Bradford

- Boîtes de culture T25 (Costar, USA)
- Milieu stock + BSA 0,1% (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)
- PMA (0,1 µg/ml) (Sigma, USA) + ionomycine (1 µM) (Sigma, USA) comme contrôle positif
- LPA (25 µM) (Sigma, USA)
- PTX (50 ng/ml) (inhibiteur des protéines G) (sigma, USA)
- PD 98059 (20 µM) (inhibiteur des MEK1/2) (Biomol Research Laboratories, USA)
- U 0126 (20 µM) (inhibiteur des MEK1/2) (Cell signaling, USA)
- SB 203580 (20 µM) (inhibiteur de la voie p38) (Biochemicals, USA)
- Wortmanine (10 µM) (inhibiteur de la PI₃K) (Biomol Research Laboratories, USA)
- LY 294002 (50 µM) (inhibiteur de la PI₃K) (Calbiochem, USA)
- H 89 (20 µM) (inhibiteur de la PKA) (Biomol Research Laboratories, USA)
- Calphostine C (2 µM) (inhibiteur de la PKC) (Biomol Research Laboratories, USA)
- Gö6976 (300 nM) (inhibiteur de la PKC) (Biomol Research Laboratories, USA)
- Solution de rinçage 1 : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Solution de rinçage 2 : PBS + Na₂MoO₄ 1 mM + NaF 5 mM

- HB 2x (Composition voir tableau II.1)
- HB 1x : diluer deux fois du HB 2x dans de l'eau filtrée
- PIB (Composition voir tableau II.1)
- PIC (Composition voir tableau II.1)
- Tampon de lyse (Composition voir tableau II.1)
- RE stock (Composition voir tableau II.1)
- RE complet (Composition voir tableau II.1)
- SA stock (Composition voir tableau II.1)
- SA complet (Composition voir tableau II.1)
- Extraits protéiques de cellules stimulées ou non
- Bleu de Coomassie dilué 5 fois dans de l'eau distillée (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories)
- Etalon : BSA (0,2 mg/ml) (Sigma, USA)
- Centrifugeuse (Labofuge 400R, Heraeus, Allemagne)

2.1.1.3. Dosage colorimétrique proprement dit

- Tween 20 (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)
- Tampon de lyse complet (Composition voir tableau II.1)
- Tampon de binding 3x (Composition voir tableau II.1)
- Tampon de binding complet (Composition voir tableau II.1)
- PBS bis : NaCl 50 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- BSA (Sigma, USA)
- Anticorps primaire polyclonal (IgG) de lapin anti-cFos (Santacruz, USA)
- Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Roche, Allemagne)
- TMB (Bio Source, Belgique)
- Solution Stop (Bio Source, Belgique)
- Lecteur multi-plaque (Ultramark, Bio-Rad, USA)

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Fixation des sondes de capture

Les sondes de capture biotinylées, à une concentration de 4 picomoles pour 50 μ l par puits, sont déposées dans les puits pré-conditionnés à la streptavidine pour une heure à 37°C. Ensuite, les puits sont rincés deux fois avec 100 μ l de PBS bis + Tween 20 à 0,1% puis, une fois avec de l'eau distillée. Enfin, les puits sont séchés à 37°C pendant une heure et les plaques stockées à 4°C.

2.1.2.2. Stimulation des cellules et extraction protéique

Après avoir stimulé les cellules (voir résultats et discussions), les T25 sont rincées avec 3 ml de PBS froid, puis avec 3 ml de solution de rinçage 2. Ensuite, après avoir ajouté 3 ml de HB 1x froid (solution hypotonique), les cellules sont incubées 10 minutes sur glace. Après l'avoir décanté, 200 μ l de tampon de lyse sont additionnés. Les cellules sont alors raclées dans ce tampon, récoltées dans un eppendorf et centrifugées 30 secondes à 13.000 RPM. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans 30 μ l de RE complet et un volume identique de SA complet est ajouté (solution hypertonique). L'incubation sur roue dure au minimum 30

minutes à 4°C. Suite à cela, les extraits sont centrifugés 10 minutes à 13.000 RPM à 4°C. Le surnageant est alors aliquoté, dosé par Bradford et conservé à -70°C.

2.1.2.3. Dosage colorimétrique proprement dit

- **Fixation des lysats cellulaires** : 30 μ l de tampon de binding complet sont déposés dans chaque puits. Ensuite, 20 μ l d'extraits cellulaires, dilués dans du tampon de lyse de façon à obtenir une concentration de 10 μ g de protéines dans un volume final de 20 μ l par puits, sont ajoutés pour une durée d'une heure sous légère agitation. Enfin, les puits sont rincés trois fois avec 200 μ l de PBS bis + Tween 20 (0,1%).
- **Fixation de l'anticorps primaire anti-cFos** : 100 μ l d'anticorps dilué 1.000 fois dans du PBS bis + BSA 1% sont déposés dans les puits pour une heure d'incubation. Suite à cela, les puits sont rincés trois fois avec du PBS bis + Tween 20 (0,1%).
- **Fixation de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase** : A nouveau, l'anticorps dilué 1.000 fois est déposé dans les puits pour une heure d'incubation, puis les puits sont rincés quatre fois au PBS bis + Tween 20 (0,1%).
- **Réaction colorimétrique** : 100 μ l de TMB sont déposés dans chaque puits à l'abri de la lumière, pour 10 minutes. Ensuite, 100 μ l de solution stop sont ajoutés. La lecture se fait à 450 nm, à l'aide d'un lecteur de multi-plaques.

2.2. Dosage de la sécrétion de MCP-1 par test ELISA

2.2.1. Matériels

- Plaque 24 puits (Costar, USA)
- TNF alpha (10 ng/ml) comme contrôle positif (R&D Systems, Belgique)
- Etalon BSA (200 μ g/ml)
- Solution de NaOH 1 N (Merck, Allemagne)
- Solution de NaOH 0,5 N (Merck, Allemagne)
- Milieu de rinçage : PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Solution A (Composition voir tableau II.2)
- Folin dilué 2 fois dans de l'eau distillée (Merck, Allemagne)
- Spectrophotomètre (Uvikon 930, Kontron instruments, Suisse)
- Quantikine human-MCP-1 Immunoassay (DCP00/ R & D systems, Royaume-Uni) (Composition voir tableau II.2)
- Milieu stock + BSA 0,1%
- LPA (stock = 10 mM dans de l'eau) (Sigma, USA)

2.2.2. Méthodes

2.2.2.1. Récupération du surnageant

La stimulation des cellules terminée (voir résultats et discussions), le surnageant est récupéré et centrifugé 3 minutes à 13.000 RPM. Il est alors aliquoté et congelé à -20°C. D'un autre côté, les cellules sont directement rincées deux fois au PBS préchauffé, puis, 1 ml de NaOH 0,5 N est ajouté pour 30 minutes, en vue d'un dosage protéinique. Un étalon BSA (0,2 mg/ml) et un blanc (eau distillée) seront également préparés dans du NaOH 1 N. Les surnageants récupérés sont congelés à -20°C.

2.2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Folin

400 μ l d'extraits protéiques sont ajoutés à 2 ml de la solution A. Les solutions sont vortexées et incubées 15 minutes. Ensuite, 200 μ l de Folin dilué deux fois dans de l'eau distillée sont additionnés à chaque condition de 30 secondes en 30 secondes. Les échantillons sont à nouveau vortexés et incubés 30 minutes. L'absorbance se lira au spectrophotomètre à 660 nm toutes les 30 secondes.

2.2.2.3. Dosage du MCP-1 secrété par utilisation du kit R&D Quantikine human MCP-1

La première étape de ce dosage sera la reconstitution du standard afin de réaliser par après la droite d'étalonnage. Pour cela, il faut tout d'abord reconstituer le Standard MCP-1 avec 5 ml du diluant de calibration RD5L. Cette dilution produit une solution stock de 2.000 pg/ml. A partir de ce stock, des dilutions de 2 en 2 dans du diluant de calibration RD5L sont réalisées.

La deuxième étape n'est autre que le dosage en tant que tel. Il se réalise dans une plaque 96 puits pré-incubée avec un anticorps monoclonal spécifique du MCP-1. Les aliquots et les différentes dilutions du standard sont déposés à raison de 200 μ l par puits. Après 2 heures, les puits sont décantés et rincés trois fois avec 300 μ l de la solution de rinçage. Ensuite, 200 μ l d'un anticorps polyclonal, spécifique du MCP-1 et couplé à une peroxydase sont déposés dans chaque puits. L'anticorps en question ira reconnaître le MCP-1, fixé au fond de chaque puits. L'incubation dure une heure à température ambiante. Ensuite, trois lavages sont effectués. Puis, 200 μ l de solution de coloration sont déposés dans les puits, à l'obscurité, pour 20 minutes. Ensuite, 50 μ l de solution stop sont ajoutés. La quantification du MCP-1 est réalisée par lecture en colorimétrie à 450 nm.

2.3. Mise en évidence des protéines ERK-1 et ERK-2 phosphorylées ou non par Western Blot

2.3.1. Matériels

- **Stimulation** : - Milieu stock + BSA 0,1%
 - LPA (25 μ M) (Sigma, USA)
 - PTX (5 ng/ml) (inhibiteur des protéines G) (Sigma, USA)
 - PD 98059 (20 μ M) (inhibiteur de MEK 1/2) (Biomol Research Laboratories, USA)
 - U0126 (20 μ M) (inhibiteur des MEK1/2) (Cell Signaling, USA)
- **Extraction totale** : - Tampon de lyse (Composition voir tableau II.3)
 - Tampon de lyse complet (Composition voir tableau II.3)
- **Migration** : - Gel 10% Bis-Tris, 10 puits x 1,5 mm (NuPage) (Invitrogen, Carlsbad)
 - Tampon de charge Sample buffer 4x (NuPage) (Invitrogen, U.S.A.)
 - DTT 1 M (Sigma, U.S.A.)
 - Tampon de charge complet (Composition voir tableau II.3)
 - Marqueur de poids moléculaire = See Blue Plus 2 (Invitrogen, U.S.A.)

- Tampon MOPS (NuPage) (Invitrogen, U.S.A.)
- Tampon de migration (Composition voir tableau II.3)
- Anti-oxydants (NuPage) (Invitrogen, Carlsbad)
- **Transfert** : - Tampon de transfert 20x (NuPage) (Invitrogen, Carlsbad) (Composition voir tableau II.3)
- Membranes (Amersham, Suède)
- Papiers Whatman (Merck, Allemagne)
- **Blocking** : - Solution stock de TBS (10x) (Composition voir tableau II.3)
- Solution TBS-T (Tween) 0,1% (Composition voir tableau II.3)
- Solution TBS-T 0,07% (Composition voir tableau II.3)
- Solution de blocking (Composition voir tableau II.3)
- **Anticorps** : - Anticorps primaire polyclonal (IgG) de lapin anti-phospho p44/42 MAP Kinase (Cell Signaling, USA) (voir tableau II.4)
- Anticorps secondaire de singe anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (Amersham, Angleterre) (voir tableau II.4)
- Anticorps primaire monoclonal anti-ERK-1 (Transduction Laboratories, Angleterre) (voir tableau II.4)
- Anticorps primaire monoclonal anti-ERK-2 (Transduction Laboratories, Angleterre) (voir tableau II.4)
- Anticorps secondaire de singe anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase (Amersham, Angleterre) (voir tableau II.4)
- Anticorps primaire monoclonal anti- α -tubuline (Sigma, USA) (voir tableau II.4)
- **Révélation** : - Film autoradiographique (Hyperfilm ECL) (Amersham, UK)
- Kit de révélation (ECL advance Western blotting) (Amersham, UK)

2.3.2. Méthodes

- **Extraction totale** : La stimulation terminée (voir résultats et discussions) et suite à deux rinçages avec 3 ml de PBS, 100 μ l de tampon de lyse complet sont ajoutés. Les cellules sont alors raclées dans ce tampon et récoltées dans un eppendorf. Ceux-ci sont incubés sur glace 30 minutes et vortexés toutes les 10 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes à 13.000 RPM à 4°C, le surnageant est récupéré, dosé par Bradford, aliquoté et stocké à -70°C.
- **Préparation des échantillons et migration** : 20 μ g d'extraits protéiques sont préparés dans un volume final de 20 μ l, lesquels contiennent déjà 5 μ l de tampon de charge complet. Les échantillons sont alors chauffés 10 minutes à 70°C, puis centrifugés 30 secondes à 13.000 RPM. Ils sont ensuite chargés dans les puits du gel de polyacrylamide, de même que 7 μ l du marqueur de poids moléculaire. La migration se passe à 200 V, 400 mA avec un voltage constant et dure environ 50 minutes.
- **Transfert sur membrane** : Les membranes trempent 1 minute dans du méthanol, puis elles sont incubées, ainsi que les papiers Whatman, 5 à 15 minutes dans du tampon de transfert. Un système « sandwich » est alors réalisé dans une cuve de transfert (Figure II.1). Le transfert dure 2h30 à 30V, 250 mA.
- « **Blocking** » et **incubation avec les anticorps primaires et secondaires** : Après le transfert, les membranes sont incubées deux heures dans la solution de blocking. Ensuite, afin de détecter la forme phosphorylée des deux protéines, les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire anti-phospho p44/42 (Tableau II.4). Les membranes sont

rincées trois fois 15 minutes et deux fois 5 minutes au TBS-T 0,1%, avant d'être mises en présence de l'anticorps secondaire anti-lapin, couplé à la peroxydase. Après les rinçages et la révélation, les membranes sont à nouveau incubées deux heures dans la solution blocking afin de pouvoir détecter, par la suite, la forme totale de ERK et le contrôle de charge, l' α -tubuline. Etant révélés par le même anticorps secondaire, l'anticorps primaire anti-ERK1, anti-ERK-2 et l' α -tubuline peuvent se trouver dans la même solution. Après les rinçages, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris, à nouveau, rincées puis révélées.

- **Révélaiton** : Les membranes sont incubées 5 minutes avec la solution A et B (volume/volume) du kit de révélation. Ensuite, un film autoradiographique est exposé sur le transparent recouvrant la membrane en chambre noire, pendant des temps variables afin d'obtenir une exposition optimale. Le film est alors placé dans une solution de révélation, lavé à l'eau, fixé 3 à 4 minutes dans une solution de fixation et lavé à l'eau courante.

3. Approche protéomique par les gels 2D

3.1. Coloration à l'argent

3.1.1. Matériels

3.1.1.1. Première dimension

- Tampon de réhydratation (Composition voir tableau II.5)
- ImmobilineTM drystrip, pH 4-7, 18 cm (Amersham, Suède)
- Huile de paraffine : Drystrip cover fluid (Amersham, Suède)
- Tampon de lyse (Composition voir tableau II.5)
- Centrifugeuse (Biofuge Pico, Heraeus, Allemagne)
- IPGphor isoelectric focusing system (Amersham, Suède)
- Papiers électrodes (Amersham, Suède)
- Papiers Whatman (Merck, Allemagne)

3.1.1.2. Deuxième dimension

- EttanTM DALT II System (Amersham, USA)
- Ettan DALT II : Gel Caster (Amersham, Suède)
- Solution de Déplacement (Composition voir tableau II.6)
- Solution de polymérisation pour des gels 10% (Composition voir tableau II.6)
- Isobétanol saturé d'eau (UCB, Belgique)
- Tris HCl 1,5 M à pH 8,8 (Composition voir tableau II.6)
- Solution d'équilibration (Composition voir tableau II.6)
- Solution d'équilibration avec DTT (par gel) :
 - 10 ml de tampon d'équilibration
 - 100 mg de DTT (Sigma Chemical, USA)
- Solution d'équilibration avec iodoacétamide (par gel) :
 - 10 ml de tampon d'équilibration
 - 250 mg d'iodoacétamide (Acros organics, Belgique)
- Tampon d'électrophorèse 5x concentré (Composition voir tableau II.6)
- Solution d'agarose (Composition voir tableau II.6)
- Etalon : See Blue^R Plus 2 (Tris-Glycine) (Invitrogen, USA)

3.1.1.3. Révélation

- Solution de fixation : 300 ml/gel
 - 150 ml de méthanol (Acros Organics, Belgique)
 - 15 ml d'acide acétique (Merck, Allemagne)
 - 135 ml d'eau distillée
- Solution de lavage : 300 ml/gel
 - 150 ml de méthanol
 - 150 ml d'eau distillée
- Solution d'incubation « sensitizing » : 300 ml/gel
 - 60 mg de sodium thiosulfate (Sigma, USA)
 - 300 ml d'eau distillée
- Eau distillée
- Solution argentique : 300 ml/gel
 - 0,3 g de nitrate d'argent (Merck, Allemagne)
 - 300 ml d'eau distillée
- Solution de développement : 600 ml/gel
 - 12 g de carbonate de sodium (Merck, Allemagne)
 - 240 μ l de formaldéhyde (Sigma, USA)
 - 600 ml d'eau distillée
- Solution Stop : 600 ml/gel
 - 30 ml d'acide acétique (Merck, Allemagne)
 - 570 ml d'eau distillée

3.1.2. Méthodes

3.1.2.1. Première dimension

- **Réhydratation des gels** : 350 μ l de tampon de réhydratation par gel sont répartis sur toute la longueur dans un Reswelling Tray. Ensuite, les gels sont déposés, face vers le bas. Après 15 minutes, 2 ml d'huile sont étalés afin d'éviter une cristallisation de l'urée. Le temps de réhydratation dure entre 12h et 20h.
- **Préparation des échantillons** : Après avoir déposé la quantité d'extraits protéiques correspondant à 100 μ g de protéines, la même quantité de tampon de lyse est ajoutée. Puis, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 4°C à 13.000 RPM.
- **Migration de la première dimension** : Les gels sont déposés dans un strip holder, face vers le haut. Un papier électrode de 1 cm est déposé de chaque côté du gel, après avoir été trempé une fois dans de l'eau (désionisée) et séché sur du papier Whatman une fois, pour le côté de la cathode, et deux fois pour le côté de l'anode. Les électrodes sont placées sur ces papiers électrodes. Ensuite, 2 ml d'huile sont répartis sur toute la longueur des gels. Après avoir placé la cupule de chargement du côté acide, les strips holder sont déposés sur l'appareil et les gels sont à nouveau recouvert par 2 ml d'huile. Les échantillons sont déposés dans la cupule. La migration se passe comme suit : 3h à 300V (step), 6h à 1.000V (gradient), 3h à 8.000V (gradient) et 20.000 Vhr à 8.000V (step). Après la migration, les gels peuvent être conservés dans un support à -80°C.

3.1.2.2. Deuxième dimension

- **Préparation des gels 10%** : Les plaques de verres sont placées dans le gel caster, séparées par des feuilles plastiques. La solution de déplacement est déposée dans la petite chambre. Ensuite, la solution de polymérisation est coulée dans l'entonnoir, jusqu'à recouvrir la quasi totalité des plaques, suivie d'un peu de liquide de déplacement. Afin d'éviter des bulles d'air, 1 ml de solution d'isobutanol saturée d'eau sont déposés entre les 2 plaques de verre. La polymérisation dure au moins 1h30.
- **Deuxième dimension** : Les gels de la première dimension sont rincés à l'eau distillée, incubés 15 minutes dans la solution d'équilibration avec DTT, puis, 15 minutes avec la solution d'équilibration contenant l'iodoacétamide. Après équilibration, les gels 1D sont rincés dans la solution d'électrophorèse et déposés sur le gel de deuxième dimension. Pour ce faire, le gel 1D est placé sur la plaque de verre, puis il faut le faire descendre à l'aide d'une spatule sur le deuxième gel en évitant les bulles d'air. En même temps, la solution d'agarose, chauffée à 100°C, est déposée entre les deux plaques. Après avoir bien rincé l'Etta Dalt à l'eau distillée, le remplir avec du tampon d'électrophorèse dilué 5x. Les plaques de verre sont déposées dans l'appareil. Ensuite, le tampon d'électrophorèse est déposé jusqu'au trait de niveau. L'électrophorèse se passe pendant 17h, à 12°C et 1,5 W par gel.

3.1.2.3. Coloration à l'argent

La deuxième dimension terminée, les gels sont démoulés et placés dans les bains de coloration. Les gels 2D sont directement placés dans la solution de fixation pendant 20 minutes sous agitation, puis ils sont rincés dans la solution de lavage pendant 10 minutes. Ensuite, les gels sont placés dans de l'eau pendant au moins 2 heures, sous légère agitation. Après, ils sont placés 1 minute dans la solution « sensitizing » avant d'être rincés 2 x 1 minute dans de l'eau. Ils sont alors déposés 20 minutes dans une solution d'argent. Après être rincés 2 x 1 minute dans de l'eau, les gels sont placés dans la solution de développement jusqu'à l'apparition des protéines. Pour terminer la réaction, les gels sont placés dans la solution stop.

3.2. Gels 2D en fluorescence

3.2.1. *Matériels*

3.2.1.1. Stimulation et extraction protéique

- Boîtes de culture T25 (Costar, USA)
- Milieu stock + BSA 0,1% (Sigma Aldrich Chemie, Allemagne)
- LPA (Sigma, USA)
- PBS : NaCl 150 mM, phosphate 10 mM à pH 7,4
- Tampon de lyse DIGE labelling (Dla) pH 8,5 (Composition voir tableau II.5)

3.2.1.2. Préparation des échantillons

- Centrifugeuse (Labofuge 400R, Heraeus, Allemagne)
- PH test (Sigma, USA)
- NaOH 50 mM
- CyDye 2, 3, 5 (Amersham, Angleterre)
- DMF (Sigma, USA)
- Lysine (Sigma, USA)
- Tampon de lyse "Buffer" (Composition voir tableau II.5)

3.2.1.3. Première dimension : voir matériels et méthodes 3.1.1.1.

3.2.1.4. Deuxième dimension : voir matériels et méthodes 3.1.1.2.

3.2.1.5. Analyse des gels

- Typhoon 9410 Imager (Amersham, Allemagne)

3.2.2. *Méthodes*

3.2.2.1. Stimulation et extraction des protéines

- **Extraction protéique** : La stimulation terminée (voir résultats et discussions), et suite à deux rinçages au PBS froid, les cellules sont raclées dans 500 μ l de PBS par T75. Après une centrifugation de 10 minutes à 1.000 RPM à 4°C, le culot est resuspendu dans 50 μ l de tampon de lyse D1a par T75. Ensuite, les échantillons sont vortexés à 1.200 RPM à 8°C pendant 30 minutes et peuvent être conservés à -80°C.

3.2.2.2. Première dimension :

- **Réhydratation des gels** : voir matériels et méthodes 3.1.2.1.
- **Préparation des échantillons** : Après une centrifugation de 10 minutes à 13.000 RPM à 4°C, les surnageants sont récupérés. Afin d'optimiser la fixation des fluorochromes au niveau des protéines, le pH des échantillons doit se trouver entre 7,5 et 9, avec un idéal à 8,5. Pour ce faire, le pH des échantillons est évalué à l'aide d'un pH test. Si celui-ci est trop faible, du NaOH 50 mM est ajouté (par 1 μ l) au fur et à mesure dans les échantillons jusqu'à obtenir le pH adéquat. Ensuite, les protéines sont dosées par la méthode de Bradford.

Pour chaque gel, 50 μ g de standard interne, 50 μ g d'une condition contrôle et 50 μ g d'une condition stimulée sont chargés (voir Tableau II.7). Le standard interne correspond à une quantité égale des différentes conditions contrôles et des différentes conditions stimulées au cours de l'expérience. Le standard interne est chargé dans chaque gel. 50 μ g de chaque échantillon protéique sont marqués avec 400 picomoles de fluorochrome. Chaque condition est marquée avec un fluorochrome différent.

Les fluorochromes sont d'abord dilués 1,5 fois dans du DMF.

Cette solution stock sera à nouveau diluée dans le DMF lors du marquage des protéines, selon le rapport suivant : 2 μ l de Cydye + 3 μ l de DMF = 5 μ l = 400 picomoles/ μ l pour 50 μ g de protéines.

Pour un marquage idéal, 50 μ g de protéines sont marquées avec 400 picomoles de fluorochrome/ μ l.

Après avoir marqué les protéines avec les cydye correspondants, les échantillons sont vortexés et centrifugés 10 secondes à 13.000 RPM. Ils sont ensuite incubés 30 minutes dans l'obscurité, sur glace. Après les 30 minutes, 1 μ l de lysine 10 mM est ajouté dans chaque échantillon et laissé sur glace 10 minutes dans le noir afin de stopper la réaction.

Les trois échantillons à charger sur le même gel sont poolés et une quantité de tampon de lyse « Buffer » équivalente au volume final de ces trois échantillons est ajouté. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 13.000 RPM à 4°C et chargés en cupule dans les gels 1D.

- **Migration de la première dimension** : voir matériels et méthodes 3.1.2.1.

3.2.2.3. Deuxième dimension

- **Préparation des gels 10%** : voir matériels et méthodes 3.1.2.2.
- **Deuxième dimension** : voir matériels et méthodes 3.1.2.2.

3.2.2.4. Analyse des gels

L'analyse des gels se fait en plusieurs étapes :

- Scanner les gels avec les trois longueurs d'onde correspondant aux trois fluorochromes.
 - Cy2 = 488 nm
 - Cy3 = 532 nm
 - Cy5 = 633 nm
- Scan des gels à 1.000 microns afin de définir un seuil de saturation et permettre ainsi une quantification.
- Rescanner les gels à 100 microns afin de permettre une analyse plus fine.
- Sélectionner une zone, la même pour tous les gels, pour avoir un matching le plus efficace possible (=cropping).
- Dans le Batch processor, déterminer un nombre de spots, par exemple 3.000. Le programme réalise alors une codétection qui établit une « carte » sur chaque gel. Ensuite, on choisit un standard interne comme référence et le programme va normaliser les autres standards pour permettre, enfin, le matching d'un gel à l'autre. Il va, par la suite, calculer les différences de volumes (=intégration de la densité optique) en faisant les rapports suivants : Cy2/Cy3 et Cy2/Cy5 pour chaque gel et pour chaque spot.
- Le programme BVA (Biological Variation Analysis) va ensuite permettre une analyse statistique basée sur la moyenne des gels. Il est alors possible d'inclure des filtres d'exclusion afin de sélectionner les spots présentant des caractéristiques intéressantes (par exemple, jouer sur le volume, la pente, ...).

Avant-propos

Les deux objectifs majeurs de ce mémoire sont d'une part de préciser les effets du LPA sur les cellules endothéliales EAhy926, afin de confirmer que le LPA est une molécule qui est bien capable d'activer les cellules endothéliales et d'autre part, de voir les effets du LPA sur l'expression génique de ces cellules par l'approche protéomique. Pour étudier l'activation par le LPA des cellules endothéliales, nous avons effectué une série de tests préliminaires : un ELISA pour suivre la sécrétion de la chémokine MCP-1, un dosage colorimétrique pour suivre l'activation du facteur de transcription AP-1 et un western blot pour déterminer l'activation des MAPK. Ces expériences devraient nous permettre de mieux cerner les conditions de stimulation des cellules, avant de lancer les expériences plus lourdes de gels d'électrophorèse bidimensionnels.

Mais avant d'entamer l'étude *in vitro* des événements induits par le LPA, il convenait de choisir un modèle cellulaire adéquat.

1. Caractérisation du modèle cellulaire

Le choix d'un modèle cellulaire est une étape délicate. En effet, chaque modèle possède ses avantages et ses inconvénients. Dans ce mémoire, notre choix s'est porté sur les cellules endothéliales. Cette décision peut se justifier aisément dans le cadre de l'athérosclérose. Comme explicité dans l'introduction, les cellules endothéliales sont les premières cellules à être impliquées dans l'athérogenèse. De plus, elles sont les principaux régulateurs de l'homéostasie vasculaire, interagissant d'un côté avec les cellules présentes dans le sang et d'un autre côté, avec les cellules musculaires lisses. Elles sont également impliquées dans la régulation des réponses inflammatoires. En effet, elles permettent le recrutement des cellules inflammatoires aux sites d'inflammation et libèrent des cytokines et des facteurs de croissance. Elles sont également responsables du maintien de l'équilibre de la coagulation et du tonus vasculaire.

Au cours de ce mémoire, nous avons utilisé des cellules EAhy926 (Figure III.1 et III.2). Ces cellules endothéliales résultent de la fusion entre des HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des cellules humaines immortelles de carcinome (A549) (Edgell *et al.*, 1983). Cette lignée immortelle présente de nombreuses caractéristiques des cellules endothéliales : présence du facteur de von Willebrand, corps de Weibel-Palade. Elle répond à l'hypoxie (travaux de C. Michiels et collaborateurs) et au TNF α (F. Maréchal, travail de DES 2003-2004).

La facilité de culture représente un gros avantage de cette lignée cellulaire. Mais, de plus, de nombreux auteurs utilisent de plus en plus ce modèle cellulaire et ce, dans le cadre de l'athérosclérose (McLees *et al.*, 1995; Rival *et al.*, 2002). Norata *et al.* (2003) ont également montré que ces cellules répondent aux VLDL (oxydées ou non) par des changements d'expression génique, analysés par des damiers à haute densité.

Notons également que L. Bette, au cours de son mémoire, a pu mettre en évidence par western blot que les cellules endothéliales EAhy926 expriment les trois récepteurs au LPA, à savoir EDG 2, 4, et 7 (ou LPA₁, LPA₂ et LPA₃).

Il semble donc que ce modèle cellulaire soit relevant pour étudier les effets du LPA dans le cadre de l'athérosclérose, tout en gardant à l'esprit ses propriétés d'hybridome. Les

micrographies des figures III.1 et III.2 révèlent la morphologie des cellules EAhy926 et l'aspect d'une culture non confluente (Figure III.1) et confluente (Figure III.2). La culture à confluence montre des cellules polyédriques, jointives qui forment une monocouche dont l'aspect évoque les cultures d'HUVEC.

2. Etude de l'activation des cellules endothéliales EAhy926 induite par le LPA

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un lipide bioactif connu depuis longtemps pour avoir de multiples effets sur les cellules musculaires lisses et sur les plaquettes. Le LPA aurait également des effets sur les cellules endothéliales. Rizza et ses collègues (1999) ont mis en évidence que le LPA était capable d'augmenter l'adhérence des monocytes sur des cellules endothéliales HAEC (Human Aortic Endothelial Cells). Ils ont également démontré que le LPA induisait l'expression de molécules d'adhérence telles que la E-sélectine ou la VCAM-1. De plus, McLees et ses collègues (1995) ont mis en évidence que le LPA stimule la phosphorylation de ERK-2 au niveau de la voie des MAPK. Mais les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore clairement établis. C'est la raison pour laquelle, dans ce mémoire, nous allons tenter de mieux comprendre la manière dont le LPA affecte les cellules endothéliales.

Pour cela, nous avons décidé de travailler avec la forme oléoyl du LPA car, d'après la littérature, elle présente un effet bioactif important et est capable d'activer les trois récepteurs au LPA, à savoir EDG 2, 4 et 7 (LPA₁, LPA₂ et LPA₃). Avant de réaliser nos expériences, nous avons tout d'abord dissous le LPA dans de l'eau à une concentration de 10 mM. Ce stock est conservé à -70°C. Pour étudier les effets de cette molécule sur les cellules EAhy926, différents tests ont été sélectionnés, à savoir : un ELISA MCP-1, un test colorimétrique sur le facteur de transcription AP-1 et un western blot sur la phosphorylation des ERK1/2. En effet, l'expression de chémokines telles que le MCP-1 et l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que AP-1 sont des marqueurs précoces de l'activation endothéliale au niveau de la paroi vasculaire dans le contexte de l'athérosclérose.

Mais avant d'effectuer toutes ces expériences, il était nécessaire d'évaluer la cytotoxicité du LPA sur les cellules endothéliales EAhy926. Pour ce faire, un test de cytotoxicité avait déjà été réalisé par C. Gustin dans le cadre de sa thèse (et n'a donc pas été répété lors de ce mémoire).

2.1 Evaluation de la cytotoxicité du LPA

L'évaluation de la cytotoxicité du LPA sur les cellules endothéliales EAhy926 nous permettra d'affirmer que les effets activateurs observés, au cours des expériences, sont bien dus à cette molécule et non à une toxicité et/ou mortalité cellulaires.

Pour réaliser ce test, nous avons d'abord effectué une coloration au bromure d'éthidium et à l'acridine orange afin de mettre en évidence le pourcentage de mortalité cellulaire. En effet, nous pouvons distinguer, grâce à un microscope à fluorescence, les cellules vivantes dont le noyau est coloré en vert, des cellules mortes possédant un noyau coloré en orange.

Lors de cette expérience, les cellules sont d'abord mises une heure au repos. Ensuite, elles sont stimulées pendant 6 heures au LPA. Différentes concentrations de LPA ont été testées, à

savoir : 1, 10, 25 et 50 μM . Un contrôle négatif correspondant au milieu stock + BSA 0,1% a également été prévu. Les résultats (non montrés) indiquent un pourcentage de mortalité inférieur à 5% pour toutes les concentrations de LPA testées. Le LPA a donc une faible cytotoxicité sur les cellules endothéliales EAhy926, pour un temps d'incubation de 6 heures.

2.2 Effets du LPA sur la sécrétion de MCP-1

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'athérosclérose est une maladie inflammatoire se développant dans la paroi des vaisseaux sanguins. Cette pathologie est caractérisée par l'accumulation de leucocytes, de macrophages et de lymphocytes T au niveau des lésions (Sheikine and Hansson, 2004). La principale fonction des chémokines, dont fait partie le MCP-1, est de permettre le recrutement des leucocytes circulants par les cellules endothéliales vers l'intima. Le MCP-1 semble donc avoir un rôle important dans l'athérogenèse. De plus, le MCP-1 a été détecté dans les lésions de l'athérosclérose et il est principalement produit par les cellules endothéliales en réponse à divers stimuli tels que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , TNF α), le LPS ou encore les LDL oxydées (Sasayama *et al.*, 2000).

2.2.1. Résultats

Comme le MCP-1 représente une molécule d'intérêt dans l'athérosclérose, nous avons dosé le MCP-1 sécrété par les cellules endothéliales EAhy926 stimulées au LPA. Pour ce faire, nous avons réalisé un ELISA MCP-1. Pour cette expérience, les cellules EAhy926 sont d'abord mises 1 heure au repos dans du milieu stock + BSA 0,1 %. Ensuite, du milieu frais de stimulation contenant le LPA est déposé dans chaque puits pour 6 heures. Différentes concentrations en LPA ont été testées, à savoir 1, 10, 25 et 50 μM . Un contrôle négatif correspondant au milieu stock + BSA 0,1 % a également été réalisé. Après avoir récupéré les différents surnageants pour réaliser l'ELISA, les cellules sont lysées dans du NaOH 0,5 N et récupérées pour faire un dosage protéique selon la méthode de Folin. Toutes les conditions ont été réalisées en double.

La première étape de l'ELISA est la construction de la courbe standard qui va permettre la quantification du MCP-1 sécrété par les cellules stimulées au LPA. Cette courbe standard est représentée à la figure III. 3. Elle exprime la densité optique à 450 nm en fonction de la concentration en MCP-1 (pg/ml). Nous pouvons remarquer que cette droite est bien linéaire. Nous avons ensuite pu quantifier le MCP-1 sécrété par les cellules EAhy926 suite à une stimulation au LPA. Cette quantification est rapportée à la quantité de protéines totales suite au dosage protéique par la méthode de Folin. Les résultats obtenus sont illustrés à la figure III. 4. Ils mettent en évidence une sécrétion dose-dépendante du MCP-1 qui augmente déjà avec le LPA 1 μM . Le maximum correspond à la concentration 50 μM . Malheureusement, à cette concentration, le LPA tend à former des précipités. C'est pourquoi nous avons préféré travailler à une concentration de 25 μM pour toutes les expériences qui suivent, tout en sachant qu'il est déjà actif pour des concentrations inférieures. Ce test nous a donc permis de mettre au point les conditions expérimentales utilisées pour la suite du mémoire.

2.2.2 Discussion

Nous avons démontré qu'après 6 heures de stimulation des cellules endothéliales EAhy926 avec du LPA, nous obtenons une sécrétion dose-dépendante du MCP-1. Cette expérience nous a également permis de déterminer la concentration à laquelle nous allons travailler

ultérieurement, c'est-à-dire à une concentration de 25 μ M en LPA. Signalons que nous n'avons trouvé que très peu de données sur les effets du LPA sur la sécrétion de MCP-1 dans la littérature. Palmetshofer *et al.* (1999) observent également un effet de LPA sur l'expression du MCP-1. Toutefois, celle-ci a été mesurée uniquement au niveau ARNm et sur des cellules endothéliales d'aorte porcine. Ces auteurs utilisent du LPA 100 μ M.

Comme le MCP-1 induit le recrutement des monocytes sur les cellules endothéliales, il serait donc intéressant d'effectuer également un test d'adhérence. Malheureusement, nous n'avons pas eu le temps de le réaliser au cours de ce mémoire. Néanmoins, ce test reste une perspective à court terme, qui compléterait la caractérisation du modèle d'activation des cellules EAhy926 par le LPA.

Toute néosynthèse protéique nécessite, en amont, l'activation de facteur(s) de transcription. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes principalement intéressés à AP-1, car le promoteur du gène codant pour le MCP-1 est régulé entre autres par ce facteur de transcription.

2.3. Effets du LPA sur l'activation du facteur de transcription AP-1

Le facteur de transcription AP-1 est formé par la dimérisation entre les membres de la famille Jun et Fos (Angel and Karin, 1991). Ces éléments trans-activateurs interagissent avec le site de liaison AP-1 présent dans différents gènes pour médier des réponses cellulaires, suite aux divers stimuli (Karin, 1995). Dans les cellules endothéliales, l'activité du facteur de transcription AP-1 peut être induite par différents facteurs, tels que le VEGF, les LDL, les cytokines pro-inflammatoires, les anti-oxydants, l'hypoxie, ... (Bandyopadhyay *et al.*, 1995; Dixit *et al.*, 1989; Munoz *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998).

De plus, Wang et ses collègues (1999) ont démontré que le facteur de transcription AP-1 régulait directement l'expression de gènes encodant la molécule d'adhérence ICAM-1 et le MCP-1 dans les cellules endothéliales humaines.

Afin de vérifier que le LPA induit bien une activation du facteur de transcription AP-1, nous avons effectué un test colorimétrique en plaque multi-puits, mis au point au laboratoire. Le but de ce test est de détecter l'activité de liaison du facteur de transcription AP-1 à l'ADN.

2.3.1. Effets au cours du temps du LPA sur l'activation de AP-1

Afin de mettre en évidence les effets du LPA sur l'activation d'AP-1, nous avons tout d'abord réalisé une cinétique allant de 30 à 120 minutes.

Au cours de cette expérience, les cellules EAhy926 sont d'abord mises au repos 1 heure dans du milieu stock + BSA 0,1%. Ensuite, les cellules sont stimulées avec du LPA 25 μ M durant 30, 60 ou 120 minutes. Le LPA est directement ajouté dans le milieu de repos afin d'éviter un stress aux cellules. Un contrôle négatif (correspondant au milieu stock + BSA 0,1%) a également été réalisé pour chaque temps. Un contrôle positif (PMA 0,1 μ g/ml + ionomycine 1 μ M) a également été prévu. Lors du test colorimétrique proprement dit, toutes les conditions ont été réalisées en triple.

Les résultats obtenus sont illustrés à la figure III. 5. Comme le contrôle positif induit une activation du facteur de transcription AP-1 de 3353 %, il n'a pas été représenté afin de mieux visualiser les effets du LPA sur le graphe. Premièrement, on constate que pour les cellules contrôles, l'activation d'AP-1 reste faible et stable au cours du temps. Deuxièmement, pour les cellules activées avec le LPA, on voit une activation d'AP-1 déjà après 30 minutes. Elle semble plus importante encore à 60 minutes et diminue après 120 minutes. Lorsqu'on exprime les résultats en pourcentage par rapport au contrôle, on obtient 588 %, 600% et 500% après respectivement 30, 60 et 120 minutes (Figure III.5B). Nous observons donc bien un net effet activateur du LPA, même si le LPA n'atteint pas les niveaux d'activation obtenus avec le PMA + ionomycine, conditions drastiques et relativement artificielles. L'ionomycine est un ionophore.

Pour les tests colorimétriques suivants, nous nous sommes donc concentrés sur le temps de stimulation de 60 minutes.

2.3.2. Effets de différents inhibiteurs de voies de signalisation sur l'activation d'AP-1 induite par le LPA

Afin de vérifier quelle(s) kinase(s) étai(en)t activée(s) en amont d'AP-1 suite à une stimulation au LPA, nous avons testé des inhibiteurs de trois MAPK : deux inhibiteurs des MEK1/2 inhibant la voie des MAPK ERK 1/2 (PD 98059 et U0126, celui-ci étant plus spécifique), un inhibiteur de la voie p38 (SB203580), et un de la voie des JNK (SP600125). Nous avons utilisé les concentrations généralement décrites dans la littérature.

2.3.2.1. Résultats

Au cours de cette expérience, les cellules, lors de la mise au repos, sont d'abord pré-incubées une heure dans du milieu stock + BSA 0,1% contenant l'un des inhibiteurs à une concentration de 20 μ M. Les cellules sont ensuite stimulées une heure avec du LPA 25 μ M, dilué directement dans le milieu de repos. D'autre part, nous avons également testé l'effet du LPA seul avec un contrôle négatif correspondant, comme expliqué au point 2.3.1. Enfin, les inhibiteurs seuls ont aussi été testés pour vérifier qu'ils n'ont pas d'effets à eux seuls.

Les résultats obtenus suite à l'utilisation d'un test colorimétrique en plaque multi-puits sont illustrés aux figures III. 6 et III. 7. La première figure représente l'activation d'AP-1 exprimée en absorbance à 450 nm. La deuxième reprend ces résultats exprimés en fonction du pourcentage d'inhibition des différents inhibiteurs utilisés dans cette même expérience.

Nous observons à nouveau une très belle activation d'AP-1 suite à une stimulation au LPA 25 μ M de 1 heure. Nous pouvons également remarquer que les inhibiteurs seuls n'ont aucun effet, puisque l'activation d'AP-1 est comparable à celle observée pour le contrôle négatif.

Une inhibition de l'activation d'AP-1 est mise en évidence pour tous les inhibiteurs testés dans cette expérience. Cependant, l'inhibition est moins marquée pour la voie des JNK et la voie des p38. En effet, comme le montre la figure III. 7, nous constatons une inhibition proche de 80% en ce qui concerne les deux inhibiteurs des MEK 1/2, de plus ou moins 30% pour l'inhibiteur de la voie des p38 et d'environ 40% pour l'inhibiteur de la voie des JNK.

Afin de mieux comprendre les voies de transduction du signal activées par le LPA, nous avons testé d'autres inhibiteurs : un de la PKC (Calphostine C, 2 μ M), un de la PKA (H89, 20 μ M), et un de la PI₃K (Wortmanine, 10 μ M). Dans cette expérience, nous avons

également utilisé la toxine pertussique (PTX, 50 ng/ml), une molécule interférant avec les protéines $G_{i/o}$.

D'un point de vue pratique, les cellules, lors de la mise au repos, sont d'abord pré-incubées une heure dans du milieu stock + BSA 0,1% contenant l'un des inhibiteurs. Ensuite, elles sont stimulées ou non au LPA 25 μ M. D'autre part, un contrôle négatif et une stimulation au LPA seul sont toujours réalisés.

Les résultats de cette expérience sont présentés à la figure III. 8. Les inhibiteurs seuls ne présentent pas d'activation d'AP-1. Comme nous pouvons le constater, la PTX inhibe l'activation d'AP-1 induite par le LPA. Nous n'observons pas d'inhibition d'AP-1 en présence d'un inhibiteur de la PKA (H89). Par contre, de manière surprenante, nous remarquons une activation renforcée du facteur de transcription AP-1 pour des cellules pré-incubées avec des inhibiteurs de la PI_3K et de la PKC. Cet effet est particulièrement marqué avec la Calphostine C (Cc).

Pour confirmer ces résultats, nous avons à nouveau effectué un test colorimétrique sur le facteur de transcription AP-1 en utilisant d'autres inhibiteurs de la PKC et de la PI_3K : la Calphostine C et le Gö6976 (inhibiteurs de la PKC, 300 nM), la Wortmanine et le LY294002 (inhibiteurs de la PI_3K , 50 μ M).

Dans cette expérience, contrairement aux précédentes, les cellules sont pré-incubées avec la moitié de la concentration des inhibiteurs pendant la mise au repos des cellules. Lors de la stimulation au LPA, les inhibiteurs sont rajoutés pour atteindre la même concentration finale que dans les expériences précédentes.

La figure III. 9 reprend les résultats obtenus. De manière étonnante, nous n'observons plus qu'une faible activation du facteur de transcription AP-1 suite à une stimulation au LPA. Par contre, ils mettent en évidence une stimulation du facteur de transcription AP-1 lorsque les cellules sont incubées en présence de Calphostine C 2 μ M (inhibiteur de la PKC) + LPA 25 μ M.

2.3.2.2. Discussion

Le premier dosage d'AP-1 a été réalisé après des temps d'incubation de 30, 60 et 120 minutes en présence de LPA à une concentration de 25 μ M. Le test a révélé que l'activation maximale du facteur de transcription AP-1 était obtenue après un temps d'incubation de 60 minutes et atteint jusqu'à 600 %.

Afin de voir quelles voies de signalisation sont activées par le LPA en amont d'AP-1, un deuxième test colorimétrique a été réalisé en utilisant différents inhibiteurs, à savoir : le PD 98059 (MEK 1/2), le U0126 (MEK 1/2), le SB203580 ($P38^{MAPK}$) et le SP600125 (JNK). Les résultats de cette expérience démontrent une diminution de l'activation d'AP-1 en présence d'inhibiteurs de la voie des MEK 1/2 (80%), de la voie des p38 (30%) et de la voie des JNK (40%). Ceci montre bien l'implication des trois voies de signalisation, et particulièrement de la voie des MEK1/2, lors d'une stimulation des cellules endothéliales EAhy926 avec le LPA.

D'autres inhibiteurs ont également été testés : la toxine pertussique (interférant avec les protéines $G_{i/o}$), la Wortmanine (PI_3K), le H89 (PKA) et la Calphostine C (PKC). Les résultats, suite au test colorimétrique sur le facteur de transcription AP-1, ont mis en évidence une inhibition pour la toxine pertussique. Ceci signifie que l'activation d'AP-1 suite à une

stimulation au LPA implique l'activation d'un récepteur couplé aux protéines $G_{i/o}$. On sait d'après la littérature, que les trois récepteurs LPA_1 , LPA_2 et LPA_3 peuvent être couplés à la protéine $G_{i/o}$ (Anliker and Chun, 2004) et les résultats de L. Bette (2004) ont montré que les cellules EAhy926 exprimaient ces trois récepteurs. Nous n'avons pas vérifié si dans ce modèle de cellules, ces trois récepteurs sont effectivement couplés à la protéine $G_{i/o}$. Par contre, nous observons une augmentation de l'activation d'AP-1, suite à une stimulation par le LPA 25 μ M, en présence d'inhibiteurs de la PI_3K (Wortmaninne) et de la PKC (Calphostine C).

Afin de confirmer ces derniers résultats, plusieurs tests colorimétriques ont été effectués dans les mêmes conditions. Malheureusement, pour chacun d'eux, nous n'avons obtenu qu'une activation faible d'AP-1 par le LPA seul. Plusieurs hypothèses pour expliquer cette faible activation ont été proposées et testées, pour essayer de résoudre le problème, mais elles se sont avérées infructueuses (nouveau stock de LPA, densité cellulaire, nouvelle cinétique, ...). Afin de surmonter ce problème, il serait intéressant de réaliser un western blot sur phospho c-Jun et c-Fos afin de vérifier si le LPA induit ou pas l'expression des gènes encodant ces deux protéines régulées par AP-1.

Cependant, nous observons à chaque fois une augmentation de l'activation d'AP-1 pour des cellules pré-incubées avec la Calphostine C et stimulées une heure au LPA 25 μ M. Cette observation est troublante, mais n'est pas incompatible avec la complexité de la signalisation liée au LPA, étant donné les différents types de récepteurs (LPA_1 , LPA_2 et LPA_3) et les différentes protéines G et effecteurs associés. Pour c-Jun, en particulier, il est bien connu qu'il existe des phosphorylations inhibitrices, catalysées entre autres par la GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase) et par la caséine kinase II (pour une revue, voir Woodgett, 1996). Par contre, lorsque c-Jun est phosphorylé par Rsk-1, une kinase activée par la cascade ERK 1/2, il s'agit d'une phosphorylation permettant la liaison de c-Jun à sa séquence cible. On peut donc concevoir qu'en inhibant une kinase inhibitrice, on puisse augmenter les effets de la kinase activatrice.

Comme nous avons montré que le LPA stimulait un facteur de transcription (AP-1), nous avons voulu comprendre les mécanismes qui se passent en amont. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la voie des MAPK, et plus particulièrement celle de ERK 1/2. En effet, de nombreux auteurs ont mis en évidence une augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 suite à une stimulation au LPA (Cook and McCormick, 1996; McLees *et al.*, 1995). Nos résultats montrent également que ce sont les inhibiteurs de la voie ERK1/2 qui étaient les plus efficaces pour inhiber l'activation d'AP-1 induite par le LPA. Nous avons donc voulu vérifier l'activation de ERK1/2. Celle-ci peut être mesurée grâce à un « kinase-assay ». Mais c'est une approche lourde, qui nécessite une étape délicate d'immuno-précipitation. Nous avons préféré une approche plus simple via un immuno-blot des formes phosphorylées, puisqu'il est bien connu que l'activation des MAPK, passe par leur phosphorylation préalable par les MAPKK : MEK1/2 pour les ERK1/2.

2.4. Effets du LPA sur la phosphorylation de ERK 1/2

Les ERK sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans différentes voies cellulaires, telles que le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. ERK 1 est activée par phosphorylation sur les résidus Thr 202 et Tyr 204 par les MEK1/2, et ERK 2 est phosphorylée au niveau des résidus Thr 185 et Tyr 187. Les ERK 1/2 phosphorylées sont alors transloquées dans le noyau où elles peuvent phosphoryler différents facteurs de

transcription dont c-Fos, Elk-1, SRF, c-Myc. Cette voie peut être activée par des facteurs de croissance présents dans le sérum, dont le LPA (Gonzalez *et al.*, 1993).

2.4.1. Résultats

Afin de vérifier si le LPA induit bien une phosphorylation des ERK 1/2 dans le modèle cellulaire utilisé, nous avons analysé par *western blot* l'état de phosphorylation des ERK 1/2 après une stimulation au LPA 25 μ M sur les cellules endothéliales EAhy926. Pour cette expérience, une cinétique de 5, 15, 30, 60, 90 et 120 minutes a été réalisée (Figures III.10-12). Pour chaque temps, un contrôle négatif correspondant à du milieu stock + BSA 0,1% a été testé. Pratiquement, les cellules endothéliales sont d'abord mises une heure au repos dans du milieu stock + BSA 0,1%. Ensuite, elles sont stimulées avec du LPA 25 μ M. Celui-ci est directement ajouté dans le milieu de repos afin d'éviter un stress aux cellules.

De plus, deux inhibiteurs des MEK 1/2, le U0126 à 20 μ M et le PD98059 à 20 μ M, ont également été testés à 5 minutes, le premier étant plus spécifique que le second. Dans ce cas, les cellules sont pré-incubées une heure avec du milieu stock + BSA 0,1% contenant soit du PD98059, soit du U0126 à une concentration de 20 μ M. Ensuite, les cellules sont stimulées 5 minutes avec du LPA 25 μ M (Figure III.13).

Dans une autre expérience, nous avons également testé la toxine pertussique, un inhibiteur des sous-unités β des protéines $G_{i/o}$. Les cellules sont incubées avec celle-ci toute la nuit à une concentration de 5 ng/ml. Le lendemain, les cellules sont stimulées (ou non) 5 minutes avec du LPA 25 μ M (Figure III.14).

Au terme de ces stimulations et suite à une extraction totale, le *western blot* proprement dit a été réalisé. Pour mettre en évidence la forme phosphorylée de ERK 1/2, nous avons utilisé un anticorps primaire polyclonal (IgG) de lapin anti-phospho ERK1/2 MAP Kinase et, pour la forme totale, des anticorps primaires monoclonaux anti-ERK-1 et anti-ERK-2 ont été employés.

Des anticorps anti- β -tubuline ont également été utilisés comme contrôle de charge. En effet, l'expression de l' β -tubuline reste inchangée quelles que soient les conditions utilisées.

Les résultats de la cinétique réalisée sont présentés à la figure III.10. Une étude densitométrique nous a permis de quantifier les résultats. En rapportant chaque valeur à son contrôle de charge correspondant (l' β -tubuline), nous obtenons les résultats exprimés à la figure III.11 pour la forme phosphorylée de ERK-1 et à la figure III. 12 pour la forme phosphorylée de ERK-2.

Comme le montre la figure III. 10, l'abondance de la forme phosphorylée de ERK-1, suite à une stimulation au LPA 25 μ M, est la plus élevée à 5 minutes. Ensuite, ce niveau diminue progressivement au cours du temps, avec une ré-augmentation à 60 et à 120 minutes. Des résultats similaires sont observés pour la forme phosphorylée de ERK-2.

La stimulation de la phosphorylation de ERK 1/2 induite par le LPA est donc caractérisée par un pic d'activation maximale à 5 minutes, suivi de plusieurs « vagues » de phosphorylation. Ces résultats ont été reproduits à plusieurs reprises (non montré).

Nous avons ensuite testé les deux inhibiteurs de la voie des ERK1/2 : U0126 et PD98059. Les résultats obtenus par *western blot* avec ces inhibiteurs sont illustrés à la figure III. 13. En comparant la condition stimulée au LPA avec les inhibiteurs de MEK1/2, nous remarquons

bien une inhibition de la phosphorylation des ERK1/2. En ce qui concerne la toxine pertussique, les résultats sont présentés à la figure III. 14. Nous pouvons observer une inhibition de la phosphorylation de ERK 1/2, ce qui implique que les effets du LPA passe bien par l'activation de protéines $G_{i/o}$. Les bandes étant trop faibles, les résultats n'ont pu être quantifiés.

2.4.2. Discussion

Une cinétique de temps de 5 à 120 minutes a été réalisée sur des cellules endothéliales stimulées ou non au LPA 25 μ M afin de vérifier l'état de phosphorylation des ERK 1/2 par western blot. Nos résultats ont mis en évidence que la stimulation des ERK 1/2 induite par le LPA présente une première vague de phosphorylation très rapide, très prononcée à 5 minutes et puis une succession de plusieurs vagues avec des pics à 60 et 120 minutes. Des temps plus longs n'ont pas été testés.

En ce qui concerne les inhibiteurs, nous obtenons une inhibition de la phosphorylation des ERK 1/2 suite à la pré-incubation avec deux inhibiteurs des MEK 1/2 (PD98059 et U0126), ce qui confirme bien l'implication des MEK 1/2 dans la phosphorylation des ERK 1/2.

Tous ces résultats peuvent être comparés aux données de la littérature. En effet, certains auteurs ont montré une activation transitoire de la phosphorylation des ERK 1/2 suite à une stimulation au LPA. Par exemple, Budnik *et al.* (2003), sur des cellules ovariennes de thèque, ont réalisé des stimulations en présence de LPA 5 μ M sur l'échelle de temps suivante : 0, 1, 5, 15 et 30 minutes. Leurs résultats indiquent que la stimulation des ERK 1/2 induite par le LPA augmente graduellement de une à cinq minutes pour atteindre son pic maximal. Ensuite, la forme phosphorylée diminue.

Murph *et al.* (2003) se sont intéressés à la cinétique de l'activation des ERK 1/2 induite par le LPA 10 μ M sur des cellules épithéliales HeLa. Leur cinétique s'étend de 0 à 30 minutes. Ils ont aussi montré une augmentation rapide de la phosphorylation des ERK 1/2 avec un pic ne se situant pas à 5 minutes, mais entre 10 et 30 minutes. Ils mettent en évidence que le LPA induit une activation rapide mais transitoire des MAPK.

Ces résultats coïncident en partie avec les nôtres car, nous obtenons également un pic maximal à 5 minutes mais, dans notre cas, l'activation se prolonge par plusieurs vagues successives.

D'autres auteurs présentent, par contre, une activation soutenue de la phosphorylation des ERK 1/2 suite à une stimulation au LPA.

En effet, une étude réalisée selon McLees *et al.* (1995) sur les cellules endothéliales EAhy926, montre que le LPA stimule la phosphorylation de ERK 1/2. Celle-ci est maximale après une incubation de 5 minutes avec du LPA. Il montre également que la réponse est présente jusqu'à 120 minutes.

Cook et ses collègues (1996) ont démontré que le LPA à des doses mitogéniques (100 μ M) provoquait une activation **soutenue** de ERK-1 allant de 5 minutes à 7 heures, avec un pic d'activation maximale à 10 minutes. Cette réponse permet d'induire une synthèse d'ADN. Par contre, le LPA à des doses non-mitogéniques (1 μ M) provoque une réponse monophasique et **transitoire**, ne dépassant pas les 30 minutes. Ce temps court ne permet donc pas d'induire une synthèse d'ADN. Ils ont également montré que le Ca^{++} et la PKC n'intervenaient que dans la première partie de la réponse au LPA. La phase soutenue est en très grande partie sensible à la toxine pertussique.

Dans notre cas, nous retrouvons une activation jusqu'à 120 minutes. Il faudrait, par la suite, tester des temps beaucoup plus longs, allant jusqu'à 8 heures de stimulation au LPA afin de vérifier si ces vagues d'activation perdurent au cours du temps.

En ce qui concerne les inhibiteurs, Panetti *et al.* (2000), signalent également qu'un traitement avec la toxine pertussique (5 ng/ml) ou avec l'inhibiteur PD98059 (25 μ mol/L) provoque une forte diminution de l'activation des ERK 1/2, suite à une stimulation du LPA. Cette expérience a été réalisée sur des cellules FBHE (Fœtal Bovine Heart Endothelial), stimulées 5 minutes au LPA 1 μ M. Ces résultats supposent que l'activation du LPA passe bien par la protéine G_{i/o}, ce qui concorde bien avec nos résultats.

On voit donc que si les effets activateurs du LPA sur l'activation de ERK1/2 sont décrits par de nombreux auteurs, les cinétiques divergent beaucoup plus, probablement en fonction des modèles cellulaires et des conditions expérimentales utilisées. Ces divergences ne sont pas à négliger étant donné qu'on sait que la réponse cellulaire peut être influencée par la cinétique d'activation, comme illustré par Cook *et al.* (1996).

Au terme de ces résultats à *a priori*, nous pouvons conclure que le LPA active bien les cellules EAhy926. En effet, cette molécule s'est révélée induire une augmentation de la sécrétion de la chémokine MCP-1, de l'activation du facteur de transcription AP-1 et de la phosphorylation des ERK 1/2 au niveau de la voie des MAPK. Ainsi, ayant choisi un temps de stimulation (6 heures) et la concentration en LPA (25 μ M) induisant une activation des cellules endothéliales EAhy926, nous pouvons entamer la deuxième partie de ce mémoire, à savoir, une étude des effets du LPA sur l'expression différentielle au niveau protéinique par l'approche des gels 2D.

3. Effets du LPA sur l'expression génique des cellules endothéliales EAhy926 : approche protéomique par les gels 2D

Comme nous venons de le mettre en évidence, le LPA induit une activation des cellules endothéliales. Ce dernier pourrait donc également modifier l'expression des protéines au niveau de la cellule. C'est la raison pour laquelle nous allons étudier les effets du LPA sur l'expression génique au niveau des protéines, à l'aide de gels 2D. Le principe de cette technique consiste en une séparation des protéines selon leur point isoélectrique pour la première dimension et selon leur poids moléculaire pour la deuxième dimension. Cette technique, sans *a priori*, a pour but de détecter des variations d'expression de protéines, telles que des augmentations ou des diminutions, voire même peut-être, l'apparition de protéines absentes chez les cellules non traitées. Elle va donc nous permettre de comparer deux conditions différentes qui sont dans notre cas : une condition « contrôle », correspondant à des cellules incubées pendant 6 heures en présence de milieu stock + BSA 0,1%, et une condition « LPA », correspondant à des cellules stimulées 6 heures avec du LPA 25 μ M, en espérant mettre en évidence des différences entre ces deux conditions. Pour ce faire, nous avons opté pour des gels 2D en fluorescence, par l'approche DIGE (Differential In Gel Electrophoresis). En effet, cette technique présente de nombreux avantages. Elle est très sensible, quantitative, rapide, reproductible, De plus, et contrairement aux autres colorations classiques (Bleu de Coomassie, coloration à l'argent, ...), la présence d'un standard interne permet d'éliminer les

variations dans un même gel et d'un gel à l'autre, ce qui représente un avantage majeur. Ceci permet également de limiter le nombre de gels à réaliser. En outre, grâce à une normalisation des différents gels par rapport à un standard interne, dit de référence, une variation d'expression protéique d'une condition à l'autre de 10% est fiable à 95%.

Dans une étape préliminaire, certaines mises au point ont d'abord été réalisées par C. Gustin dans le cadre de sa thèse. Suite à cela, nous avons donc décidé de travailler sur des gels de première dimension de 18 cm, sur une gamme linéaire de pH 4-7 afin de cibler une zone couvrant la majorité des protéines.

Rappelons brièvement la première expérience effectuée par C. Gustin. Pour ce faire, elle a réalisé trois cultures cellulaires indépendantes. Arrivées à confluence, les cellules sont d'abord mises une heure au repos dans du milieu stock + BSA 0,1%. Ensuite, elles sont stimulées ou non avec du LPA 25 μ M pour une durée de six heures. Il en résulte trois conditions « contrôles » et trois conditions « LPA », provenant donc de trois stimulations et extractions indépendantes. Après extraction totale des protéines et préparation des échantillons (voir Matériels et Méthodes 3.2.2.1 et 3.2.2.2), trois gels de 18 cm, avec une zone de pH 4-7 ont été coulés. Pour chaque gel, 50 μ g de standard interne, 50 μ g d'une condition « contrôle » et 50 μ g d'une condition « LPA » sont chargés (voir tableau III. 1). Le standard interne correspond à une quantité égale des différentes conditions « contrôles » et des différentes conditions « LPA » réalisées au cours de l'expérience. Dans ce cas, il est donc constitué de 8,3 μ g de chaque condition « contrôle » et de chaque condition « LPA » (= 50 μ g/ 6 conditions).

Dans cette expérience, les standards internes sont marqués avec le fluorochrome Cydye 2, les conditions contrôle et LPA étant marquées chacune une fois avec le Cydye 3 et une fois avec le Cydye 5. Ainsi, comme montré dans le tableau III.1, dans les gels 1 et 3, la condition contrôle est marquée en Cydye 3, alors que dans le gel 2, elle est marquée en Cydye 5. Cette inversion de fluorochromes permet de mettre en avant d'éventuelles différences de marquage entre le Cydye 3 et le Cydye 5.

L'analyse des gels a été réalisée en Allemagne (Freiburg), en collaboration avec la firme Amersham. En effet, l'analyse des gels DIGE requiert un appareillage coûteux, le Typhoon (Amersham) qui n'est pas encore disponible en URBC. Un des trois gels « LPA » n'a malheureusement pas pu être pris en compte, les cellules n'ayant pas réagi au LPA (gel similaire par rapport au gel contrôle). L'analyse bio-informatique (via le logiciel DyCyder) a mis en évidence 17 variations d'expression entre les conditions « contrôle » et « LPA », chacune présentant un test de Student avec un p inférieur à 0,05 (Figure III.15 et tableau III.2). Parmi ces 17 variations, 15 correspondent à des diminutions d'expression protéique avec des ratios allant de - 4,24 à - 1,31.

Afin d'identifier les protéines de ces spots par spectrométrie de masse, ces 17 spots ont été prélevés à l'aide d'un Spot Picker. Il n'a malheureusement pas été possible de les analyser, la quantité de matériel étant trop faible. Seul un spot a pu être identifié grâce au spectromètre de masse de type MALDI-TOF, par l'équipe de spectrométrie de masse de l'URBC ; il s'agit de la vimentine (Figure III. 16). Ce spot (spot 16) diminue de 3,25 fois par rapport au contrôle, avec un test de Student $p = 0,016$. Rappelons que la vimentine est un constituant des filaments intermédiaires.

En résumé, cette expérience a mis en évidence 15 spots dont l'expression protéique diminuait dans la condition « LPA » par rapport à la condition « contrôle ». Seul, deux augmentations

ont été observées (x 1.3). Parmi ces 17 variations, un seul spot présentant un ratio de $-3,25$, a pu être identifié par spectrométrie de masse. Il s'agit de la vimentine.

Sur base de ces résultats, et à ce stade du mémoire, le premier objectif pour cette approche protéomique a tout d'abord été de se familiariser avec la technique des gels 2D, tout en espérant retrouver les variations obtenues par C. Gustin et de pouvoir identifier par spectrométrie de masse les protéines correspondantes.

3.1. Gels 2D colorés à l'argent (approche conventionnelle)

Afin de reproduire les résultats de la première expérience, nous avons fait le choix d'une coloration à l'argent compatible avec la spectrométrie de masse. La raison de ce choix de coloration est double. Premièrement, elle nous permettra d'affiner quelques points techniques tout en se familiarisant avec cette procédure. Deuxièmement, en comparant le pattern obtenu avec celui de la coloration en fluorescence, elle nous permettra éventuellement de confirmer les variations d'expression obtenues par C. Gustin et d'identifier par spectrométrie de masse les protéines correspondant à ces spots.

D'un point de vue pratique, pour réaliser ces gels 2D, nous avons repris les mêmes extraits protéiques que ceux utilisés par C. Gustin lors de la première expérience. Nous avons également utilisé des gels de 18 cm, avec une zone de pH allant de 4 à 7. Six gels ont été réalisés : trois conditions « contrôles » (Figure III.17) et trois conditions « LPA » (Figure III.18). Ceux-ci ont ensuite été traités pour une coloration à l'argent, compatible avec la spectrométrie de masse.

Lors de la comparaison des profils protéiques, une condition « contrôle » et une condition « LPA » ont été écartées par manque de variations d'expression protéique entre les deux, comme déjà mentionné dans l'expérience précédente.

Les résultats de cette comparaison n'ont révélé malheureusement que deux spots communs avec l'étude en fluorescence. Il s'agit des spots n°1 et n°4, comme montré aux figures III.19, III.20 et III.21. Nous avons également trouvé deux nouveaux spots, absents au niveau des conditions « contrôles » et présents dans les conditions « LPA ». Au niveau des figures III.19 et III.22, ils correspondent aux spots n°2 et n°3. Notons que, de manière surprenante, ces derniers n'avaient pas été observés au niveau des gels en fluorescence.

Ces quatre spots ont été découpés en salle blanche par C. Gustin pour trypsinisation afin de permettre leur identification par spectrométrie de masse. Ensuite, l'équipe de spectrométrie de masse de l'URBC a analysé avec le spectromètre de masse de type MALDI-TOF les patterns de peptides obtenus pour chaque spot. La comparaison de la masse des peptides obtenue après digestion tryptique des protéines avec les masses théoriques de ces peptides prévues dans les banques de données, a confirmé la présence de la vimentine au niveau du spot n°1 (Figure III.19 et III.20), spot commun à celui trouvé dans la première expérience en DIGE. En ce qui concerne les spots n°2 et n°3 (Figure III.19 et III.22), il s'agit de l'actine. Il s'agit fort probablement d'un artefact : il y a peut-être des nouvelles protéines induites par le LPA, mais elles sont clairement contaminées par de l'actine. En effet, comme illustré à la figure III.19, on voit que les spots 2 et 3 sont parfaitement alignés point de vue PI par rapport à l'actine. Une contamination par l'actine n'est donc pas à exclure. Nous n'avons pas d'explication pour justifier pourquoi cet artefact est observé pour les cellules traitées au LPA, et pas pour les cellules contrôles. Une autre interprétation serait celle des formes modifiées de l'actine. Pour le spot n°4 (Figure III.19 et III.23), il semble correspondre à une protéine anti-oxydante, la peroxirédoxine 3, mais ce résultat doit être confirmé. Il serait donc

intéressant, à ce stade, de refaire des gels en chargeant plus de protéines afin de s'assurer de l'identification par spectrométrie de masse du spot n°4.

En conclusion, cette première approche par les gels 2D a abouti à 6 gels colorés à l'argent, sans aucun problème technique (pas de bruit de fond, pas de traînées, ...). De plus, après analyse des gels et identification par spectrométrie de masse, deux spots intéressants ont été retrouvés, communs à l'étude en fluorescence. Ils ont été identifiés comme étant la vimentine et la peroxirédoxine 3. Ce dernier point reste toutefois à confirmer. Il est surprenant de constater que les gels colorés à l'argent n'ont pas permis de reproduire les résultats obtenus en DIGE. Mais, il est important de noter qu'il n'y a pas eu d'analyse approfondie des gels 2D colorés à l'argent au niveau du programme « Image Master 4.01 ». Une zone d'intérêt a été sélectionnée, zone représentant le plus de variations lors de la première expérience en DIGE. Au niveau de cette sélection, seuls deux spots ont été retrouvés. Ceci pourrait s'expliquer par une différence dans l'intensité de coloration des gels, le gel contrôle (Figure III.17) étant clairement moins coloré que le gel « LPA » (Figure III.18). Cette hétérogénéité ne favorise pas la mise en évidence de diminutions d'expression pour le gel « LPA ». Il faut savoir que la coloration à l'argent est très sensible, ce qui peut entraîner des différences de gel à gel, d'où encore une fois l'avantage majeur des gels DIGE, où les échantillons « contrôle » et « LPA » sont déposés sur le même gel.

La technique de gels 2D étant ainsi bien maîtrisée, nous avons voulu dans un deuxième temps, exploiter les gels 2D marqués en fluorescence, par l'approche DIGE. Les gels ont été réalisés en URBC, mais nous les avons analysés dans le laboratoire du Professeur P. Leprince (Université de Liège) qui dispose déjà d'un Typhoon.

Le but était, dans ce cas, de réaliser une analyse approfondie sur des cellules endothéliales EAhy926 stimulées ou non avec du LPA, pour un temps d'incubation de 6 heures.

3.2. Gels marqués en fluorescence (approche DIGE)

Cette expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que C. Gustin. A nouveau, trois cultures cellulaires indépendantes ont été réalisées. Pour chaque culture, les cellules ont d'abord été mises une heure au repos dans du milieu stock + BSA 0,1%. Ensuite, elles ont été stimulées ou non au LPA 25 μ M, pour une durée de 6 heures. Après extraction totale des protéines et préparation des échantillons (voir Matériels et Méthodes 3.2.2.1 et 3.2.2.2), trois gels ont été effectués sur une gamme de pH 4-7 (18 cm).

La répartition des échantillons est la même que celle réalisée lors de la première expérience (voir début du point 3).

3.2.1. Résultats

Le scan et l'analyse bioinformatique des gels 2D ont été réalisés en collaboration avec le Professeur P. Leprince (Université de Liège). Lors de l'analyse des gels (via le logiciel DyCyder), une expérience n'a à nouveau pas été prise en compte, car elle ne présentait pas de variations significatives pour les cellules traitées au LPA contrairement aux deux autres.

Un gel représentatif correspondant à des cellules stimulées au LPA, est illustré à la figure III.23. On constate tout d'abord que l'« allure » générale du gel et le pattern d'expression protéinique, sont fort semblables par rapport à ceux obtenus dans la figure III.15 par C. Gustin.

Comme illustré à la figure III.24, l'analyse de ces gels, a révélé une variation d'expression pour 16 spots. Malheureusement, les tests de Student révèlent que ces variations sont peu significatives ($p > 0,05$) (Tableau III.3).

Si on compare les résultats de C. Gustin et les nôtres, 5 spots communs sont retrouvés. La figure III. 25 représente la zone agrandie contenant ces 5 spots. Le spot n°3 est divisé en 2 dans la première expérience et ne l'est pas dans la deuxième. Toutefois, une variation d'expression est quand même mise en évidence dans les deux cas. Au niveau du spot n°1, correspondant à la vimentine, les résultats sont comparables dans les deux expériences. En effet, dans la première, nous obtenions une diminution d'expression de -3,25 et dans la deuxième, elle atteint -2,29. Il en est de même pour le spot n°2 où une diminution d'expression de -2,16 est présente dans la première manipulation et de -1,93 dans la seconde. En ce qui concerne les trois autres spots protéiques, ils sont retrouvés dans les deux expériences, mais correspondant à des protéines peu abondantes, encore non identifiées.

3.2.2. Discussion

Afin d'étudier les effets du LPA sur les cellules endothéliales EAhy926, nous avons opté pour une approche protéomique à l'aide des gels 2D en espérant qu'elle nous permettra de mettre en évidence des différences d'expression protéique entre des cellules incubées ou non en présence de LPA, pour donner un nouvel éclairage permettant de mieux comprendre les mécanismes moléculaires d'action du LPA.

Pour ce faire, une première expérience a été réalisée par C. Gustin dans le cadre de sa thèse à l'aide des gels 2D en fluorescence. Au niveau des résultats, 17 variations d'expression au niveau protéique ont été mises en évidence et elles sont significatives comme confirmé par un test de Student (p inférieur à 0,05). Parmi ces 17 variations, 15 correspondent à des diminutions d'expression. Ces 17 spots ont été prélevés pour être analysés par spectrométrie de masse. Malheureusement, un seul spot a pu être identifié, il s'agit de la vimentine. L'expression de ce spot diminue de 3,25 fois par rapport au contrôle, avec un test de Student significatif (p inférieur à 0,016).

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons tout d'abord opté pour une coloration à l'argent afin de maîtriser au mieux la technique des gels bidimensionnels, technique qui requiert un certain savoir-faire.

Pratiquement, nous avons utilisé les mêmes extraits protéiques que ceux utilisés dans la première expérience. Après analyse des résultats, deux spots communs avec l'étude en fluorescence préliminaire ont été retrouvés. La spectrométrie de masse a permis d'identifier ces spots protéiques. Les résultats ont confirmé la présence de la **vimentine**. L'autre spot correspondrait à de la **peroxirédoxine 3**, mais cela reste une hypothèse à confirmer.

Si on compare nos résultats avec les données de la littérature, Bruneel *et al.* (2003) ont réalisé une approche protéomique sur des cellules endothéliales HUVEC. Travaillant sur des cellules quiescentes, ils ont identifié 53 protéines exprimées par ces cellules, à savoir des protéines du cytosquelette (actine, **vimentine**, tropomyosine et la tubuline), des protéines impliquées dans la mobilité cellulaire (cofiline, préfoldine), dans la régulation de l'apoptose et de la sénescence (protease inhibitor 9, heat shock protein, **thiorédoxine peroxidase**, ...). Cette dernière est une protéine anti-oxydante, proche de la peroxirédoxine 3.

La **vimentine** est un composant des filaments intermédiaires de type II/III, une famille du cytosquelette. Ce dernier est un réseau complexe de filaments protéiques qui permet à la cellule d'adopter diverses formes et d'effectuer des mouvements coordonnés et dirigés. Il se

réorganise continuellement lorsque la cellule change de forme, se divise ou répond à son environnement. Le cytosquelette est formé par trois types principaux de filaments protéiques : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires qui procurent une résistance mécanique à la cellule. Le poids moléculaire théorique de la vimentine est de 53.688 Da et son PI de 5.06. La masse correspond à celle observée sur notre gel (± 50 kDa) (Figure III.19). Par contre, le PI théorique est un peu plus élevé à celui observé sur notre gel ($\pm 4,8$). La vimentine se localise au niveau du cytoplasme. Elle peut être phosphorylée par une Rho-Kinase, pouvant elle-même être activée par le LPA. En effet, l'activation de la voie des Rho par le LPA dans l'induction de la migration cellulaire est connue depuis longtemps (Gohla *et al.*, 1998).

Deux groupes principaux de **peroxirédoxines** existent : une sous-famille possédant deux régions bien conservées, contenant chacune un résidu cystéine (PRDX1-4 ou 2 cys PRDX) et une autre sous-famille ne possédant qu'une région conservée (PRDX 6 ou 1 cys PRDX). La propriété catalytique des peroxirédoxines permet de réduire l' H_2O_2 et les hydroperoxydes alkyl en utilisant des équivalents réducteurs dérivés de molécules donneuses possédant un groupement thiol tel que le GSH (Chen *et al.*, 2000). Les peroxirédoxines exercent de nombreuses fonctions dans les processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération et la réponse immunitaire. De plus, elles sont capables de protéger la cellule contre les ROS (Reactive Oxygen Species), de réguler certains facteurs de transcription comme NF- κ B ou AP-1, ... Le pattern de distribution indique que les peroxirédoxines sont hautement exprimées dans les tissus et cellules à risque pour les maladies liées à des stress oxydatifs, comme l'athérosclérose. Par contre, à haute concentration, les peroxirédoxines forment des agrégats, ce qui peut entraver leurs fonctions physiologiques ou les rendre cytotoxiques (Butterfield *et al.*, 1999). La **peroxirédoxine 3** (PRDX3 ou AOP-1) fait partie de la famille des 2 Cys PRDX. Elle utilise le TXN et la cyclophiline A comme donneurs d'électrons pour réduire les peroxydes. En effet, la cyclophiline A se lie à la PRDX 3, ce qui active son activité anti-oxydante. Son poids moléculaire est de 27.699 Da et son PI est de 7.1. Le poids moléculaire théorique correspond à celui observé sur notre gel (± 30 kDa) (Figure III.19) ; de plus, le PI expérimental se situe à ± 6.5 . La peroxirédoxine 3 est exprimée au niveau des mitochondries. Notons que dans notre cas, nous observons une diminution de l'expression de cette protéine dans les cellules stimulées au LPA, ce qui correspond à un effet pro-oxydant, puisqu'il s'agit d'une protéine anti-oxydante.

Dans un deuxième temps, nous avons pu réaliser, au cours de ce mémoire, des gels 2D en fluorescence par la méthode DIGE afin de mettre en évidence des différences d'expression protéique entre des cellules incubées ou non avec du LPA 25 μ M et d'autre part, confirmer ainsi les résultats obtenus par C. Gustin lors de la première expérience.

Les résultats de cette manipulation ont mis en évidence une variation d'expression au niveau de 16 spots, dont 13 diminutions. Le pattern d'expression est comparable dans les deux expériences, à savoir principalement des diminutions d'expression protéique. Si on compare les deux expériences, nous retrouvons 5 spots communs.

Signalons que pour arriver à des résultats plus reproductibles, les conditions expérimentales pourraient encore être améliorées. En effet, nous avons constaté une forte stagnation des protéines à l'endroit de chargement. Ce problème pourrait être résolu en chargeant les protéines au niveau de l'étape de réhydratation des gels 1D. Elles pourraient, de cette manière, diffuser plus facilement. De plus, afin d'éliminer certains contaminants (ADN, chromatine), il faudrait, avant chargement, précipiter les extraits protéiques.

Au terme de ces expériences, de manière surprenante, peu de différences entre les conditions « contrôles » et les conditions « LPA » sont observées après 6 heures d'incubation. Les principales variations d'expression protéique correspondent majoritairement à des diminutions. Nous pouvons conclure que le LPA induit néanmoins un changement dans l'expression des protéines. Afin d'obtenir des variations protéiques plus importantes suite à une stimulation au LPA, il serait intéressant de stimuler les cellules pendant des temps plus longs, à savoir 18, 24 ou 48 heures. Si, dans ce cas, des spots protéiques s'avèrent intéressants, nous pourrions tenter de les identifier par spectrométrie de masse.

L'acide lysophosphatidique, un métabolite lipidique connu initialement comme facteur de croissance, semble jouer un rôle dans l'athérosclérose. En effet, comme l'ont montré Siess et ses collègues, le taux de LPA apparaît 13 fois plus élevé dans les lésions athérosclérotiques que dans un tissu artériel normal (Siess *et al.*, 1999). De plus, il a été mis en évidence comme puissant activateur de plaquettes favorisant de cette manière la formation d'un caillot sanguin. D'autre part, le LPA peut être produit lors de l'oxydation des LDL, lipoprotéines importantes intervenant dans le processus d'athérogenèse. Enfin, il peut également induire la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. Il semble donc que le LPA soit également une molécule athéro-thrombogénique. Toutefois, son mode d'action et les mécanismes moléculaires impliqués sont encore peu connus.

L'objectif de ce mémoire était d'étudier les effets du LPA sur des cellules endothéliales EAhy926 en culture, afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement endothélial pouvant mener au développement de l'athérogenèse.

Pour ce faire, une première série de tests à *a priori* a été réalisée afin de confirmer que le LPA induit bien une activation des cellules EAhy926. Dans un deuxième temps, ayant défini les conditions d'activation par le LPA, nous avons entamé une étude protéomique pour déceler les variations d'expression au niveau protéique pour des cellules EAhy926 stimulées ou non au LPA.

Dans la première partie de ce travail, nous avons réussi à mettre en évidence l'implication du LPA dans l'induction de phénomènes qui, *in vivo*, sont liés aux premières étapes de l'athérosclérose. La figure V.1 synthétise les principaux résultats obtenus.

En effet, nous avons tout d'abord mis en évidence, à l'aide d'un test ELISA, une augmentation de la sécrétion de MCP-1, une chémokine ayant un rôle important dans les processus menant à l'athérosclérose. Ensuite, nous nous sommes intéressés au facteur de transcription AP-1. En effet, dans le promoteur du gène codant pour le MCP-1, se trouve, entre autres, un site de reconnaissance pour le facteur de transcription AP-1. Suite à un test colorimétrique mettant en évidence l'activité de liaison d'AP-1 sur sa séquence consensus, nous avons montré que des cellules endothéliales incubées en présence de LPA montraient bien une augmentation de l'activité de liaison de ce facteur de transcription à sa séquence d'ADN.

Par la suite, nous avons voulu vérifier quelles voies de signalisation sont activées par le LPA en amont d'AP-1. Pour cela, nous avons testé des inhibiteurs des voies de MAPK, à l'aide du test colorimétrique pour AP-1. Cette expérience nous a permis de mettre en évidence l'implication majeure de la voie ERK1/2 et l'implication mineure des p38 et JNK. Si ERK1/2 sont connues pour jouer un rôle dans l'activation du facteur AP-1, ainsi que la JNK, dont l'un des substrats est c-Jun, composant bien connu d'AP-1, les données sur p38 sont moins nombreuses. Signalons cependant que Funakoshi *et al.* (2001) signalent le rôle de p38 dans l'activation d'AP-1, de cellules de glioblastome humain par l'IL-1.

Suite à ces résultats, d'autres inhibiteurs ont été testés afin de mieux comprendre les voies de transduction du signal activées par le LPA. Les résultats obtenus mettent en avant une inhibition de l'activation d'AP-1 suite à une pré-incubation avec la toxine pertussique, ce qui signifie que l'activation d'AP-1, suite à une stimulation au LPA, implique l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G_{i/o}. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature. Les cellules EAhy926 expriment les récepteurs LPA₁, LPA₂ et LPA₃ (Bette, 2004) et ces trois types de récepteurs peuvent être couplés aux protéines G_{i/o}. Par contre, de manière surprenante, nous avons observé une activation du facteur de transcription AP-1 pour des cellules incubées avec des inhibiteurs de la PI₃K et de la PKC, puis stimulées au LPA. Ces résultats sont étonnants, surtout pour les inhibiteurs de la PI₃K. En effet, la plupart des

auteurs décrivent des interactions entre la PI₃K et la voie ERK1/2 et l'activation des MAPK ERK1/2 ? pouvoir passer par l'activation de la PI₃K (Yart *et al.*, 2002). Nous n'avons pas vérifié par western blot si la phosphorylation des kinases ERK1/2 était toujours induite par le LPA en présence de wortmannine, dans le modèle des cellules EAhy926.

Mais pour expliquer que la wortmannine accentue les effets du LPA sur l'activation du facteur AP-1, nous proposons l'hypothèse suivante, basée sur les résultats obtenus par Jaspreet *et al.* (2001) sur des hépatocytes de rat. Ces auteurs observent que la wortmannine est toxique, induisant une réponse au stress, avec activation des MAPK, p38 et JNK et du facteur transcriptionnel AP-1. Il se pourrait donc que dans le modèle cellulaire des EAhy926, la wortmannine combinée au LPA, se révèle toxique, entraînant une réponse au stress, aboutissant à l'activation d'AP-1, qui vient s'ajouter à celle induite par le LPA. Nous ne savons pas si cette explication est également valable pour la calphostine C, mais Jaspreet *et al.* (2001) décrivent le même type de réponse pour la staurosporine, un autre inhibiteur de protéines kinases.

Enfin, les inhibiteurs de la voie ERK1/2 étant les plus efficaces pour inhiber l'activation d'AP-1 induite par le LPA, nous avons voulu étudier l'effet du LPA sur la phosphorylation des ERK1/2. La technique du western blot nous a permis de montrer que la stimulation de la phosphorylation des ERK1/2 induite par le LPA est caractérisée par un pic d'activation maximum à 5 minutes, suivi de plusieurs vagues successives de phosphorylation jusqu'à 120 minutes. Ces résultats concordent bien avec les données décrites dans la littérature (Mc Lees *et al.*, 1995 ; Cook *et al.*, 1996).

L'une des perspectives de ce travail sera de vérifier si d'autres facteurs transcriptionnels régulés par les kinases ERK1/2 sont aussi activés, par exemple les facteurs Elk-1 et c-Myc. Les tests colorimétriques pour mesurer l'activité de liaison de ces facteurs sont également disponibles au laboratoire.

Tous ces tests à priori nous ont donc permis de mettre au point un état d'activation des cellules endothéliales EAhy926 suite à une stimulation au LPA.

Nous avons alors entamé une étude sans a priori afin d'obtenir une vue plus globale du problème. Il s'agit de l'approche protéomique qui permet d'étudier des différences d'expression protéique entre des cellules contrôles et des cellules stimulées au LPA, et cela à l'aide des gels d'électrophorèse bidimensionnels. La technique des gels 2D est de plus en plus utilisée pour l'étude du protéome, lequel représente l'ensemble des protéines exprimées dans un contexte cellulaire (tissulaire, ...) particulier. Cette technique est complémentaire à d'autres approches étudiant l'expression au niveau des ARNm. Une approche transcriptionnelle par les damiers à haute densité est d'ailleurs en cours dans le cadre de la thèse de S. Dos Santos qui étudie les effets de molécules pro-athérogènes, mais sur les monocytes, un autre type cellulaire impliqué dans les étapes précoces de l'athérosclérose.

Au cours de ce mémoire, l'approche protéomique a pu être approfondie jusqu'aux techniques d'identification par spectrométrie de masse.

Au terme de ce travail, six grands gels colorés à l'argent ont été générés, ainsi que trois grands gels colorés en fluorescence. Le choix de la coloration à l'argent compatible avec la spectrométrie de masse (MS) avait deux buts. Tout d'abord de maîtriser au maximum l'aspect technique de cette approche, et ensuite, de retrouver d'éventuels spots identiques à ceux retrouvés par C. Gustin lors d'une première expérience préliminaire à ce mémoire.

En effet, rappelons qu'une expérience de mise au point a été réalisée par C. Gustin grâce à l'utilisation du DIGE. Il en est ressorti 17 variations d'expression au niveau protéique correspondant majoritairement à des diminutions d'expression (ratio allant de -4,25 à -1,31).

Seul un seul spot a pu être identifié par spectrométrie de masse comme étant la vimentine. Rappelons que la vimentine est un composant des filaments intermédiaires.

Ensuite, des gels 2D colorés à l'argent ont été effectués afin de retrouver les spots protéiques de la première expérience et d'autre part, dans l'espoir de pouvoir les identifier par MS. Ces gels 2D ont été réalisés avec les mêmes extraits protéiques utilisés lors de l'expérience de C. Gustin. Les résultats indiquent deux spots communs à l'étude en fluorescence. Par contre, deux nouveaux spots uniquement présents dans les conditions LPA ont également été mis en évidence. Ces quatre spots ont alors été prélevés et trypsinisés par C. Gustin en salle blanche afin de tenter de les identifier par MS, avec un du spectromètre de masse du type MALDI-TOF. La liste des poids moléculaires des peptides composant la protéine après digestion (trypsine) est comparée à une liste de poids moléculaire obtenue par digestion « théorique » de toutes les séquences protéiques présentes dans les banques de données (Programme Mascot : matrix science). Les résultats de cette analyse ont confirmé la présence de la vimentine. Les deux nouveaux spots correspondent à de l'actine. Comme discuté dans les résultats, il s'agit probablement d'un artéfact : il s'agit peut-être de nouvelles protéines induites par le LPA mais contaminées par de l'actine. Nous n'avons pas d'explication pour justifier pourquoi cet artéfact est présent dans les conditions « LPA » et absent dans les conditions « contrôle ». Une autre interprétation serait celle de formes modifiées de l'actine. Pour le dernier spot en commun pour les deux types de colorations, il semblerait correspondre à la peroxirédoxine 3, une protéine anti-oxydante, mais cela ne reste qu'une hypothèse. Il serait donc intéressant, à ce stade, de refaire des gels en chargeant plus de protéines afin de s'assurer de l'identification par spectrométrie de masse de ce spot protéique. La peroxirédoxine 3 est une protéine anti-oxydante. Les peroxirédoxines sont capables de protéger la cellule contre les ROS, **de réguler certains facteurs de transcription comme NF-kB, AP-1, ...** De plus, le pattern d'expression indique que les peroxirédoxines sont hautement exprimées dans les tissus ou cellules à risque pour les maladies liées à la toxicité des ROS, comme l'athérosclérose (Butterfield *et al.*, 1999). Si le LPA diminue l'abondance de cette protéine, ce qu'il faut confirmer, cela signifierait que ce lipide induit un stress oxydatif intracellulaire. Signalons à cet égard que Ceriello et Motz (2004) dans une revue récente, proposent que le stress oxydatif pourrait être un mécanisme pathogénique à la base non seulement du dysfonctionnement endothélial et des maladies cardiovasculaires, mais aussi du dysfonctionnement des cellules \square et donc de la résistance à l'insuline et du diabète.

Enfin, dans le but de réaliser, dans le cadre de ce mémoire, une étude beaucoup plus approfondie des effets du LPA sur l'expression au niveau protéique, nous avons réalisé trois grands gels colorés en fluorescence. Trois conditions contrôles et trois conditions LPA (correspondant à des cellules incubées pendant 6 heures avec du LPA 25 μ M) ont été réalisées de manière indépendantes. L'analyse bio-informatique grâce au programme DyCyder a révélé un profil d'expression protéinique fort semblable à celui obtenu lors de l'expérience de C. Gustin .

En effet, nous avons obtenu 16 variations d'expression protéique (ratio allant de - 2,45 à -1,57), dont 13 correspondent à des diminutions d'expression. Sur ces 16 spots, 5 sont communs à ceux obtenus par C. Gustin (Figure III.25) dont le spot identifié comme étant la vimentine. Par contre, nous ne retrouvons pas la peroxirédoxine 3, probablement supprimée par un test de Student peu fiable.

A ce stade du travail, il faudrait donc réaliser de nouveaux gels sur des cellules stimulées pendant des temps beaucoup plus longs, à savoir : 18 H, 24 H, 48 H... afin d'espérer observer des variations d'expression protéique beaucoup plus importantes.

En effet, il semblerait que 6 H d'incubation ne soit pas suffisants pour observer de fortes variations d'expression protéique.

Cependant, comme le suggèrent les résultats préliminaires obtenus avec la peroxirédoxine 3, des diminutions d'abondance peuvent être tout aussi perturbantes pour la cellule que des augmentations.

L'approche protéomique devrait donc nous permettre d'avoir une vision plus claire sur les effets du LPA sur les cellules endothéliales et de mieux discriminer les effets plutôt favorables – le LPA est un facteur de croissance bien décrit – et les effets moins favorables – le LPA est athéro-thrombogène et pourrait induire un dysfonctionnement endothélial.

(McIntyre et al., 2003)oooooooooooooooo(Siess, 2002)oooooooooooooooooooooooo (Siess et al., 1999)oooooooooooooooo(van Corven et al., 1992)oooooooooooooooo(Rizza et al., 1999)oooooooooooooooo(Wang et al., 1999)oooooooooooooooo(Budnik et al., 2003)oooooooooooo(Murph et al., 2003)oooooooo(Panetti et al., 2000)oooooooooooo (Bruneel et al., 2003) mmmm (Bruneel et al., 2003) m (Butterfield et al., 1999) mmmmm (Guttman et al., 2004) mmmm (Michiels, 2003)ooo (Norata et al., 2003) mmmmm (Rabilloud, 2002) pppppp (Woodgett, 1996) nnnn (Bourne, 1997)mmmm (Cristea et al., 2004) mmmm (Cristea et al., 2004) mmm (Graves and Haystead, 2002)nnnn (Cotran et al., 1999) mmmm (Voet and Voet, 1998)

- Angel, P. and Karin, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072, 129-157 (1991).
- Anliker, B. and Chun, J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* (2004).
- Aoki, J., Taira, A., Takanezawa, Y., Kishi, Y., Hama, K., Kishimoto, T., Mizuno, K., Saku, K., Taguchi, R. and Arai, H. Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem*, 277, 48737-48744 (2002).
- Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H. and Inoue, K. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure-activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett*, 478, 159-165 (2000).
- Bandyopadhyay, R.S., Phelan, M. and Faller, D.V. Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochim Biophys Acta*, 1264, 72-78 (1995).
- Barbier, O., Torra, I.P., Duguay, Y., Blanquart, C., Fruchart, J.C., Glineur, C. and Staels, B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 717-726 (2002).
- Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D. and Lusis, A.J. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91, 2488-2496 (1995).
- Bonnet, J. L'athérosclérose : un défi commun du biologiste et du clinicien. *médecine/sciences*, 17, 151-154 (2001).
- Bourne, H.R. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 134-142 (1997).
- Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., Vinh, J., Vaubourdolle, M. and Baudin, B. Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteomics*, 3, 714-723 (2003).
- Budnik, L.T. Lysophosphatidic acid, LPA: a bad boy becomes good. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 37 (2003).
- Budnik, L.T., Brunswig-Spickenheier, B. and Mukhopadhyay, A.K. Lysophosphatidic acid signals through mitogen-activated protein kinase-extracellular signal regulated kinase in ovarian theca cells expressing the LPA1/edg2-receptor: involvement of a nonclassical pathway? *Mol Endocrinol*, 17, 1593-1606 (2003).

- Butterfield, L.H., Merino, A., Golub, S.H. and Shau, H. From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal*, 1, 385-402 (1999).
- Chen, J.W., Dodia, C., Feinstein, S.I., Jain, M.K. and Fisher, A.B. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*, 275, 28421-28427 (2000).
- Chisolm, G.M. and Steinberg, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*, 28, 1815-1826 (2000).
- Contos, J.J., Ishii, I. and Chun, J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol*, 58, 1188-1196 (2000).
- Cook, S.J. and McCormick, F. Kinetic and biochemical correlation between sustained p44ERK1 (44 kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *Biochem J*, 320 (Pt 1), 237-245 (1996).
- Cotran, R., Kumar, V. and Collins, T. *Anatomie pathologique (Bases morphologiques et physiopathologiques)* (1999).
- Cristea, I.M., Gaskell, S.J. and Whetton, A.D. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood*, 103, 3624-3634 (2004).
- Daum, G., Eisenmann-Tappe, I., Fries, H.W., Troppmair, J. and Rapp, U.R. The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci*, 19, 474-480 (1994).
- Davis, R.J. (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci*, 19, 470-473.
- Dixit, V.M., Marks, R.M., Sarma, V. and Prochownik, E.V. The antimitogenic action of tumor necrosis factor is associated with increased AP-1/c-jun proto-oncogene transcription. *J Biol Chem*, 264, 16905-16909 (1989).
- Dohlman, H.G., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry*, 26, 2657-2664 (1987).
- Domin, J. and Waterfield, M.D. Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett*, 410, 91-95 (1997).
- Eder, A.M., Sasagawa, T., Mao, M., Aoki, J. and Mills, G.B. Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clin Cancer Res*, 6, 2482-2491 (2000).
- Edgell, C.J., McDonald, C.C. and Graham, J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3734-3737 (1983).

- Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Heemskerk, J.W., Aepfelbacher, M. and Siess, W. Mildly oxidized low density lipoprotein induces contraction of human endothelial cells through activation of Rho/Rho kinase and inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem*, 274, 30361-30364 (1999).
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J.J., Weiner, J.A. and Chun, J. Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 507-534 (2001).
- Gaits, F., Fourcade, O., Le Balle, F., Gueguen, G., Gaige, B., Gassama-Diagne, A., Fauvel, J., Salles, J.P., Mauco, G., Simon, M.F. and Chap, H. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett*, 410, 54-58 (1997).
- Gerrard, J.M. and Robinson, P. Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta*, 1001, 282-285 (1989).
- Goetzl, E.J. and An, S. Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Faseb J*, 12, 1589-1598 (1998).
- Gohla, A., Harhammer, R. and Schultz, G. The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem*, 273, 4653-4659 (1998).
- Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S. and Davis, R.J. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol*, 122, 1089-1101 (1993).
- Graves, P.R. and Haystead, T.A. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 39-63; table of contents (2002).
- Guttman, A., Varoglu, M. and Khandurina, J. Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. *Drug Discov Today*, 9, 136-144 (2004).
- Hurt-Camejo, E., Camejo, G., Peilot, H., Oorni, K. and Kovanen, P. Phospholipase A(2) in vascular disease. *Circ Res*, 89, 298-304 (2001).
- Jalink, K., Hordijk, P.L. and Moolenaar, W.H. Growth factor-like effects of lysophosphatidic acid, a novel lipid mediator. *Biochim Biophys Acta*, 1198, 185-196 (1994a).
- Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S. and Moolenaar, W.H. Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol*, 126, 801-810 (1994b).

- Karin, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 270, 16483-16486 (1995).
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273, 245-248 (1996).
- Kranenburg, O. and Moolenaar, W.H. Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene*, 20, 1540-1546 (2001).
- Libby, P. Les maladies cardio-vasculaires. *Pour la science*, 60-67 (2002).
- Luquain, C., Sciorra, V.A. and Morris, A.J. Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things. *Trends Biochem Sci*, 28, 377-383 (2003).
- Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-241 (2000).
- Maschberger, P., Bauer, M., Baumann-Siemons, J., Zangl, K.J., Negrescu, E.V., Reininger, A.J. and Siess, W. Mildly oxidized low density lipoprotein rapidly stimulates via activation of the lysophosphatidic acid receptor Src family and Syk tyrosine kinases and Ca²⁺ influx in human platelets. *J Biol Chem*, 275, 19159-19166 (2000).
- McIntyre, T.M., Pontsler, A.V., Silva, A.R., St Hilaire, A., Xu, Y., Hinshaw, J.C., Zimmerman, G.A., Hama, K., Aoki, J., Arai, H. and Prestwich, G.D. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR γ agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 131-136 (2003).
- McLees, A., Graham, A., Malarkey, K., Gould, G.W. and Plevin, R. Regulation of lysophosphatidic acid-stimulated tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by protein kinase C- and pertussis toxin-dependent pathways in the endothelial cell line EAhy 926. *Biochem J*, 307 (Pt 3), 743-748 (1995).
- Michiels, C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*, 196, 430-443 (2003).
- Moolenaar, W.H., Kranenburg, O., Postma, F.R. and Zondag, G.C. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 168-173 (1997).
- Munoz, C., Castellanos, M.C., Alfranca, A., Vara, A., Esteban, M.A., Redondo, J.M. and de Landazuri, M.O. Transcriptional up-regulation of intracellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate involves the activation of activating protein-1. *J Immunol*, 157, 3587-3597 (1996).
- Murph, M.M., Scaccia, L.A., Volpicelli, L.A. and Radhakrishna, H. Agonist-induced endocytosis of lysophosphatidic acid-coupled LPA1/EDG-2 receptors via a dynamin2- and Rab5-dependent pathway. *J Cell Sci*, 116, 1969-1980 (2003).

- Noguchi, K., Ishii, S. and Shimizu, T. Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem*, 278, 25600-25606 (2003).
- Norata, G.D., Pirillo, A., Callegari, E., Hamsten, A., Catapano, A.L. and Eriksson, P. Gene expression and intracellular pathways involved in endothelial dysfunction induced by VLDL and oxidised VLDL. *Cardiovasc Res*, 59, 169-180 (2003).
- Palmetshofer, A., Robson, S.C. and Nehls, V. Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Thromb Haemost*, 82, 1532-1537 (1999).
- Panetti, T.S. Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 190-196 (2002).
- Panetti, T.S., Nowlen, J. and Mosher, D.F. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 1013-1019 (2000).
- Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2, 3-10 (2002).
- Rameh, L.E. and Cantley, L.C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem*, 274, 8347-8350 (1999).
- Reithmann, C., Gierschik, P. and Jakobs, K.H. Stimulation and inhibition of adenylyl cyclase. *Symp Soc Exp Biol*, 44, 207-224 (1990).
- Rival, Y., Beneteau, N., Taillandier, T., Pezet, M., Dupont-Passelaigue, E., Patoiseau, J.F., Junquero, D., Colpaert, F.C. and Delhon, A. PPARalpha and PPARdelta activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol*, 435, 143-151 (2002).
- Rizza, C., Leitinger, N., Yue, J., Fischer, D.J., Wang, D.A., Shih, P.T., Lee, H., Tigyi, G. and Berliner, J.A. Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest*, 79, 1227-1235 (1999).
- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362, 801-809 (1993).
- Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*, 57, 791-804 (1995).
- Sasayama, S., Okada, M. and Matsumori, A. Chemokines and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 45, 267-269 (2000).

- Sekas, G., Patton, G.M., Lincoln, E.C. and Robins, S.J. Origin of plasma lysophosphatidylcholine: evidence for direct hepatic secretion in the rat. *J Lab Clin Med*, 105, 190-194 (1985).
- Sheikine, Y. and Hansson, G.K. Chemokines and atherosclerosis. *Ann Med*, 36, 98-118 (2004).
- Siess, W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 204-215 (2002).
- Siess, W., Zangl, K.J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. and Aepfelbacher, M. Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6931-6936 (1999).
- Simon, M.F., Chap, H. and Douste-Blazy, L. Human platelet aggregation induced by 1-alkyl-lysophosphatidic acid and its analogs: a new group of phospholipid mediators? *Biochem Biophys Res Commun*, 108, 1743-1750 (1982).
- Stevens, A. and Lowe, J. Anatomie pathologique (1995).
- Stevens, A. and Lowe, J. *Histologie Humaine* (1997).
- Subbanagounder, G., Watson, A.D. and Berliner, J.A. Bioactive products of phospholipid oxidation: isolation, identification, measurement and activities. *Free Radic Biol Med*, 28, 1751-1761 (2000).
- Sugiura, T., Tokumura, A., Gregory, L., Nouchi, T., Weintraub, S.T. and Hanahan, D.J. Biochemical characterization of the interaction of lipid phosphoric acids with human platelets: comparison with platelet activating factor. *Arch Biochem Biophys*, 311, 358-368 (1994).
- Tedgui, A. and Mallat, Z. Athérosclérose et inflammation. *médecine/sciences*, 17, 162-169 (2001).
- Tokumura, A. Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 18-25 (2002).
- van Corven, E.J., van Rijswijk, A., Jalink, K., van der Bend, R.L., van Blitterswijk, W.J. and Moolenaar, W.H. Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J*, 281 (Pt 1), 163-169 (1992).

- Vanhaesebroeck, B., Leeyers, S.J., Panayotou, G. and Waterfield, M.D. Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci*, 22, 267-272 (1997).
- Voet, D. and Voet, J. *Biochimie* (1998).
- Wang, N., Verna, L., Hardy, S., Forsayeth, J., Zhu, Y. and Stemerman, M.B. Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 2078-2084 (1999).
- Whitehead, I.P., Zohn, I.E. and Der, C.J. Rho GTPase-dependent transformation by G protein-coupled receptors. *Oncogene*, 20, 1547-1555 (2001).
- Woodgett, J.R. Transcription factors. In Heldin, C. and Purton, M. (eds.), *Signal Transduction*. Chapman & Hall, London, Vol. 1, pp. 321-333 (1996).
- Xie, Y., Gibbs, T.C. and Meier, K.E. Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta*, 1582, 270-281 (2002).
- Yart, A., Roche, S., Wetzker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap, H. and Raynal, P. A function for phosphoinositide 3-kinase beta lipid products in coupling beta gamma to Ras activation in response to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 277, 21167-21178 (2002).
- Zhu, Y., Lin, J.H., Liao, H.L., Friedli, O., Jr., Verna, L., Marten, N.W., Straus, D.S. and Stemerman, M.B. LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 473-480 (1998).