



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Analyse de l'effet de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur les cellules endothéliales EAhy926 en culture, par une approche subprotéomique

Bultot, Laurent

*Award date:*  
2006

[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.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Analyse de l'effet de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur les cellules  
endothéliales EAhy926 en culture, par une approche subprotéomique**

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

Laurent BULTOT

Septembre 2006

**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>

**Analyse de l'effet de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur les cellules endothéliales EAhy926 en culture, par une approche subprotéomique.**

BULTOT Laurent

Résumé

L'athérosclérose, maladie dégénérative des artères de gros et moyen calibres, est la première cause de mortalité des pays industrialisés. La compréhension de l'ensemble des mécanismes régissant son développement est donc primordiale et passe notamment par l'analyse d'une des étapes clefs de celui-ci, le dysfonctionnement endothélial. Un des acteurs probables de celui-ci, parmi de nombreux autres, est l'acide lysophosphatidique (LPA) qui est présent en quantités anormales au niveau des plaques athéromateuses. Ce lipide médie une série d'effets pro- mais également anti-athérogènes au niveau des différents acteurs cellulaires de l'athérosclérose, et notamment des cellules endothéliales. Dans ce travail, nous allons analyser via deux approches complémentaires, l'effet du LPA sur les cellules endothéliales EAhy926 en culture.

Nous avons d'abord étudié les effets du LPA sur la capacité des cellules endothéliales de réparer une blessure induite au niveau d'un tapis cellulaire. Afin d'interpréter correctement les résultats, nous avons également analysé les effets du LPA sur le potentiel prolifératif des cellules endothéliales, en suivant la biomasse cellulaire en fonction du temps. Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets du LPA sur l'expression génique. Dans ce but, nous avons opté pour une approche subprotéomique focalisée sur le sécrétome, via les gels 2D DIGE. Cette approche nous a permis de mettre en évidence une variation d'abondance significative pour plusieurs protéines sécrétées par les cellules endothéliales en présence de LPA. Après identification de 2 protéines par spectrométrie de masse, nous avons analysé les promoteurs des gènes les encodant, afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation putatifs de leur expression par le LPA.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 2006

**Promoteur:** M.Raes

*« La science ne sert guère qu'à nous donner  
une idée de l'étendue de notre ignorance »*

***Félicité de Lamennais***

*« Toute science crée une nouvelle ignorance »*

***Henri Michaux***

# Remerciement

Arrivé au terme de ce travail, je tenais à remercier l'ensemble des personnes qui ont de loin ou de près contribué à sa réalisation.

Tout d'abord, je tenais à remercier Monsieur le professeur J. Remacle de m'avoir accueilli quelques mois au sein de l'URBC et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je remercie également Madame le Professeur M. Raes, pour la lecture et les corrections apportées à ce mémoire, mais également pour ses encouragements et son soutien constant tout au long de ce travail. Je m'excuse d'ailleurs du nombre incalculable de cheveux que je vous ai fait perdre face à mes fautes d'hautograffe.

Je tenais à remercier l'ensemble de l'équipe ATHERO et un tout grand merci à Cindy pour tout le temps passé à mes côtés à affronter le monde impitoyable du laboratoire, à relire et corriger ce mémoire mais surtout pour ton amitié.

Je tenais à remercier l'ensemble des membres de l'URBC pour la bonne humeur qui y règne. Un grand merci aux travailleurs de l'ombre, c'est-à-dire l'ensemble des techniciens et tout particulièrement à Martine dit MVS pour son travail au sein de l'équipe ATHERO, Marc pour les analyses en spectrométrie, ses dépannages informatiques et son « humour » et bien sûr Edouard pour toute la patience avec laquelle il m'a enseigné les secrets des gels 2D.

Un tout grand merci à l'ensemble des amis que je me suis fait au cours de ses ~~quatre~~ cinq ans d'études, les amis de la première heure (JJ, Damien, Aurélie,...), les retardataires (Benja (merci pour le vin chaud), Chapi, Chapo et bien sûr Julien), l'ensemble des étudiants de 2<sup>ème</sup> licence et plus particulièrement des mémorants de l'URBC (sauf Neil ;-)) ainsi que l'ensemble de mes co-koteurs, plus tout ceux que j'ai oublié.

Un merci tout particulier à Manu pour toutes les heures de travail et le bon temps passé ensemble, sans toi je n'aurais jamais écrit ces lignes.

Merci à l'ensemble des professeurs qui au cours de ces quelques années ont consacré de leur temps afin de nous rendre un peu moins ignorants.

Enfin, un énorme merci à ma famille qui m'a permis de réaliser ce pari un peu fou et qui a cru en moi malgré des notes un peu moyennes en rénové.

Que ce mémoire serve d'exemple à tous les dyslexiques et dysorthographiques, on peut le faire !!!!!!!

# Liste d'abréviations

<b>2D</b>	Gel en 2 dimension
<b>aa</b>	acide aminé
<b>ABAEC</b>	Adult bovine aortic endothelial cell
<b>AC</b>	Adénylate cyclase
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AGPAT</b>	1-acylglycérol 3- phosphate acyl transférase
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AP-1</b>	Activating protein 1
<b>APS</b>	Persulfate d'ammonium
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>Asn</b>	Asparagine
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>bFGF</b>	Basic fibroblast growth factor
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>BSA FAF</b>	BSA fatty acid free
<b>bZIP</b>	basic leucine zipper
<b>C/EBP</b>	CCAAT/enhancer binding protein
<b>cbEGF</b>	Calcium binding EGF
<b>CBP</b>	CREB binding protein
<b>CML</b>	Cellules musculaires lisses
<b>CRE</b>	cAMP responsive element
<b>CRP</b>	C-reactive protein
<b>CTL</b>	Contrôle
<b>Cy</b>	Cyanine
<b>Da</b>	Dalton
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DHG</b>	Dulbecco medium high glucose
<b>DIGE</b>	Difference in gel electrophoresis
<b>Dla</b>	Dige labelling buffer
<b>DMEM</b>	Dulbecco modified Eagle's medium
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>EAT</b>	Eppendorf array technology
<b>ecSOD</b>	Surperoxyde dismutase extracellulaire
<b>EDG</b>	Endothelial differentiation gene
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tétracéate de sodium
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>ELISA</b>	Enzyme linked immunosorbent assay
<b>ERE</b>	Estrogen response element
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
<b>ESI</b>	Electrospray ionisation
<b>FBS</b>	Fœtal bovine serum

<b>FC</b>	Fibulin type carboxyl terminus
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FT</b>	Facteur de transcripton
<b>GAT</b>	Glycérophosphate acyl transférase
<b>GEF</b>	GTP exchange factor
<b>GH</b>	Growth hormone
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HDL</b>	Hight density lipoprotein
<b>HIV-1</b>	Human immunodeficient 1
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>HUVEC</b>	Human umbilical vein endothelial cell
<b>ICAT</b>	Isotope-coded affinity tag
<b>IGF</b>	Insulin growth factor
<b>IgG</b>	Immunoglobuline G
<b>IL-1</b>	Interleukine-1
<b>IL-6</b>	Interleukine-6
<b>IL-8</b>	Interleukine-8
<b>IMAC</b>	Immobilized metal affinity chromatography
<b>IP3</b>	Inositol triphosphate
<b>IPG</b>	Immobilin ph gradient
<b>JNK</b>	c-jun-N-terminal kinase
<b>Kd</b>	Constante de dissociation
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KID</b>	Kinase inducible domain
<b>LC</b>	Chromatographie liquide
<b>LCAT</b>	Lécithine-cholestérol acyl transférase
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>LFABP</b>	Liver fatty acid binding protein
<b>LPA</b>	Lysophosphatidic acid
<b>LPAAT</b>	Lysophosphatidic acid acyltransferase
<b>LPC</b>	Lysophosphatidylcholine
<b>LPE</b>	Lysophosphatidyl éthanolamine
<b>LPP</b>	Lipid phosphate phosphohydrolase
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LTR</b>	Long terminal repeat
<b>Lyso-PLD</b>	Lysophospholipase D
<b>MALDI</b>	Matrix assited laser desorption
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>MAPKK</b>	Mitogen activated protein kinase kinase
<b>MAPKKK</b>	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein 1
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>MEK</b>	MAPK ERK Kinase
<b>MEKK1</b>	MEK1 kinase
<b>MGAT</b>	Monoacylglycérol acyl transférase
<b>MMP</b>	Metalloprotéase

<b>mox-LDL</b>	Mildly oxidized LDL
<b>MudPIT</b>	Multidimensional protein identification technology
<b>MW</b>	Molecular weight
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B
<b>NF-IL6</b>	Nuclear factor-Interleukine 6
<b>O/N</b>	Over night
<b>oxLDL</b>	Oxidized low density lipoprotein
<b>PA</b>	Phosphatidic acid
<b>PAF</b>	Platelet activating factor
<b>PAP</b>	Phosphatidate phosphatase
<b>PBS</b>	phosphate buffer saline
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine
<b>PH</b>	Plekstrin homology
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>PI</b>	Phosphatidylinositol
<b>PI</b>	Point isoélectrique
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide-3-kinase
<b>PIP</b>	Phosphoinositol
<b>PKA</b>	$\epsilon$ AMP-dependent protein kinase
<b>PKC</b>	Protein kinase C
<b>PLA1</b>	Phospholipase A1
<b>PLA2</b>	Phospholipase A2
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator activated receptor
<b>PTX</b>	Toxine pertussique
<b>PTX3</b>	Pentraxine-3
<b>Q</b>	Quadripôle
<b>Rho</b>	Ras homology
<b>ROCK</b>	Rho kinase
<b>rpm</b>	Rotation par minute
<b>RT</b>	Room temperature
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>S1P</b>	Sphingosine-1-phosphate
<b>SAP</b>	Serum amyloïd P component
<b>SCX</b>	Strong cation exchange column
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>siRNA</b>	Silencing RNA
<b>Sp1</b>	Specificity protein 1
<b>SRF</b>	Serum responsive element
<b>STC2</b>	Stanniocalcine-2
<b>TAG</b>	Triacylglycérol
<b>TBP</b>	TATA BOX protein
<b>TF</b>	Tissue factor
<b>TIMP-3</b>	Tissue inhibitor of metalloprotease-3
<b>TLR</b>	Toll-like receptor

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>TOF</b>	Time of flight
<b>TRED</b>	Transcriptional regulatory element database
<b>TSG4</b>	TNF $\alpha$ stimulated gene-4
<b>UPR</b>	Unfolded protein response
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule-1

# Table des matières

## I. Introduction

<b>1</b>	<b>L'athérosclérose</b>	<b>1</b>
1.1	<i>L'athérosclérose</i>	1
1.2	<i>Les lésions athérosclérotiques</i>	1
1.2.1	La strie lipidique	1
1.2.2	La lésion fibro-graisseuse	1
1.2.3	La plaque d'athérome	2
1.3	<i>Les théories explicatives de l'athérosclérose</i>	2
1.3.1	La théorie de la prolifération clonale	2
1.3.2	La théorie thrombogénique	2
1.3.3	La théorie de l'insudation lipidique	2
1.3.4	La théorie de la blessure endothéliale (« cell injury response »)	3
<b>2</b>	<b>L'acide lysophosphatidique (LPA)</b>	<b>3</b>
2.1	<i>La biochimie du LPA</i>	3
2.1.1	Structure et isoforme	3
2.1.2	Synthèse et transport du LPA	4
2.1.2.1	La synthèse de LPA extracellulaire	4
2.1.2.2	Le transport du LPA extracellulaire	5
2.1.2.3	La synthèse du LPA intracellulaire	6
2.1.2.4	Le transport du LPA intracellulaire	6
2.1.3	Dégradation du LPA	6
2.1.3.1	Dégradation via les phosphatases	6
2.1.3.2	Dégradation via les acyltransférases	6
2.1.3.3	Dégradation via la lysophospholipase	6
2.2	<i>Les Effets du LPA</i>	7
2.2.1	Les récepteurs au LPA	7
2.2.1.1	Les récepteurs membranaires de la famille EDG	7
2.2.1.2	Le récepteur LPA <sub>4</sub>	8
2.2.1.3	Le récepteur LPA <sub>5</sub>	8
2.2.1.4	PPAR $\gamma$	8
2.2.2	Les différentes voies activées par le LPA	8
2.2.2.1	L'activation/inhibition de l'adénylate cyclase	8
2.2.2.2	La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)	9
2.2.2.3	La voie des protéines Rho	9
2.2.2.4	La voie PI3K/Akt	9
2.2.2.5	La voie de la phospholipase C (PLC)	10
2.3	<i>L'implication du LPA dans l'athérosclérose</i>	10
2.3.1	Les sources de LPA au niveau de la plaque athéromateuse	10
2.3.2	Les effets pro-athérogènes	10
2.3.2.1	Au niveau des cellules endothéliales	10
2.3.2.2	Au niveau des cellules musculaires lisses (CML)	11
2.3.2.3	Au niveau des leucocytes	11
2.3.2.4	Au niveau des plaquettes	11

2.3.3	Les effets anti-athérogènes : .....	11
<b>3</b>	<b>Effets du LPA sur l'expression génique – Approche protéomique .....</b>	<b>11</b>
3.1	<i>Les approches transcriptomiques</i> .....	12
3.1.1	Les approches avec a priori : .....	12
3.1.2	Les approches sans a priori : .....	12
3.1.3	Avantages et inconvénients : .....	13
3.2	<i>Les approches protéomiques</i> .....	13
3.2.1	Les approches avec a priori : .....	13
3.2.2	Les approches sans a priori : .....	13
3.2.2.1	Les techniques gel-dépendantes : .....	14
3.2.2.1.1	La technique des gels 2D classique:.....	14
3.2.2.1.2	Les gels 2D-DIGE (Difference In gel Electrophoresis) : .....	15
3.2.2.1.3	Identification des protéines par spectrométrie de masse .....	15
3.2.2.1.4	Gels 2D et subprotéomique : .....	16
3.2.2.2	Les techniques gel-indépendantes : .....	17
<b>4</b>	<b>Objectif du mémoire .....</b>	<b>19</b>

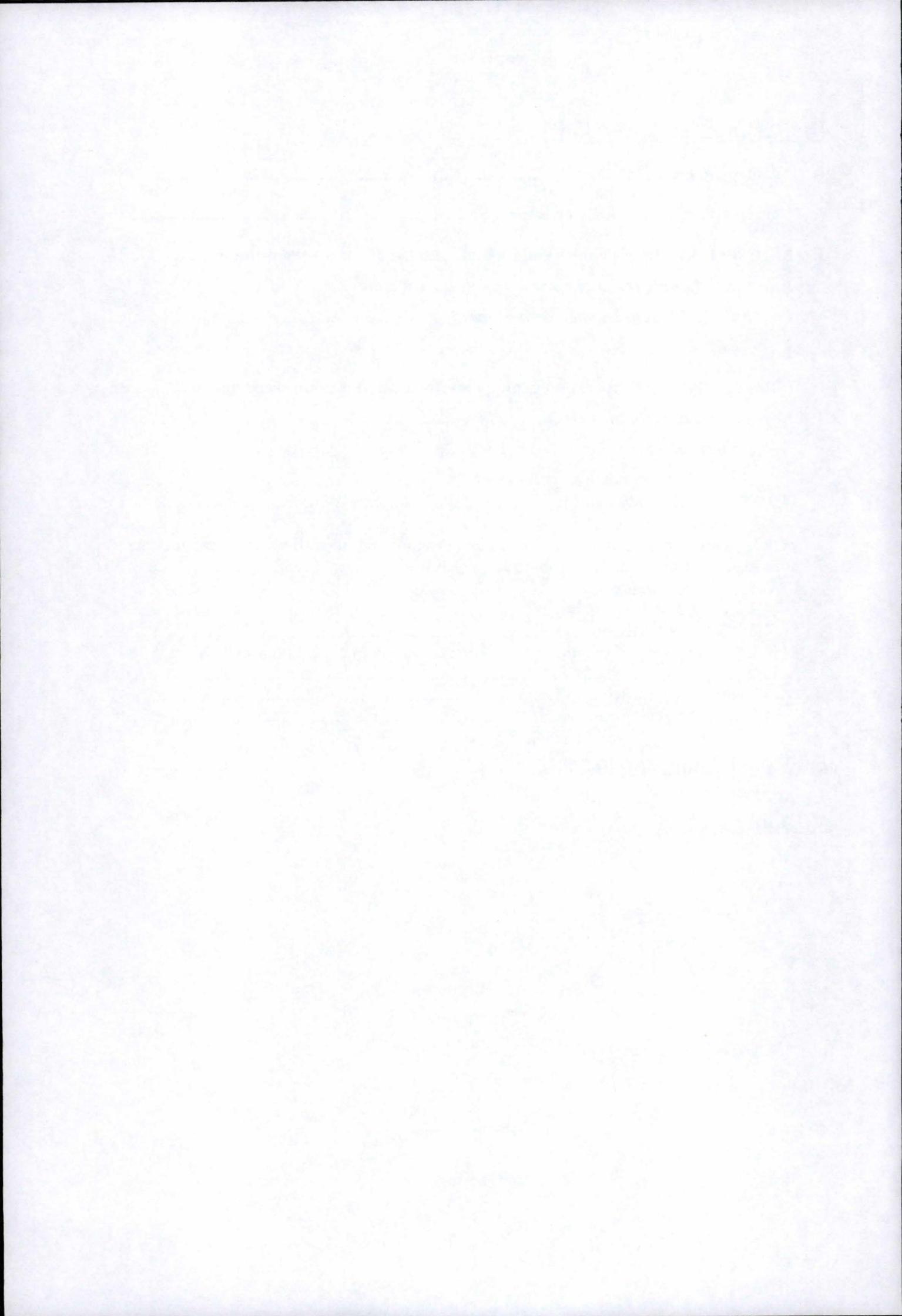
## II. Matériels et Méthodes

<b>1</b>	<b>Culture cellulaire.....</b>	<b>20</b>
1.1	<i>Repiquage cellulaire</i> .....	20
1.2	<i>Congélation des cellules EAhy926</i> .....	20
1.3	<i>Décongélation des cellules EAhy926</i> .....	20
<b>2</b>	<b>Test de la blessure .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Mesure du potentiel prolifératif .....</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>Analyse du sécrétome par la technique des gels 2D.....</b>	<b>22</b>
4.1	<i>Traitement des protéines sécrétées (sécrétome)</i> .....	22
4.2	<i>GEL 2D</i> .....	25
4.2.1	Migration en 1 <sup>ère</sup> dimension : .....	25
4.2.2	Migration en 2 <sup>ème</sup> dimension.....	26
4.2.3	La révélation.....	27
<b>5</b>	<b>Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse.....</b>	<b>28</b>
<b>6</b>	<b>Analyse bioinformatique des séquences promotrice.....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>Analyse statistique.....</b>	<b>29</b>

### III. Résultats et discussion

<b>1. Avant-propos.....</b>	<b>30</b>
<b>2. Caractérisation du modèle cellulaire.....</b>	<b>30</b>
<b>3. Effets du LPA sur les cellules endothéliales EAhy926 au niveau cellulaire .....</b>	<b>31</b>
3.1. <i>Effets du LPA sur la réponse à une blessure induite.....</i>	<i>31</i>
3.2. <i>Effet du LPA sur le potentiel prolifératif.....</i>	<i>32</i>
3.3. <i>Discussion :.....</i>	<i>33</i>
<b>4. Effets du LPA sur l'expression génique analysée au niveau du sécrétome.....</b>	<b>35</b>
4.1. <i>Choix des conditions expérimentales .....</i>	<i>36</i>
4.2. <i>Analyse du sécrétome en gels 7-11.....</i>	<i>36</i>
4.3. <i>Analyse du sécrétome en gels 4-7 .....</i>	<i>37</i>
4.3.1. <i>Les gels analytiques.....</i>	<i>37</i>
4.3.2. <i>Les gels préparatifs.....</i>	<i>38</i>
4.3.3. <i>Description et relevance biologique des protéines identifiées en spectrométrie de masse, dans le cadre de la « problématique LPA ».....</i>	<i>39</i>
4.3.3.1. <i>Pentraxine-3.....</i>	<i>39</i>
4.3.3.2. <i>La Stanniocalcine-2 .....</i>	<i>41</i>
4.3.3.3. <i>Les fibulines .....</i>	<i>42</i>
4.3.4. <i>Analyse bioinformatique du promoteur des gènes codant pour la PTX3 et la STC2 .....</i>	<i>43</i>
4.3.4.1. <i>La pentraxine-3.....</i>	<i>43</i>
4.3.4.2. <i>La stanniocalcine-2 .....</i>	<i>46</i>
<b><u>IV. Conclusions et perspectives.....</u></b>	<b>47</b>

### V. Bibliographie



# I. INTRODUCTION

# 1 L'athérosclérose

## 1.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est une **maladie dégénérative** de l'intima des artères de gros calibre comme l'aorte, les artères coronaires, carotides, mésentériques, iliaques et fémorales (Steven et Lowe, 1997). Elle se caractérise par une accumulation de lipides au niveau de l'intima, conduisant à la formation d'une plaque d'athérome qui peu à peu s'épaissira et se complexifiera. La rupture ou l'érosion de la plaque athéromateuse peut déclencher la formation d'un thrombus. Celui-ci peut provoquer l'obturation de l'artère et conduire à l'ischémie des tissus irrigués par celle-ci, entraînant un infarctus dans le cas des artères coronaires ou un accident cérébro-vasculaire dans celui des carotides.

L'athérosclérose est responsable de près de la moitié des décès dans les pays industrialisés et tend à augmenter dans les pays en voie de développement. L'apparition de l'athérosclérose est liée à différents **facteurs de risque**, soit constitutifs (le sexe, l'histoire familiale, l'âge,...), soit comportementaux (tabagisme, sédentarité, régime alimentaire,...). Mais l'ensemble des mécanismes responsables du développement de cette maladie n'est pas encore totalement compris (Lusis, 2000).

## 1.2 Les lésions athérosclérotiques

Le développement de la plaque d'athérome est un phénomène continu au cours duquel 3 grandes étapes peuvent être dégagées : la strie lipidique, la lésion fibro-graisseuse et la plaque d'athérome (Wasserman et Shipley, 2006).

### 1.2.1 La strie lipidique :

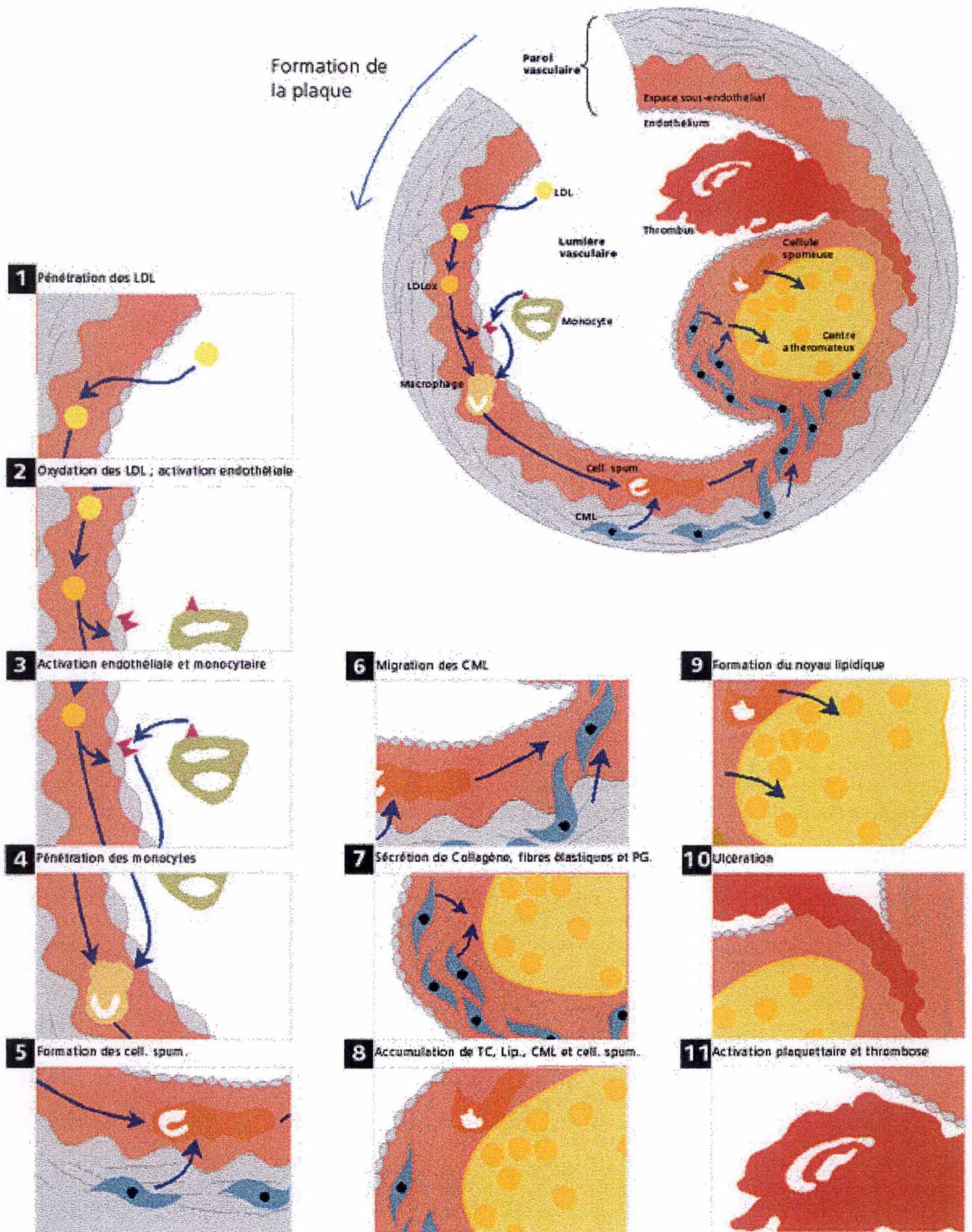
La strie lipidique est le premier stade de développement de l'athérosclérose et peut déjà se rencontrer dès l'enfance. Elle est décrite comme un faible **épaississement localisé jaunâtre** de l'intima artérielle. L'endothélium de la lésion est activé, c'est-à-dire qu'il présente une perméabilité accrue et exprime différentes molécules d'adhérence intervenant dans le recrutement des leucocytes circulants.

L'intima au niveau de la strie lipidique se caractérise par la présence de LDL (*low density lipoprotein*) oxydées (**oxLDL**), de macrophages, de lymphocytes T et de cellules spumeuses. Ces dernières sont des macrophages ayant internalisé de manière non-régulée une grande quantité d'oxLDL. Ce stade de développement a la particularité d'être réversible (Libby, 2002 ; Wasserman et Shipley, 2006).

### 1.2.2 La lésion fibro-graisseuse :

La lésion fibro-graisseuse est un soulèvement jaune ou blanchâtre qui commence à envahir la lumière artérielle, ce qui provoque une **perturbation du flux sanguin**. La lésion au niveau de l'intima se caractérise par l'entrée de monocytes se différenciant rapidement en macrophages, puis en cellules spumeuses et par la formation d'un **cœur nécrotique**. Ce dernier est composé de cellules spumeuses, de cristaux de cholestérol et de divers débris cellulaires.

De plus, les cellules musculaires lisses (CML) de la média vont migrer au niveau de l'intima où, soit elles se différencieront en cellules spumeuses, soit elles sécréteront une matrice de



**Figure I.1:** Représentation schématique des différentes étapes du développement de la plaque d'athérosclérose. LDL: Low Density Lipoprotein, CML : Cellules musculaires lisses, TC : Cellules T, lip. : lipides. (d'après [www.123bio.net](http://www.123bio.net))

collagène, responsable de la formation d'une chape fibreuse recouvrant le cœur nécrotique (Lusis, 2000 ; Wasserman et Shipley, 2006).

### ***1.2.3 La plaque d'athérome :***

La lésion va continuer à s'étendre et à s'épaissir, entraînant une perturbation accrue du flux sanguin : à ce stade, on parle de plaque d'athérome. En réaction à cette modification du flux sanguin, des dilatations compensatoires de l'artère, appelées **anévrismes**, peuvent se développer. L'artère plus fragile à ces endroits, peut se rompre, c'est la rupture d'anévrisme avec hémorragie interne (Steven et Lowe, 1997).

L'autre danger associé à la plaque d'athérome, est la formation d'un **thrombus**. En effet, vu le diamètre réduit de l'artère à cet endroit, elle s'obture progressivement, conduisant ainsi à l'ischémie des tissus irrigués (Lusis, 2000 ; Wasserman et Shipley, 2006) (Figure I.1). La formation de ce thrombus peut avoir plusieurs causes. La première est l'**érosion** de l'endothélium qui sépare normalement le sang et les constituants de la chape fibreuse, cette érosion déclenchant une réaction de coagulation. La seconde cause est la **rupture** de la plaque athéromateuse qui met en contact le sang circulant et les différents constituants hautement thrombogéniques du cœur nécrotique. La formation dans ce cas du thrombus est liée à l'instabilité de la plaque. Celle-ci dépend entre autres de l'épaisseur de la chape fibreuse, de la quantité de cellules du système immunitaire présentes au niveau de la lésion, de la taille et de la composition du cœur nécrotique et des stress mécaniques auxquels est exposé le segment artériel lésé (Kullo et al, 1998).

## **1.3 Les théories explicatives de l'athérosclérose**

Dans ce point, nous allons détailler les principales théories proposant un modèle explicatif du développement des plaques d'athérosclérose.

### ***1.3.1 La théorie de la prolifération clonale :***

Le développement de la plaque d'athérome serait dû principalement à une **prolifération clonale de CML**. Les CML rencontrées au niveau de l'intima de l'artère, seraient toutes des clones cellulaires dérivés de quelques CML de la média (Stevens et Lowe, 1997) (Figure I.1).

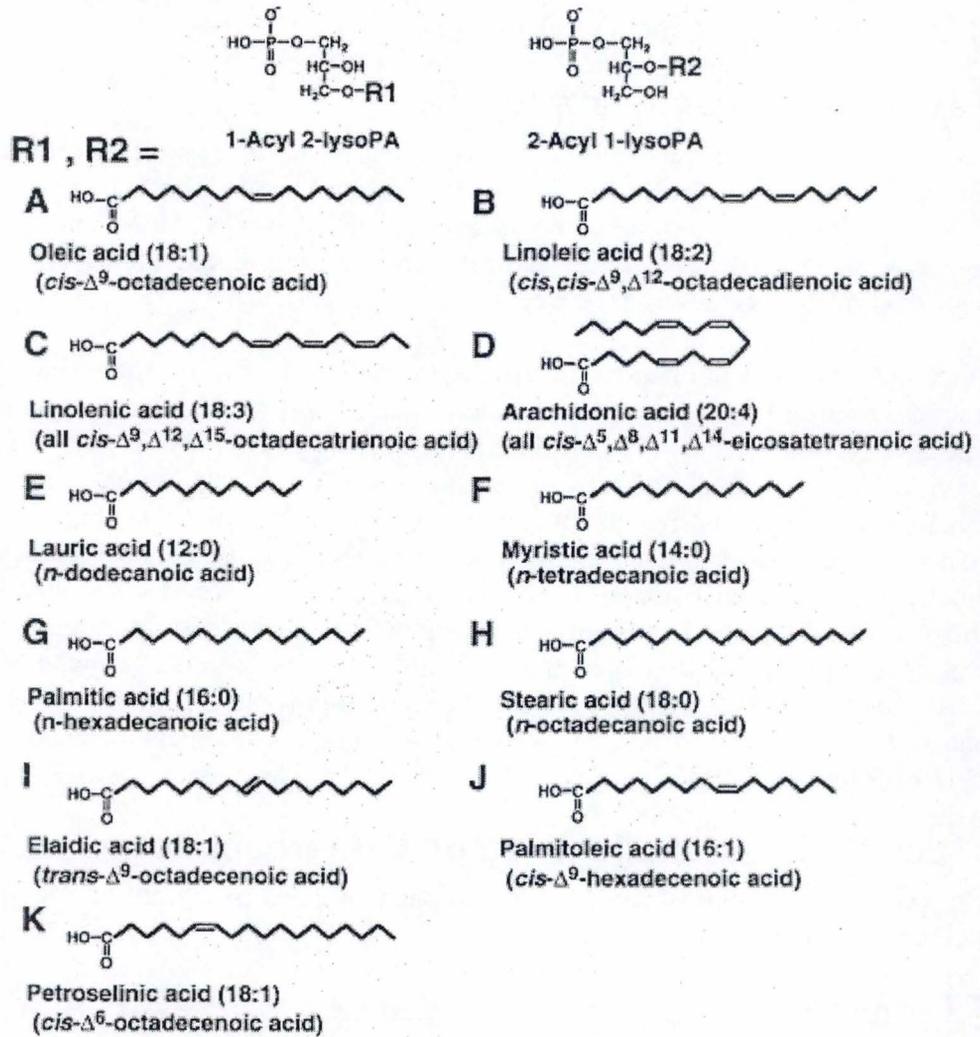
### ***1.3.2 La théorie thrombogénique :***

La théorie thrombogénique propose que le dépôt de différents constituants sanguins au niveau de l'endothélium provoquerait l'activation plaquettaire, qui serait à l'origine du **développement d'un petit caillot**. Celui-ci conduirait au niveau de l'intima à l'accumulation de lipides issus des plaquettes et à la stimulation de la prolifération des CML (Stevens et Lowe, 1997).

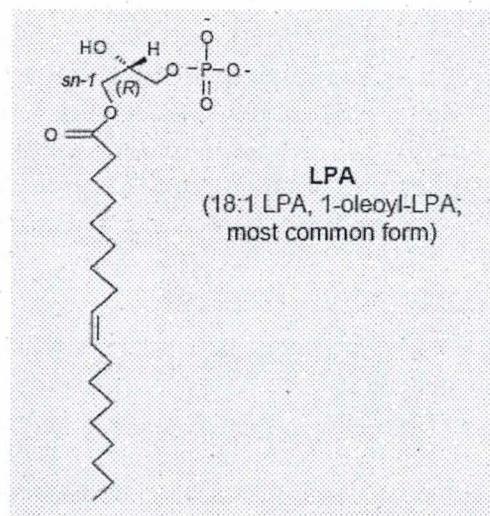
### ***1.3.3 La théorie de l'insudation lipidique :***

Cette théorie considère que l'élément déclencheur est un taux sanguin élevé en LDL, ce qui favoriserait une **pénétration accrue de ces LDL** au niveau de l'intima. À cet endroit, elles s'oxydent et ces LDL oxydées (oxLDL) ainsi produites, induiront l'activation des cellules endothéliales voisines, ce qui favorisera la diapédèse des globules blancs et le maintien d'une perméabilité endothéliale accrue, amplifiant l'entrée des LDL au niveau de l'intima. Ainsi, les différents éléments permettant le développement de la plaque d'athérome sont réunis (Jessup et al, 2004).

## LPA species



**Figure I.2:** Représentation schématique des différentes formes de LPA existantes (d'après Bandog et al. 2000).



**Figure I.3 :** Représentation schématique du 1-oléoyl-LPA (d'après Garell et al, 2006)

### **1.3.4 La théorie de la blessure endothéliale (« cell injury response ») :**

Cette théorie est basée sur le **dysfonctionnement local de l'endothélium**, entraînant une plus grande perméabilité de celui-ci. Ce dysfonctionnement peut avoir différentes origines telles que : les stress mécaniques (par exemple au niveau des embranchements artériels), la présence d'agents infectieux ou de substances toxiques dans le sang (par exemple à cause du tabagisme ou encore les LDL en excès elles-mêmes),...

Cette perméabilité accrue va favoriser la **pénétration anormale des LDL** au niveau de l'intima (Figure I.1). Le faible pouvoir anti-oxydant de celle-ci va permettre l'oxydation des lipoprotéines et donc la formation des LDL oxydées. Celles-ci, retenues au niveau de l'intima vont induire une activation de l'endothélium, qui permettra le recrutement de leucocytes circulants via la sécrétion de chémoattractants et l'expression en membrane de différentes molécules d'adhérence. Les monocytes infiltrant l'intima vont se différencier en macrophages qui, suite à l'absorption non régulée d'oxLDL, deviendront des cellules spumeuses (Figure I.1).

De plus, ces oxLDL provoquent l'activation des monocytes/macrophages et des lymphocytes qui s'accumulent au niveau de l'intima et y sécrètent différentes molécules pro-inflammatoires. Celles-ci vont induire, premièrement le maintien de l'**activation de l'endothélium** et donc du recrutement des différentes cellules du système immunitaire. Deuxièmement, la **migration** des CML de la média vers l'intima où elles se transformeront, soit en cellules spumeuses, soit en cellules sécrétrices de collagène, responsable de la formation de la chape fibreuse (Lusis, 2000 ; Tedgui et Mallat, 2006 ; Wasserman et Shipley, 2006).

Actuellement, il existe un certain consensus autour de la théorie de la « cell injury response », qui englobe les autres théories. L'une des étapes clés de cette théorie est l'**oxydation des LDL** qui favorise l'activation des cellules endothéliales. Lors de ce processus d'oxydation, il y a formation de divers médiateurs lipidiques bioactifs, dont l'**acide lysophosphatidique (LPA)** (Siess et al, 1999). C'est pourquoi, il nous a semblé opportun d'étudier en URBC l'effet de ce dernier sur les cellules endothéliales, dans le but de mieux comprendre son implication dans les étapes précoces de l'athérogénèse.

## **2 L'acide lysophosphatidique (LPA)**

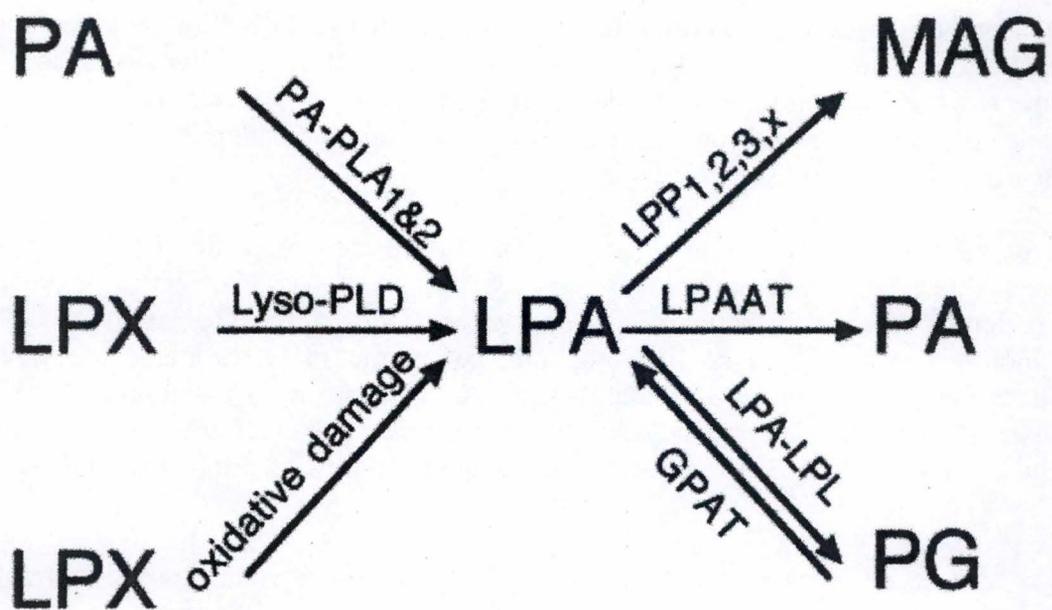
### **2.1 La biochimie du LPA**

#### **2.1.1 Structure et isoforme :**

L'acide lysophosphatidique (ou LPA) est un médiateur lipidique de la famille des lysophospholipides. D'un point de vue structurel, le LPA est composé de 3 parties (Bandoh et al, 2000):

- Une tête hydrophile polaire → Le groupement phosphate.
- Un corps → Le glycérol.
- Une queue hydrophobe → La chaîne d'acide gras.

Il faut savoir que l'appellation LPA ne correspond pas une seule entité chimique, mais regroupe un ensemble de molécules présentant plusieurs différences (Figure I.2) (Xie et al, 2002). Premièrement, la **position** de la chaîne d'acide gras au niveau du glycérol qui peut y



**Figure I.4 :** Schéma reprenant les différentes voies de synthèse et de dégradation du LPA PA : Acide phosphatidique, LPX : lysophospholipide, PLA : phospholipases A, Lyso-PLD : Lysophospholipase D : MAG : monoacylglycérol, LPP : Lipid phosphate phosphohydrolase, LPAAT : lysophosphatidic acid acyltransferase, LPA : LPA lysophospholipase, PG : phosphoglycérol (d'après Tigyi et Parill, 2003).

être liée soit en position 1, soit en position 2. Deuxièmement, la **nature de la chaîne carbonée** fixée au glycérol qui à la position 1 est soit un acide gras, un alkyl ou un alkényl, tandis qu'en position 2 il ne s'agit que d'acide gras. Enfin, **la longueur et le degré de saturation** de la chaîne d'acide gras.

Plusieurs formes de LPA possèdent une activité biologique, conditionnée principalement par la longueur de la chaîne d'acide gras. En effet, une activité maximale est généralement décelée pour les espèces ayant des chaînes d'acide gras de 16 et 18 carbones.

L'espèce de LPA la plus courante et la plus souvent utilisée dans la littérature, est le **LPA 18:1** (oléoyl-LPA) (Figure I.3), qui présente l'avantage d'activer les 3 principaux récepteurs au LPA (voir Paragraphe 2.2.1.1.) (Xie et al, 2002). C'est aussi cette forme que nous avons utilisée au cours de ce mémoire

## **2.1.2 Synthèse et transport du LPA :**

### **2.1.2.1 La synthèse de LPA extracellulaire :**

Les plaquettes sont la principale source de LPA extracellulaire. En effet, lors de leur activation, la concentration sanguine en LPA, normalement de l'ordre du nanomolaire, passe à des concentrations beaucoup plus élevées (de l'ordre du micromolaire). Deux voies de synthèse sont impliquées dans cette augmentation : la première est dépendante des **phospholipases A** (PLA) et la seconde, quant à elle, dépend de la **lysophospholipase D** (Lyso-PLD) (Tigyi et Parrill, 2003).

Il a été démontré que les adipocytes, les tissus en ischémie, les cellules du cerveau, les fibroblastes ou encore les cellules cancéreuses, peuvent également synthétiser et relarguer du LPA via ces deux voies (Xu et al, 2003). Enfin, les LDL oxydées représentent une troisième source de LPA extracellulaire. Décrivons plus en détails ces différentes voies (Figure I.4).

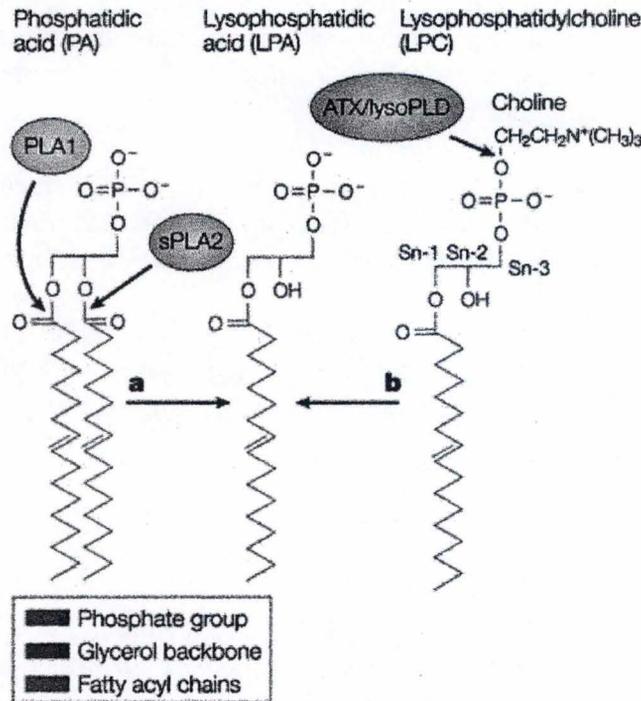
- Via les PLA<sub>1</sub> et PLA<sub>2</sub> :

Deux types de phospholipases A (PLA) sont impliqués dans la synthèse du LPA, les PLA<sub>1</sub> qui **clivent l'acide gras** situé en position *sn-1* du glycérol et les PLA<sub>2</sub> le clivant en position *sn-2* (Figure I.5), ce qui leur permet de générer du LPA au départ d'acide phosphatidique (PA). Ce dernier, quant à lui, est produit soit par l'action de la phospholipase D (PLD) qui transforme n'importe quels phospholipides (principalement la phosphatidylcholine (PC)) en PA, soit par l'action d'une phospholipase C (PLC), qui clive un phospholipide (principalement le phosphatidylinositol (PI) ou le PC) pour former du diacylglycérol (DAG). Ce dernier sera ensuite phosphorylé par une DAG kinase pour former du PA. Le DAG peut également être formé au départ de triacylglycérol (TAG) via l'action de la TAG lipase qui clive une chaîne d'acide gras du TAG pour former du DAG (Siess, 2002).

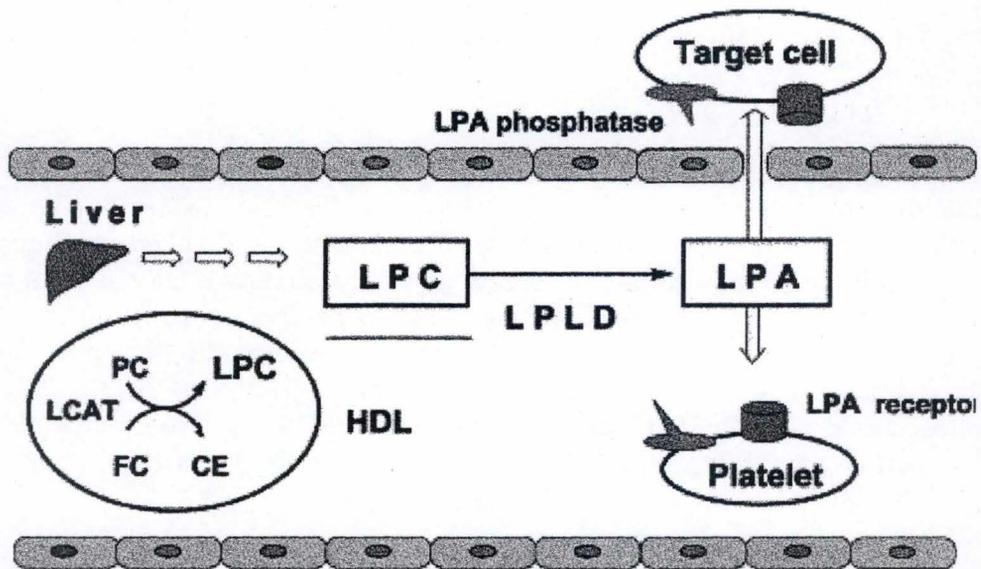
Le LPA ainsi produit aura une action intracellulaire ou sera relargué dans le milieu extracellulaire. Mais cette voie de synthèse du LPA n'est pas la principale ; en effet, elle ne produirait que  $\pm 10\%$  du LPA lors d'une activation plaquettaire (Sonoda et al, 2002).

- Via la Lyso-PLD :

La lysophospholipase D (Lyso-PLD) est une autre lipase impliquée dans la production du LPA extracellulaire. Il s'agit d'une glycoprotéine de 125 kDa située au niveau du feuillet



**Figure I.5 :** Schéma représentant le site d'action des différentes phospholipases impliquées dans la génération de LPA. PLA : phospholipase A, ATX : autotaxine, LysoPLD : lysophospholipase D, sPLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée (d'après Mills, 2003).



**Figure I.6:** Représentation schématique des différentes sources de LPC nécessaire à l'action de la Lyso-PLD. LCAT : lecithin-cholesterol acyl transferase, LPC : lysophosphocholine, LPA : acide lysophosphatidique, HDL : high density lipoprotein, PC : phosphatidylcholine, FC : free cholesterol, CE : cholestérol estérifié, LPLD : lysophospholipase D (d'après Tokumura 2002).

externe de la membrane plasmique ou du feuillet luminal des vésicules de sécrétion. Cette protéine se rencontre également sous une forme soluble, connue également sous le nom d'**autotaxine**, qui est produite par l'action d'une protéase clivant la lyso-PLD membranaire juste après son segment transmembranaire (Luquain et al, 2003).

La lyso-PLD génère du LPA extracellulaire au départ de lysophospholipides et principalement de **lysophosphatidylcholine** (LPC) (Figure I.5). Celle-ci est produite au départ de phospholipides du feuillet externe de la membrane plasmique par différents mécanismes. En condition normale, la LPC provient soit de l'action de la **PLA<sub>1</sub> du foie**, soit de l'action de la **LCAT** (lecithin-cholesterol acyl transferase), qui est une enzyme principalement associée à certaines formes de HDL (high density lipoprotein). La LCAT transfère une chaîne d'acide gras de la PC à un cholestérol libre, formant ainsi de la LPC et du cholestérol estérifié.

Les lysophospholipides disponibles régulent l'activité de la lyso-PLD. En effet, lors de l'activation plaquettaire, il y a sécrétion de PLA<sub>1</sub> et de PLA<sub>2</sub> qui permettent d'augmenter les lysophospholipides disponibles pour la lyso-PLD et donc la production de LPA (Figure I.6) (Luquain et al, 2003 ; Tigyi et Parrill, 2003 ; Tokumura, 2002).

- Via l'oxydation des LDL :

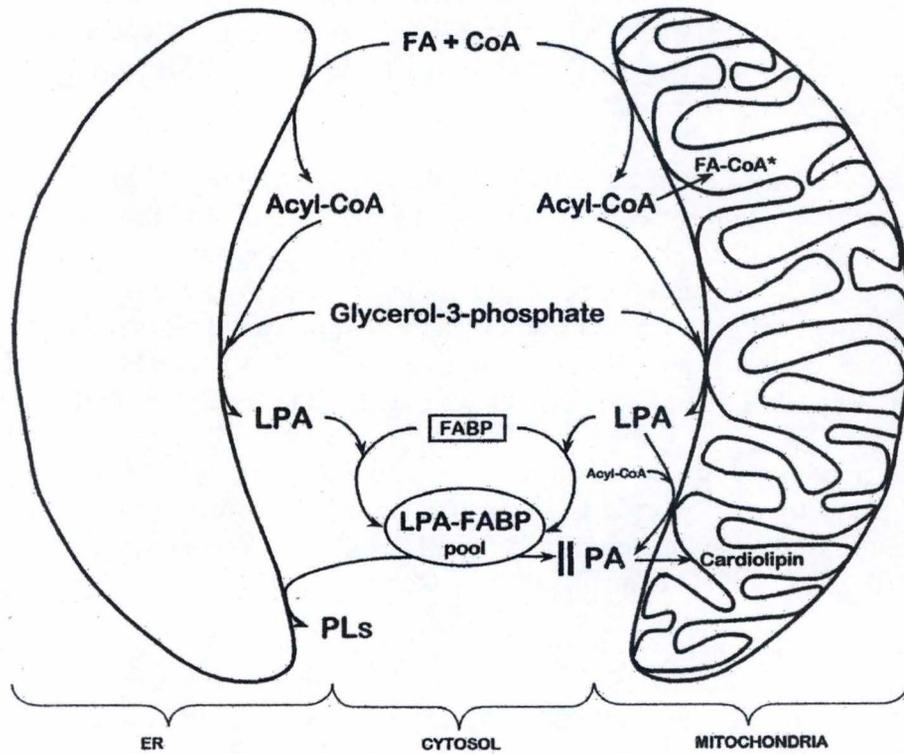
Une autre source de LPA extracellulaire est la production de celui-ci lors de l'oxydation des LDL, processus particulièrement intéressant dans le cadre de la compréhension de l'athérogenèse. En effet, lors de l'oxydation des LDL, le LPA généré se positionne en surface des lipoprotéines, permettant ainsi l'activation des récepteurs membranaire au LPA (Essler et al, 1999 ; Siess, 2002 ; Tigyi et Parrill, 2003).

#### 2.1.2.2 Le transport du LPA extracellulaire :

Vu son caractère hydrophobe, le LPA ne peut pas circuler librement en milieux aqueux; son transport s'effectuera donc grâce à sa fixation à différentes **protéines dites « carrier »**. En plus de leur fonction de transport, ces protéines protégeront le LPA de la dégradation et moduleront son activité. Hama et ses collaborateurs en 2002, montrent en effet une activation différente des récepteurs au LPA selon que la stimulation ait été effectuée dans du plasma sanguin ou du liquide séminal. L'analyse de la composition de la population de LPA révèle qu'elle est comparable dans ces deux fluides et ce serait donc les protéines « carrier » qui expliquent la variation de réactivité observée (Hama et al, 2002). Au niveau du plasma sanguin deux protéines « carrier » ont été décrites, l'albumine et curieusement, la gelsoline.

**L'albumine** fixe avec un Kd de l'ordre du nanomolaire le LPA à raison de 3 molécules de LPA pour une molécule d'albumine, et cela à un site distinct du site de liaison pour la LPC et la LPE (lysophosphatidyl éthanolamine). Son importance dans la modulation de la réactivité du LPA fait que lors d'une stimulation *in vitro* au LPA, de l'albumine est toujours ajoutée au milieu de stimulation.

**La gelsoline**, quant à elle, est normalement une protéine intracellulaire se fixant à l'actine et intervenant dans le remodelage du cytosquelette. Mais, une isoforme sécrétée a été décrite récemment. Elle interviendrait dans le transport de certaines molécules plasmatiques, dont le LPA, qu'elle fixe avec un Kd de l'ordre du nanomolaire (Goetzl et al, 2000).



**Figure I.7:** Voie de synthèse du LPA intracellulaire au départ de glycérol-3-Phosphate et d'Acyl-CoA. FA : fatty acid, LPA : acide lysophosphatidique, PA : acide phosphatidique, FABP : fatty acid binding protein, ER : réticulum endoplasmique (d'après Chakraborty 1999).

### 2.1.2.3 La synthèse du LPA intracellulaire :

Le LPA intracellulaire est essentiellement un intermédiaire de la voie de **synthèse des triacylglycérols**. La synthèse du LPA intracellulaire se fait selon deux voies différentes.

La première voie se déroule au niveau des membranes du **réticulum endoplasmique** et de la mitochondrie, où le glycérol phosphate est acylé premièrement par la GAT (glycérophosphate acyl transférase) et ensuite par la MGAT (monoacylglycérol acyl transférase), ce qui donne du LPA (Figure I.7) (Chakraborty et al, 1999). La seconde voie requiert, quant à elle, l'action successive de la dihydroxyacétone phosphate acyltransférase et de l'acyldihydroxyacétone phosphate réductase, qui au départ de **dihydroxyacétone phosphate**, forment du LPA.

Le LPA ainsi produit sera transformé en triacylglycérol via l'action successive de l'acide phosphatidique phosphatase et de la diacylglycérol acyltransférase.

### 2.1.2.4 Le transport du LPA intracellulaire :

Au niveau du cytoplasme, le LPA est fixé au niveau de la LFABP (liver fatty acid binding protein), une protéine qui peut fixer 2 molécules de LPA. En plus du LPA, elle peut également fixer la LPC et la LPE avec un Kd de l'ordre du micromolaire (Tigyi et Parrill, 2003).

## 2.1.3 Dégradation du LPA :

Actuellement, 3 grandes voies de dégradation du LPA ont été décrites : celles des phosphatases, des acyltransférases et des lysophospholipases (Figure I.4).

### 2.1.3.1 Dégradation via les phosphatases :

Lors de sa dégradation par la voie des phosphatases, le LPA est déphosphorylé et donne du monoacylglycérol (MAG). L'enzyme catalysant cette réaction, est la PAP-2 (phosphatidate phosphatase de type 2 ou **LPP** (lipid phosphate phosphohydrolase). Chez les mammifères, il existe 4 isoformes de la LPP qui ont toutes été clonées et caractérisées : la LPP1/PAP-2a, la LPP1 $\alpha$ /PAP-2 $\alpha$ 2, la LPP2/PAP-2c et la LPP3/PAP-2b. Chacune de ces isoformes présente une affinité particulière pour les différents phospholipides et l'isoforme qui à la plus grande affinité pour le LPA est la LPP1. Les LPPs sont formées de 6 segments transmembranaires reliés entre eux par des boucles, dont 3 sont extracellulaires et 2 sont intracellulaires (Sigal et al, 2005).

### 2.1.3.2 Dégradation via les acyltransférases :

L'enzyme impliquée dans cette voie de dégradation du LPA, est la AGPAT (1-acylglycerol 3-phosphate acyl transferase), également appelée **LPAAT** (lysophosphatidic acid acyltransferase). Celle-ci catalyse le transfert d'un groupement acyl de 14 à 20 carbones au départ d'un acyl-CoA sur le LPA, générant ainsi du PA. Actuellement 5 membres de la famille des LPAAT ont été décrits : LPAAT $\alpha$ /1-AGPAT 1, LPAAT $\beta$ /1-AGPAT 2, LPAAT $\gamma$ /1-AGPAT 3, LPAAT $\delta$ /1-AGPAT 4 et LPAAT $\epsilon$ /1-AGPAT 5. Les isoformes LPAAT $\alpha$  et LPAAT $\beta$  sont responsables de la majeure partie de l'activité LPAAT du corps (Tigyi et Parrill, 2003).

### 2.1.3.3 Dégradation via la lysophospholipase :

L'action de la lysophospholipase libère au départ d'un lysophospholipide (essentiellement sur LPC) un phosphoglycérol et un acide gras. Mais, dans le noyau de cellules neuronales de lapin une LPC lysophospholipase possédant une activité LPA lysophospholipase plus

importante a été découverte. De plus, au niveau du cerveau de rat, une enzyme de 80 kDa avec une activité LPA lysophospholipase a également été purifiée (Baker et Chang, 2000 ; Tigyi et Parrill, 2003).

## 2.2 Les Effets du LPA

Nous allons voir que le LPA induit de nombreux effets qui pourraient jouer un rôle dans les étapes précoces de l'athérosclérose. Mais avant de détailler ceux-ci, intéressons-nous d'abord aux récepteurs au LPA qui médient la plupart de ses effets.

### 2.2.1 Les récepteurs au LPA :

Pendant longtemps, on a cru que le LPA médiait ses différents effets en perturbant l'arrangement des lipides membranaires. Mais, depuis 1996, différents récepteurs au LPA ont été mis en évidence (Chun et al, 2002). Actuellement, **5 récepteurs membranaires** sont connus : 3 appartiennent à la famille EDG (endothelial differentiation gene) et 2 se rapprochent des récepteurs au PAF (platelet activating factor). Ils appartiennent tous à la famille des récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés à différentes protéines G ( $G_{i/o}$ ,  $G_q$ ,  $G_{12/13}$  et  $G_s$ ) dont l'activation permettra d'induire de nombreuses voies de transduction du signal (Xie et al, 2002 ; Gardell et al, 2006). En 2003, il a été montré que le LPA était également un ligand à haute affinité pour le récepteur nucléaire **PPAR $\gamma$**  (peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ ) (McIntyre et al, 2003).

#### 2.2.1.1 Les récepteurs membranaires de la famille EDG :

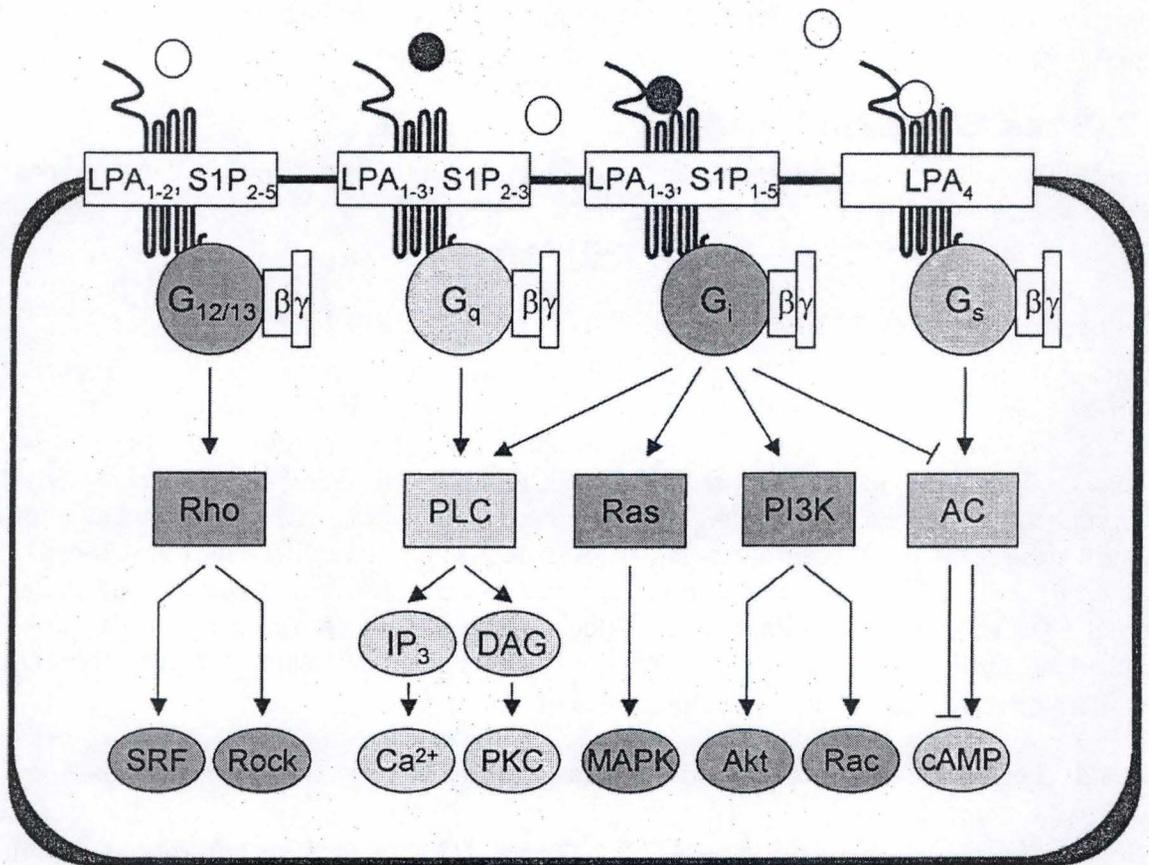
Les 3 récepteurs membranaires au LPA de la famille EDG partagent entre eux 45 à 50 % d'identité et s'appellent : LPA<sub>1</sub>/Edg-2, LPA<sub>2</sub>/Edg-4, LPA<sub>3</sub>/Edg-7. Au sein de cette famille, il existe également des récepteurs reconnus par un autre médiateur lipidique important, la sphingosine-1-phosphate (S1P). La similitude entre les effets qu'induisent ces 2 médiateurs et entre leurs récepteurs fait que les deux molécules sont souvent étudiées ensemble (Ishii et al, 2004 ; Tigyi et Parrill, 2003 ; Luquain et al, 2003 et Xie et al, 2002).

- Le récepteur LPA<sub>1</sub>

Le gène *LPA1* encode chez l'homme pour une protéine de 41 kDa formée de 364 acides aminés. Le récepteur est composé de 7 segments transmembranaires, l'extrémité N-terminale étant extracellulaire et l'extrémité C-terminale intracellulaire. Le récepteur LPA<sub>1</sub> peut interagir avec 3 protéines G différentes  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  et  $G_{12/13}$  qui permettront d'induire : l'activation de la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), l'inhibition de l'AC (Adénylate Cyclase), l'activation d'Akt et de la famille des Rho (Ras homology), l'activation de la PLC, la mobilisation du calcium, l'activation de SRF (Serum Responsive Factor) et la prolifération cellulaire. L'étude de l'expression du récepteur LPA<sub>1</sub> nous révèle qu'il est exprimé de manière plutôt ubiquiste (Ishii et al, 2004 et Tigyi et Parrill, 2003).

- Le récepteur LPA<sub>2</sub>

Le récepteur LPA<sub>2</sub> fut rapidement découvert grâce à ses similitudes avec le récepteur LPA<sub>1</sub> et à l'analyse des banques génomiques. Le gène *LPA2* code pour une protéine de 351 acides aminés dont le poids moléculaire est d'environ 39.1 kDa. Le récepteur LPA<sub>2</sub> interagit avec les 3 mêmes protéines G que le récepteur LPA<sub>1</sub> :  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  et  $G_{12/13}$ . Il a été montré qu'une activation de celui-ci induisait : l'activation des JNK (c-Jun-N-terminal Kinase) et d'Akt, la mobilisation du calcium, la prolifération et la formation des fibres de stress. L'expression de ce récepteur a été étudiée entre autres par hybridation *in situ* et détectée principalement



**Figure I.8** : Schéma reprenant les principaux récepteurs au LPA, les protéines G auxquels ils sont couplés et les voies activées. PLC : phospholipase C, PI3K : phosphoinositide-3-kinase, AC : adénylate cyclase, SRF : Serum response factor, ROCK : Rho kinase, IP<sub>3</sub> : inositol triphosphate, MAPK : mitogen activated protein kinase, cAMP: adénosylmonophosphate cyclique (d'après Anliker 2004).

dans les testicules, le pancréas, la prostate, le thymus, la rate et les globules blancs (Ishii et al, 2004 ; Tigyi et Parrill, 2003 ; Contos et al, 2000).

- Le récepteur LPA<sub>3</sub>

Le récepteur LPA<sub>3</sub> est une protéine de 353 aa et d'un poids moléculaire de 40.1 kDa, encodée par le gène *LPA3*. Contrairement aux récepteurs LPA<sub>1</sub> et LPA<sub>2</sub>, il n'interagit qu'avec 2 types de protéines G, G<sub>i/o</sub> et G<sub>q</sub>. Son activation induit notamment l'activation de la PLC, la mobilisation du calcium, l'inhibition/activation de l'AC et l'activation de la voie des MAPK. Sa réactivité est moindre pour les espèces de LPA possédant une chaîne d'acide gras insaturée. L'expression du gène *LPA3* a été détectée au niveau du cœur, du pancréas, des testicules, des poumons, des ovaires et du cerveau (Ishii et al, 2004 ; Tigyi et Parrill, 2003 ; Contos et al, 2000).

### 2.2.1.2 Le récepteur LPA<sub>4</sub> :

Nogushi et collaborateurs ont mis en évidence en 2003 l'existence d'un quatrième récepteur n'appartenant pas à la famille EDG, mais proche d'un récepteur au PAF, le LPA<sub>4</sub>. Il s'agit d'un ancien récepteur orphelin connu sous le nom de p2y<sub>9</sub>/GPR23 dont le gène de 1113 paires de bases code pour une protéine de 370 acides aminés. Ce récepteur possède un K<sub>d</sub> (constante de dissociation) de 45 nM pour le LPA, et induit différentes réponses telles que la mobilisation du calcium et l'accumulation d'AMP<sub>c</sub> (adénosine monophosphate cyclique). Les protéines G avec lesquelles il interagit ne sont pas encore connues, même si une interaction avec G<sub>s</sub> semble impliquée dans l'activation de l'AC. Le niveau d'expression de *LPA4* a été mesuré dans 16 tissus différents; il en ressort une forte expression au niveau des ovaires et une moindre expression au niveau du pancréas, du thymus, des reins et des muscles squelettiques (Noguchi et al, 2003 ; Ishii et al, 2004).

### 2.2.1.3 Le récepteur LPA<sub>5</sub>

Lee et ses collaborateurs viennent de publier en juin 2006 la découverte d'un cinquième récepteur au LPA. Il s'agit d'un ancien récepteur orphelin, le GPR92 qui présente 35% d'identité avec le récepteur LPA<sub>4</sub>. Différents effets du LPA médiés par ce récepteur ont déjà été mis en évidence, tels que l'activation des protéines Rho via G<sub>12/13</sub>, l'internalisation du récepteur, l'augmentation de l'AMP<sub>c</sub>, la mobilisation du calcium intracellulaire via G<sub>q</sub> et enfin l'induction d'un courant électro-physiologique au niveau de la membrane (Lee et al, 2006).

### 2.2.1.4 PPAR<sub>γ</sub>:

Plus récemment, McIntyre et ses collaborateurs ont montré en 2003 que le LPA était également un agoniste du récepteur nucléaire PPAR<sub>γ</sub> car il est capable de déplacer un agoniste synthétique à haute affinité pour PPAR<sub>γ</sub>, telle la rosiglitazone (McIntyre et al, 2003).

## 2.2.2 Les différentes voies activées par le LPA :

Comme nous venons de le voir, les différents récepteurs membranaires au LPA sont couplés à différentes protéines G : G<sub>i/o</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>12/13</sub> et G<sub>s</sub>. Lorsque le LPA se fixe à un de ses récepteurs membranaires, il induit l'activation de la protéine G qui lui est liée. Chacune de ces protéines G va ensuite activer différentes voies comme : l'activation/inhibition de l'AC, la voie des MAPK, la voie de Rho, la voie de la PLC et la voie de la PI<sub>3</sub>K (Figure I.8).

### 2.2.2.1 L'activation/inhibition de l'adénylate cyclase :

L'adénylate cyclase (AC) est une protéine membranaire qui transforme l'ATP (adénosine triphosphate) en AMP<sub>c</sub> (adénosine monophosphate cyclique), un important messenger

secondaire régulant notamment l'activité de la PKA (AMPC-dependent Protein Kinase). L'activité de l'AC est régulée par la concentration en calcium cytoplasmique et différentes protéines G. En effet, il a été montré que la sous-unité  $\alpha$  de la protéine  $G_{i/o}$ , activée notamment par la fixation du LPA au niveau des récepteurs  $LPA_{1-3}$ , induisait une inhibition de l'AC. Par contre la protéine  $G_s$ , activée par une fixation du LPA au niveau du récepteur  $LPA_4$  entraînait l'activation de l'AC (Saulnier-Blache, 2004 ; Patel et al, 2001).

#### 2.2.2.2 La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) :

La stimulation par différentes espèces de LPA permet l'activation des 3 voies majeures des MAPK : les ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase), impliquées dans la prolifération cellulaire, les kinases JNK et p38 impliquées dans la survie cellulaire et l'inflammation. Les voies des MAPK se caractérisent par une succession de 3 kinases qui se phosphorylent en cascade, les MAPKKK, la MAPKK, La MAPK (Schaeffer et Weber, 1999).

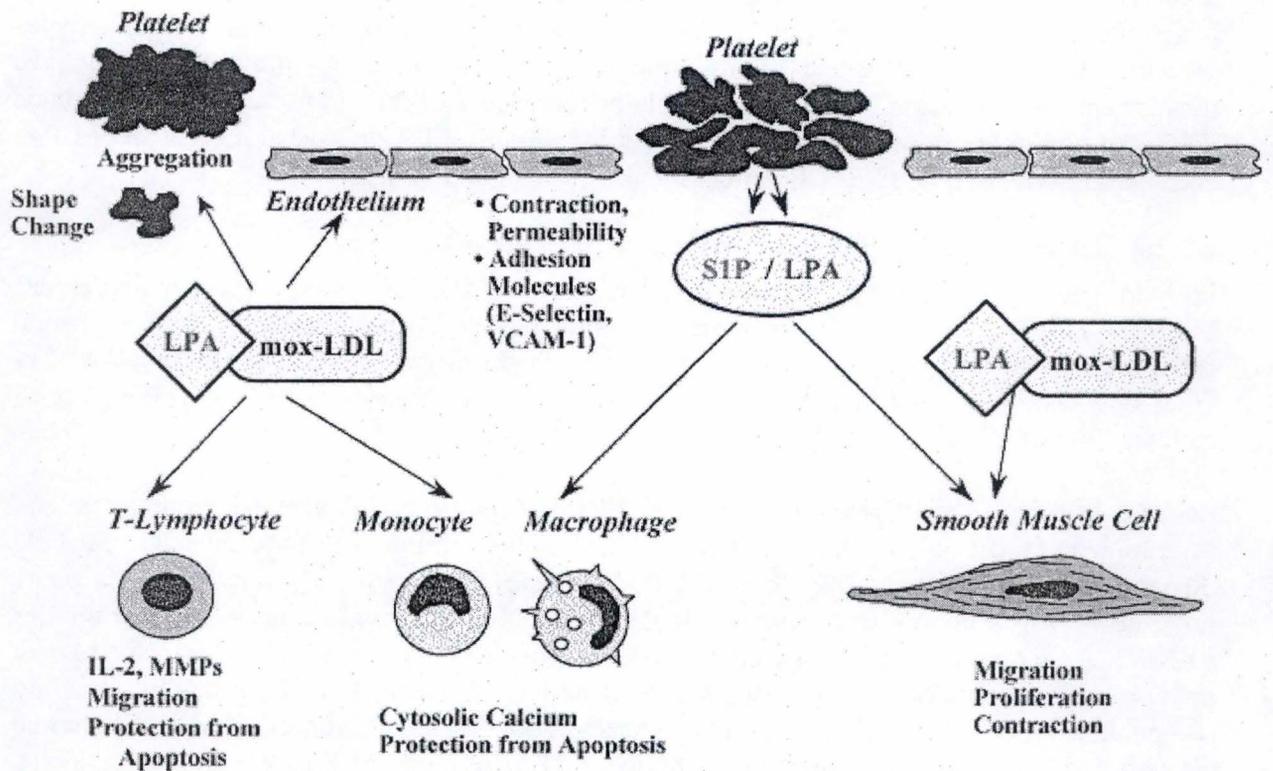
La voie la mieux caractérisée est celle des ERK1/2 (p44/p42). Il a été démontré que son activation se faisait de manière PTX (toxine pertussique, inhibiteur des protéines  $G_i$ ) sensible ou non. L'activation de la voie ERK1/2 **PTX sensible**, passe par l'activation de la petite protéine G Ras qui via une cascade de réactions aboutira finalement à l'activation des ERK1/2. La manière dont Ras est activée reste encore discutée; soit celle-ci est directement activée par la protéine  $G_{i/o}$  activée, soit son activation dépend de la transactivation du récepteur à l'EGF (Prenzel et al, 1999 ; Daaka, 2002; Wu et Cunnick, 2002) (Epidermal Growth Factor) via un processus dépendant de  $G_{i/o}$ . L'activation **PTX insensible**, quant à elle, passe par une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire aboutissant à l'activation des PKC. Celles-ci peuvent ensuite induire la voie des MAPK via la phosphorylation de MEK (MAPK ERK Kinase) qui est la MAPKK de ERK. (Van Leeuwen et al, 2003).

#### 2.2.2.3 La voie des protéines Rho :

Les protéines Rho sont une famille de petites protéines G impliquées dans le réarrangement du cytosquelette d'actine et dont les mieux décrites sont **Rac1, Cdc42 et RhoA**. Par exemple pour RhoA, l'activation de la protéine  $G_{12/13}$  qui est couplée au récepteur  $LPA_1$  et  $LPA_2$ , permet l'activation d'une GEF (GTP Exchange Factor) dont l'action va permettre d'augmenter la proportion de la forme active GTP-RhoA. L'accumulation de celle-ci va entraîner diverses réponses dont notamment l'activation de la Rho kinase (ROCK) qui inactivera la myosine phosphatase en la phosphorylant. Les chaînes de myosine légère vont donc rester phosphorylées, ce qui permettra leur interaction avec les microfilaments et la formation de fibres de stress (Essler et al, 1999 ; Van Leeuwen et al, 2003 ; Seasholtz et Brown, 2004).

#### 2.2.2.4 La voie PI3K/Akt :

La PI3K appartient à une famille de lipide kinases dont l'activité est la phosphorylation de l'anneau d'inositol en position 3 des phosphoinositides, formant ainsi du PI(3)P (phosphatidylinositol monophosphate), du PI(3,4)P2 ou du PI(3,4,5)P3 (ou PIP3). Ces différents lipides membranaires vont ensuite interagir avec différents effecteurs et ainsi moduler leur activité. Par exemple, le PIP3 va recruter en membrane la sérine/thréonine kinase Akt via son domaine PH (Plekstrin homology) et entraîner son activation. L'activation de la PI3K se fait via la sous-unité  $\beta\gamma$  de la protéine  $G_{i/o}$ , qui est couplée aux récepteurs  $LPA_{1-3}$ . Cette kinase module différents processus cellulaires, tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et le réarrangement du cytosquelette. Il semblerait que l'activation de la voie des PI3K puisse également aboutir à l'activation de la voie des MAPK,



**Figure I.9 :** Effet du LPA et de la sphingosine-1-phosphate (S1P) au niveau des différents acteurs cellulaires de l'athérosclérose. LPA : acide lysophosphatidique, mox-LDL : mildly oxidized low density lipoprotein, S1P : sphingosine-1-phosphate, IL-2 : interleukine-2, MMPs: metalloprotéases (D'après Siess 2002).

soit via une transactivation du récepteur à l'EGF, soit via une activation de Ras de manière indépendante du récepteur à l'EGF, soit encore via une activation des PKC qui activeraient à leur tour les MAPK via la phosphorylation de la MEK (Ye et al, 2002 ; Yart et al, 2003).

#### 2.2.2.5 La voie de la phospholipase C (PLC) :

L'activation de la protéine  $G_q$  qui est couplée aux récepteurs  $LPA_{1-3}$ , va permettre d'induire l'activation de la PLC. Cette dernière va cliver le PIP2 membranaire en DAG (diacylglycérol) et en IP3 (inositol triphosphate). L'IP3 produit va diffuser dans le cytoplasme et induire une augmentation du calcium intracellulaire, via l'ouverture de canaux à calcium localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le DAG, quant à lui, va recruter la PKC en membrane qui grâce à la concentration cytoplasmique élevée en calcium sera activée. La PKC activée va intervenir dans de nombreux mécanismes dont l'induction de la voie des MAPK via la phosphorylation de MEK (Contos et al, 2000 ; Anliker et Chun, 2004).

### 2.3 L'implication du LPA dans l'athérosclérose

Siess a observé que la concentration en LPA au niveau des plaques athéromateuses (10 à 49 pM), est 13 fois supérieure à celle mesurée dans les parois artérielles normales (1,3 à 2,8 pM) (Siess et al, 1999). Cette concentration anormale en LPA au niveau des plaques d'athérosclérose conduit à se poser la question de l'origine de ce LPA et de ses effets au niveau des différents acteurs de la pathologie (Figure I.9 et tableau 1).

#### 2.3.1 Les sources de LPA au niveau de la plaque athéromateuse :

Il existe deux sources principales de LPA au niveau des plaques athéromateuses (Tigyi et Parrill, 2003). Les **plaquettes** constituent la première source de LPA, comme nous l'avons vu précédemment. Lorsqu'elles sont activées, elles produisent les phospholipases A1 et A2. Celles-ci vont au départ des lipides membranaires constituer une réserve de lysophospholipides qui sera ensuite utilisée par la lyso-PLD pour former du LPA. La deuxième source de LPA est constituée par les **LDL** qui, lors de leur oxydation au niveau de l'intima artérielle, voient leur contenu en LPA augmenter.

De manière surprenante, on constate que le LPA peut médier à la fois des effets pro-athérogènes et des effets anti-athérogènes en agissant sur les principaux acteurs cellulaires impliqués dans l'athérosclérose. Voyons rapidement les différents effets déjà mis en évidence.

#### 2.3.2 Les effets pro-athérogènes :

##### 2.3.2.1 Au niveau des cellules endothéliales :

Le LPA exerce des effets pro-athérogènes via les cellules endothéliales. Tout d'abord, il provoque une **augmentation de la perméabilité de l'endothélium**. En effet, il a été démontré que lorsque les cellules endothéliales sont mises en contact avec des LDL oxydées ou du LPA, celles-ci présentent une augmentation de leur perméabilité suite à la formation de fibres de stress via l'activation de la voie des protéines Rho. Cette perméabilité accrue va favoriser la pénétration des LDL au sein de l'intima artérielle, ce qui représente un des facteurs important dans l'initiation de l'athérosclérose (Siess et al, 1999 ; Panetti, 2002).

Le LPA entraîne également, une augmentation de l'**expression des molécules d'adhérence**, dont la E-Sélectine et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), ainsi que la **sécrétion de chémoattractants** tels l'IL-8 (Interleukine-8) et le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1),...). Ces molécules favorisent le recrutement des monocytes au niveau de l'intima,

	LPA	S1P
<i>Endothelial cells</i>		
Contraction, permeability	++ or -	-
Proliferation	++	++
Chemotaxis and migration	+	++
Protection from apoptosis		++
Angiogenesis		++
<i>Smooth muscle cells</i>		
Contraction	++	
Proliferation	++	++
Chemotaxis and migration	++ or -	++ or --
<i>Fibroblasts</i>		
Contraction	++	
Proliferation	++	
<i>Macrophages</i>		
Protection from Apoptosis	++	++
<i>T-lymphocytes</i>		
Migration	++ or --	
IL-2 secretion	++ or --	(+)
Protection from apoptosis	++	++
Proliferation	+	
<i>Platelets</i>		
Shape change	++	(+)
Aggregation	+	

**Tableau I.1:** Tableau reprenant les différents effets du LPA et de la S1P sur les différents acteurs cellulaires de l'athérosclérose (D'après Siess, 2002).

où ils se différencieront en macrophages, qui suite à l'internalisation non régulée de LDL oxydées, se transformeront en cellules spumeuses (Siess, 2002 ; Panetti, 2002).

#### 2.3.2.2 Au niveau des cellules musculaires lisses (CML):

La stimulation des CML par du LPA (dérivés d'acides gras insaturés), induit une **dédifférenciation** de celles-ci en cellules proches des fibroblastes, qui vont migrer au niveau de l'intima et proliférer. Ces 3 phénomènes, - la dédifférenciation, la migration et la prolifération -, permettent d'expliquer la formation de la néo-intima au départ de CML de la média artérielle. (Hayashi et al, 2001 ; Siess, 2002).

#### 2.3.2.3 Au niveau des leucocytes :

Très peu d'études ont été menées sur les effets du LPA sur les leucocytes. Néanmoins il a été démontré qu'au niveau des **monocytes/macrophages**, le LPA en forte concentration, joue le rôle de chémoattractant pour les monocytes vis-à-vis de l'endothélium (Zhou et al, 1995). Des concentrations plus faibles en LPA, quant à elles, augmentent la survie des macrophages et le maintien de l'activation des macrophages sans pour autant induire leur prolifération (Siess, 2002). Le LPA stimule également les **lymphocytes**, en stimulant leur prolifération (sauf pour les T-CD4 exprimant fortement le LPA<sub>2</sub>), leur migration, la suppression de l'apoptose et la sécrétion de métalloprotéases (MMP). Ces dernières pourraient jouer un rôle important dans l'instabilité de la plaque d'athérome via la destruction de la chape fibreuse. (Goetzl et al, 2000 ; Siess, 2002)

#### 2.3.2.4 Au niveau des plaquettes :

Le LPA présent dans les mox-LDL (mildly oxidized LDL, ce qui correspond à un état d'oxydation intermédiaire entre les LDL natives et les oxLDL) ou dans la plaque d'athérome, induit via la voie de RhoA, un changement de la forme des plaquettes et l'agrégation plaquettaire. De plus, lors de la rupture de la plaque, l'augmentation du LPA plasmatique provoque l'activation plaquettaire et contribue donc à la formation d'un thrombus responsable de l'ischémie des tissus irrigués par l'artère obturée (Siess, 2002 ; Haseruck et al, 2004).

#### 2.3.3 Les effets anti-athérogènes :

Le LPA n'induisait pas que des effets pro-athérogènes, mais il exerce également des effets anti-athérogènes, notamment en stimulant la réparation vasculaire. En effet, la stimulation des cellules endothéliales avec du LPA induit leur prolifération et leur migration vers les zones lésées de la paroi vasculaire, ce qui permet la stabilisation de la plaque d'athérome (Lee et al, 2000). Dans le cas d'une lésion vasculaire, la production de LPA permettrait donc de stimuler la réparation via une stimulation de la prolifération et de la migration, et des CML et des cellules endothéliales.

## 3 Effets du LPA sur l'expression génique – Approche protéomique

Pour analyser les effets d'une molécule, d'un stress, d'un contexte pathologique, etc ..., sur l'expression génique de cellules ou tissus, deux niveaux d'analyse sont possibles :

- **L'analyse au niveau de l'ARNm** (Acide ribonucléique messager) de la cellule, qui est la molécule intermédiaire entre le génome et les protéines. On définit le

**transcriptome** comme étant l'ensemble des ARNm présents dans une cellule ou tissu donnés, à un moment défini.

- **L'analyse au niveau des protéines**, les effecteurs de la réponse cellulaire. On définit le **protéome**, comme l'ensemble des protéines présentes dans une cellule ou tissu donné, à un moment défini, en tenant compte des modifications post-traductionnelles.

La description de ces 2 niveaux d'études nous permettra d'expliquer pourquoi, lors de ce travail, nous avons opté pour une étude protéomique et plus particulièrement pour une étude protéomique en gel 2D DIGE (Difference In Gel Electrophoresis) du sécrétome de cellules endothéliales stimulées au LPA.

### 3.1 Les approches transcriptomiques

Les techniques transcriptomiques se séparent en deux grandes classes, les approches dites avec *a priori* et les approches sans *a priori*.

#### 3.1.1 Les approches avec a priori :

Il s'agit de l'ensemble des techniques qui permettent d'analyser les variations d'abondance d'un ou de plusieurs transcrits connus et supposés être impliqués dans la problématique étudiée. Ces techniques permettent la vérification de différentes hypothèses de travail émises concernant la régulation d'un ou plusieurs transcrits. Les techniques avec *a priori* les plus couramment utilisées sont : le northern blot et la RT-PCR en temps réel (reverse transcription polymerase chain reaction).

#### 3.1.2 Les approches sans a priori :

Comme le nom l'indique, il s'agit de techniques qui permettent d'analyser les variations d'abondance pour l'ensemble des transcrits cellulaires sans aucun *a priori* dans une condition test (stress, condition pathologique, stimulation, ...) par rapport à une situation contrôle.

La technique sans *a priori* la plus couramment utilisée est celle des **damiers à ADN** qui permet de quantifier l'abondance de nombreux transcrits. Pour ce faire, l'ensemble des transcrits extraits, subit une transcription reverse en ADNc (*ADN complémentaire*). Cette étape permet également de marquer les ADNc (par exemple avec une sonde Cy). Les ADNc marqués ainsi produits, iront s'hybrider au niveau du damier sur des trappeurs spécifiques (Chaudhuri, 2005). C'est le cas des damiers commercialisés par la firme Affymetrix, disponibles pour l'homme, la souris, le rat, ... avec respectivement 47.000, 39.000 et 31.000 sondes de capture. Ce type de damier permet donc de faire une analyse de type « **all-transcriptome** » c'est-à-dire qui caractérise la nature et l'abondance de tous les ARNm présents lors de l'extraction. Signalons qu'à côté des damiers à haute densité, il existe également des damiers à basse densité présentant entre 200 et 1000 trappeurs, qui permettent une analyse ciblée d'un processus biologique donné. Ce type de damier rentre donc plutôt dans la catégorie des approches avec *a priori*. Au laboratoire, nous avons pu tester des damiers ciblés sur l'inflammation et l'apoptose en collaboration avec la firme EAT (Eppendorf Array Technology).

### **3.1.3 Avantages et inconvénients :**

Les approches transcriptomiques présentent plusieurs **avantages**. Tout d'abord, elles se prêtent bien à une analyse « all-transcriptome », même si les plateformes permettant ce type d'analyse restent coûteuses. Les différentes techniques d'analyse transcriptomiques possèdent une bonne sensibilité et permettent donc l'analyse des transcrits faiblement exprimés.

Mais les études transcriptomiques présentent différents **inconvénients**. La limitation majeure est qu'il n'existe pas nécessairement de corrélation entre l'abondance d'un transcrit et l'abondance de la protéine encodée, étant donné les nombreuses étapes de régulation qui modulent l'expression d'un gène de l'ARNm à la protéine. Elles ne permettent pas non plus d'aborder les modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, l'acétylation, la glycosylation, ... alors que ces modifications jouent souvent un rôle clef dans la régulation de nombreux processus cellulaires.

Si les approches transcriptomiques sont donc très puissantes pour étudier des variations dans les profils d'expression génique dans différentes conditions (stress, pathologies, ...), elles doivent être complétées par des approches ciblées sur les protéines. En effet, les protéines sont les macromolécules responsables du phénotype cellulaire. En outre, la protéomique aborde les **régulations post-traductionnelles** impliquées dans la modulation de l'activité des protéines dont les principales sont les modifications post-traductionnelles (environ 200 différentes recensées), la compartimentalisation, les interactions entre protéines et la protéolyse.

## **3.2 Les approches protéomiques**

Comme les approches transcriptomiques, les approches protéomiques sont subdivisées en deux grandes catégories :

### **3.2.1 Les approches avec a priori :**

Il s'agit de l'ensemble des techniques qui permettent d'analyser une ou plusieurs protéines connues et que l'on pense être impliquée(s) dans la problématique étudiée. Les techniques les plus couramment employées sont le **western blot**, le test **ELISA** (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) et l'**immuno-cytochimie**. Plus récemment, plusieurs firmes se sont lancées dans la production de **damiers à protéines**, les **damiers à protéines**. Il s'agit de lames de verre sur lesquelles sont fixés et organisés en « spots » des anticorps spécifiques. Le lysat total à analyser est récolté, préalablement marqué à l'aide d'une sonde fluorescente (cyanine) et incubé sur cette lame de verre. Les protéines se fixent au niveau de leur spot grâce à l'interaction spécifique entre l'anticorps et la protéine correspondante. Ensuite, la plaque de verre sera scannée avec un scanner confocal, comme les damiers à ADN, pour mesurer l'abondance relative de chaque protéine. Bien que le nombre d'anticorps disponibles ait considérablement augmenté ces dernières années, il s'agit en général de damiers à basse densité, ciblés sur une problématique donnée. De plus, la spécificité des anticorps reste parfois encore problématique (David et al, 2005).

### **3.2.2 Les approches sans a priori :**

Il s'agit de l'ensemble des techniques qui permettent l'analyse de l'abondance d'un grand nombre de protéines cellulaires et cela sans aucune hypothèse préalable. La technique la plus employée dans cette optique est celle des gels 2D, mais il existe également des approches protéomiques gels-indépendantes que nous évoquerons brièvement.

### 3.2.2.1 Les techniques gel-dépendantes :

#### 3.2.2.1.1 *La technique des gels 2D classique:*

L'analyse des protéines passe classiquement par une étape de séparation des protéines cellulaires ou tissulaires. La technique la plus classique exploite les gels d'électrophorèse bidimensionnels (ou gel 2D). Celle-ci est basée sur la séparation en deux étapes des protéines extraites. La première étape de séparation se fait selon le point isoélectrique (PI) des protéines par une migration dans un gel présentant un gradient de pH. La seconde étape de séparation, quant à elle, s'effectue selon le poids moléculaire des protéines au sein d'un gel d'acrylamide. Chaque protéine se retrouvera donc en principe à une position unique dans le gel, en fonction de son PI et de son poids moléculaire. Les protéines du gel seront ensuite révélées par différentes techniques de coloration : à l'argent, avec le bleu de Coomassie, avec le rouge de ruthénium, ...

L'analyse d'une réponse cellulaire par la technique classique des gels 2D, nécessite la réalisation d'une série de gels au départ de protéines extraites à partir de cellules contrôles et traitées. **L'analyse comparative** des gels via des logiciels adéquats, permet de repérer les spots présentant une variation d'intensité reflétant en principe un changement de l'abondance des protéines correspondant à ces spots dans la condition test. Ces protéines seront ensuite identifiées par spectrométrie de masse (Gorg et al, 2004 ; David et al, 2005).

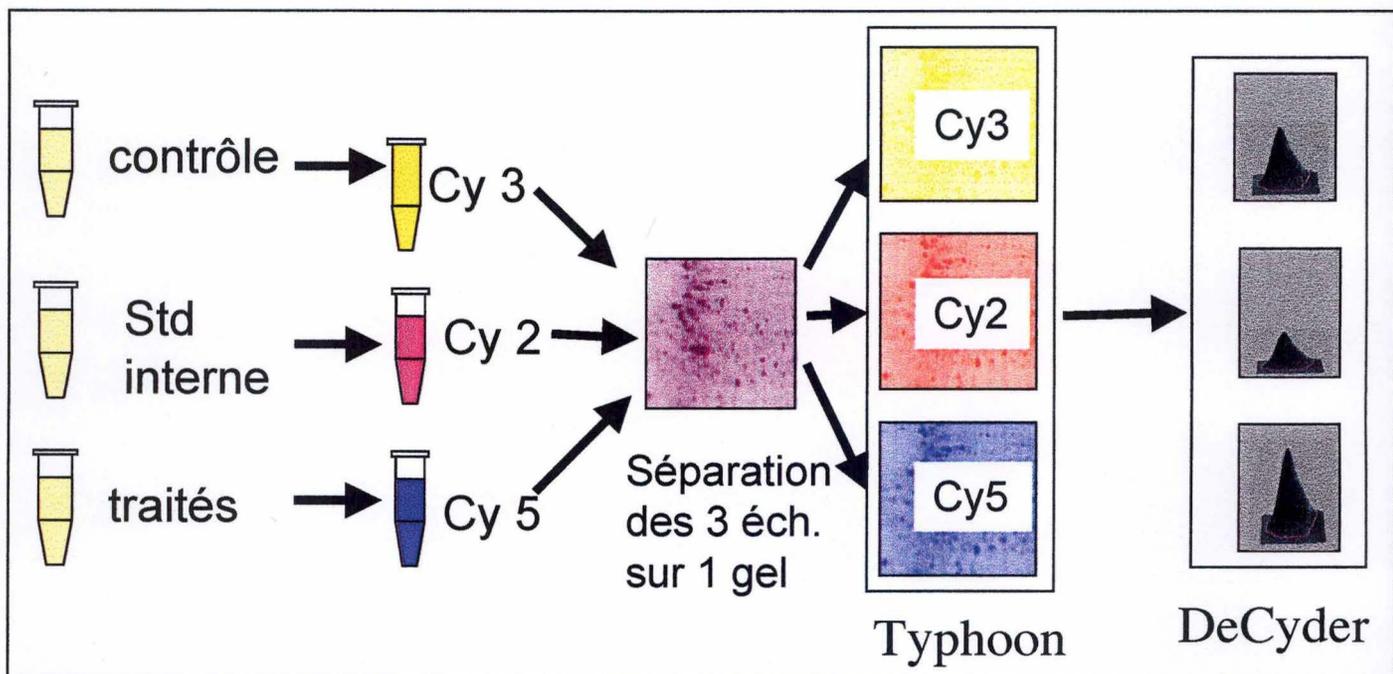
L'inconvénient majeur de la technique des gels 2D classiques est que pour avoir une information statistiquement valable, il faut réaliser un très grand nombre de gels, afin de s'assurer que la différence d'abondance observée pour un spot donné, est bien liée au traitement biologique et non à une variabilité technique importante entre les différents gels.

La technique présente également une **résolution limitée**. En effet, sur un gel, on retrouve en général entre 500 et 2.000 spots. Or, on estime qu'une cellule contient entre 6.000 et 10.000 protéines différentes. Le nombre élevé de protéines présentes dans l'échantillon initial, fait que certains spots peuvent comporter plus d'une protéine, ce qui rend l'analyse des gels encore plus ardue (Celis et Gromov, 1999 ; Gorg et al, 2004). Il est donc plus difficile de faire du « all-proteome », que du « all-transcriptome ».

Enfin certaines protéines ont des **propriétés physico-chimiques** qui rendent leur analyse difficile par la technique des gels 2D (Gorg et al, 2004):

- Les protéines de haut poids moléculaire ou fortement hydrophobes pénètrent difficilement dans le gel de 1<sup>ère</sup> dimension.
- Les protéines fortement acides ou basiques sont difficiles à révéler.
- Les protéines faiblement abondantes sont difficiles à détecter, étant donné des problèmes de linéarité ou de sensibilité des techniques de révélation classique des protéines. C'est le cas de plusieurs facteurs de transcription, de protéines régulatrices, telles que certaines kinases et phosphatases, ... qui malgré leur abondance réduite jouent souvent un rôle clef dans les processus biologiques étudiés.

L'approche par les gels 2D-DIGE développée plus récemment, répond à certaines de ces limitations.



**Figure I.10:** Principe de la technique du gel 2D-DIGE. Cy : Cyanine.

### 3.2.2.1.2 Les gels 2D-DIGE (*Difference In gel Electrophoresis*) :

La technique des gels 2D-DIGE a été développée pour résoudre les problèmes liés aux variations observées entre gels. Celles-ci sont dues principalement à la différence de pénétration dans le gel de 1<sup>ère</sup> dimension, au transfert entre la 1<sup>ère</sup> dimension et la 2<sup>ème</sup> dimension et aux hétérogénéités locales au sein des gels. Pour éliminer ces variations techniques inter-gels, la solution la plus simple est de faire migrer les échantillons test et contrôle au sein d'un même gel. De cette manière, ils subiront de la même manière les éventuels artefacts techniques (Figure I.10) (Van den Berg et Arckens, 2004 ; Gorg et al, 2004).

En pratique, pour avoir une information statistiquement valable, 3 gels correspondant à 3 expériences indépendantes sont réalisés. Chacun de ces gels contient 3 échantillons : l'échantillon « **test** » et l'échantillon « **contrôle** » marqués respectivement à l'aide des cyanines (Cy) 3 et 5, et le **standard interne** marqué à l'aide de la Cy 2 (Figure I.10). Un même gel produira donc 3 images comme illustré à la Figure I.10. Le standard interne est un mélange en égale proportion de l'ensemble des conditions présentes dans les différents gels à comparer. Il est extrêmement important, car il servira de référence interne à chaque gel et permettra ainsi de normaliser les différents gels entre eux afin de minimiser les variations techniques. L'analyse de 3 gels indépendants réalisés dans ces conditions, permet de mettre en évidence de manière statistiquement fiable, des variations d'abondance, même de l'ordre de 10 %.

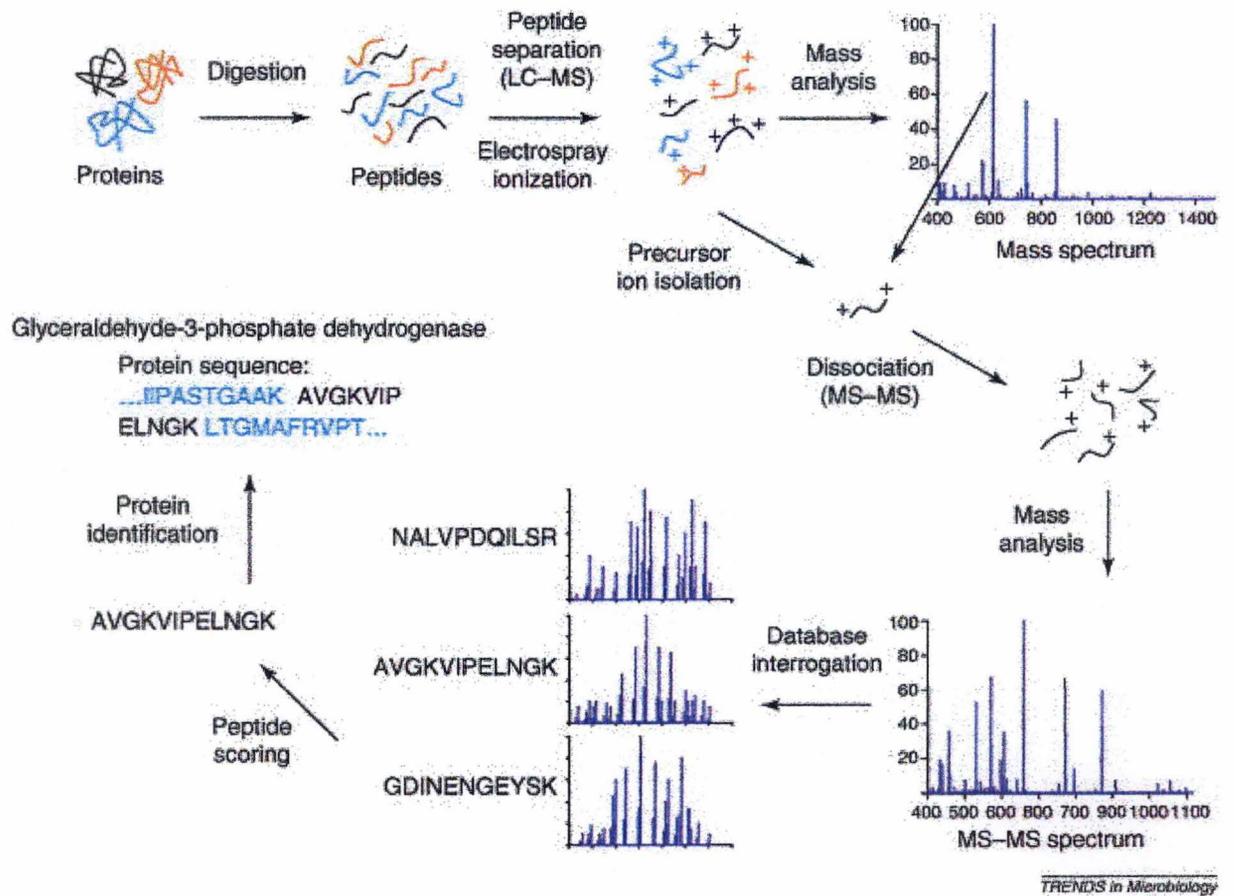
L'approche 2D-DIGE présente une différence majeure par rapport aux techniques classiques, les protéines extraites étant marquées avec une sonde fluorescente, avant la migration. Elle nécessite également un scanner en fluorescence. Enfin, les sondes fluorescentes Cy permettent également d'améliorer la sensibilité et/ou la linéarité de la détection, en comparaison des colorations classiques (avec le bleu de Coomassie ou à l'argent).

### 3.2.2.1.3 *Identification des protéines par spectrométrie de masse*

La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique complémentaire des approches protéomiques, qu'elles soient gel-dépendantes ou gel-indépendantes. Le spectromètre de masse peut être décrit comme un analyseur extrêmement sensible et précis, qui détermine le rapport entre la masse et la charge ( $m/z$ ) des ions qu'il analyse.

Dans le cas des gels 2D, la MS va permettre l'**identification des protéines** contenues au sein des spots variant de manière significative. Pour pouvoir effectuer celle-ci, la zone du gel contenant la protéine d'intérêt est découpée et la protéine extraite de celle-ci. Cette dernière après dénaturation, va subir une **digestion enzymatique**. C'est la trypsine qui est classiquement employée et c'est donc les peptides obtenus qui seront analysés en spectrométrie de masse.

Pour que le spectromètre de masse puisse mesurer le rapport  $m/z$  des différents peptides issus de la digestion enzymatique, ceux-ci vont être mis sous forme d'ions en phase gazeuse. Les deux principales techniques d'ionisation employées sont l'**ESI** (electrospray ionization) et le **MALDI** (matrix assisted laser desorption ionization). Lors de l'ESI, les peptides sont incubés dans un solvant acide (chargeant positivement les peptides) qui en s'évaporant progressivement, donne un ensemble de peptides multichargés sous forme gazeuse. Le MALDI, quant à lui, permet la mise sous forme gazeuse des peptides chargés après leur désorption provoquée par un rayon laser frappant une matrice photo-réactive préalablement co-cristallisée avec les différents peptides.



**Figure I.11:** Principe de l'identification d'une protéine par peptide sequencing à l'aide de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). (d'après Kolker et al, 2006).

Il y a 2 approches majeures permettant l'identification des protéines sur base des peptides obtenus après trypsinisation.

La première se base sur l'établissement d'une carte peptidique reprenant le rapport  $m/z$  de l'ensemble des peptides issus de la digestion enzymatique de la protéine à identifier, appelée « **peptide mass fingerprint** ». La taille des peptides obtenus est définie par l'enzyme utilisée (en général la trypsine), ce qui permet d'établir des cartes peptidiques théoriques au départ de la séquence primaire des protéines. C'est la comparaison entre la carte peptidique obtenue par MS suite à la digestion enzymatique de la protéine inconnue et les cartes peptidiques disponibles en banques de données reprenant l'ensemble des cartes peptidiques théoriques, qui permet l'identification de la protéine. Pour faire ce type d'analyse, on utilise généralement un spectromètre avec un seul analyseur tel que les spectromètres **MALDI-TOF**, équipés d'un analyseur de type TOF (time of flight ou en temps de vol). L'analyseur de type TOF mesure pour chaque ion le temps requis pour traverser la longueur du tube de vol et arriver au détecteur, ce temps variant en fonction du rapport  $m/z$ . La MALDI-MS constitue une approche analytique relativement simple, rapide, avec une excellente précision des masses et avec possibilité de débit intéressant (analyse de 96 échantillons à la fois). Par contre ce type de MS ne permet pas l'analyse d'échantillons complexes.

Il arrive que cette première approche n'aboutisse pas à l'identification des protéines. On passe alors à de la MS en tandem avec 2 analyseurs, en vue de **séquencer 1 ou plusieurs peptides de la protéine à identifier** (Figure I.11). Pour ce type d'analyse, différents instruments sont disponibles, dont les spectromètres assez courants de type **Q-TOF**, utilisant une ionisation par électrospray (ou ESI). Ce type de spectromètre de masse combine un analyseur de type quadropôle (Q) et un analyseur en temps de vol (TOF) en tandem, avec une chambre de collision entre ces 2 analyseurs, pour induire la fragmentation des peptides. Le mélange des peptides chargés à analyser est d'abord séparé selon les rapports  $m/z$  dans le quadropôle en vue d'établir une liste des pics peptidiques les plus intenses. L'analyseur Q comporte deux couples anode-cathode dont le champ électrique produit ne laisse passer que les ions ayant un rapport  $m/z$  particulier. En modifiant les propriétés du courant électrique parcourant les couples anode-cathode, on peut scanner l'ensemble des valeurs  $m/z$  pour obtenir la carte peptidique (Domon et Aebersold, 2006). L'instrument est donc ajusté de telle manière que seule une espèce peptidique parentale est envoyée dans la chambre de collision pour générer des ions-filles par fragmentation préférentielle des liens peptidiques par un bombardement au gaz neutre. On génère ainsi une « échelle » (ladder) de fragments différant entre eux par la masse d'un seul acide aminé. Les fragments-filles sont séparés dans l'analyseur TOF selon leur rapport  $m/z$  et la séquence du peptide est déduite à partir des masses obtenues pour les différents fragments. Il suffit alors de comparer la séquence obtenue avec les séquences disponibles en banques de données pour identifier la protéine inconnue (Kolker et al, 2006).

#### 3.2.2.1.4 Gels 2D et subprotéomique :

Comme déjà signalé précédemment, les approches protéomiques gel-dépendantes se heurtent à un problème majeur de résolution. En effet, on ne parvient à révéler par gel qu'entre 600 et 2000 spots, alors que le nombre total de protéines cellulaires avoisinerait les 6.000-10.000. C'est pour cette raison qu'on se tourne de plus en plus vers la subprotéomique. Celle-ci contrairement à l'approche protéomique ne s'intéresse plus à l'ensemble du protéome d'un type cellulaire ou d'un tissu, mais seulement à une fraction de celui-ci. Ce type d'approche permet donc de réduire le nombre de protéines que l'on charge au niveau du gel, ce qui

améliore la **résolution** de celui-ci en diminuant le risque de rencontrer plus d'une protéine au sein d'un même spot. Mais la réduction de la complexité de l'extrait va également permettre son **enrichissement** en protéines moins abondantes et donc faciliter leur détection et leur prise en compte dans l'analyse. Rappelons qu'au sein d'une cellule, la variation d'abondance entre protéines pourrait atteindre jusqu'à 10 ordres de grandeur (Ahmed et Rice, 2005; Stasyk et Huber, 2004).

Il existe différentes manières de fractionner le protéome et nous allons en décrire rapidement quelques-unes parmi les plus utilisées.

Le **fractionnement subcellulaire** est une approche couramment utilisée qui permet d'analyser un seul compartiment cellulaire. Pour cela, après rupture de l'organisation cellulaire (homogénéisation), les différents compartiments cellulaires (mitochondries, membrane, lysosomes, noyau, ...) sont séparés, généralement par ultracentrifugation avant que les protéines de la fraction d'intérêt ne soient récupérées (Huber et al, 2003).

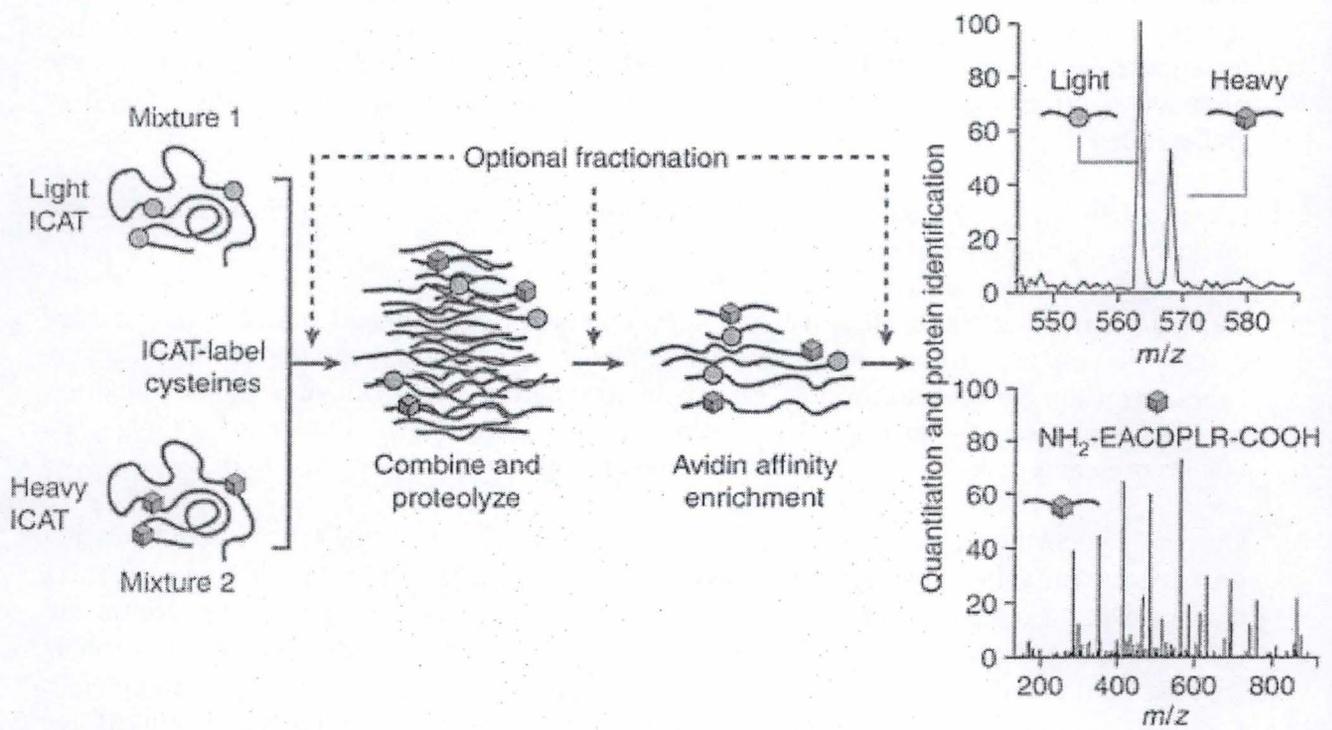
On peut également se focaliser sur les protéines ayant subi un même type de **modification post-traductionnelle** (glycosylation, phosphorylation, ...). Par exemple, au laboratoire une technique permettant d'isoler les protéines phosphorylées a été mise au point récemment. Celle-ci est basée sur l'interaction entre les groupements phosphate des phosphoprotéines et les ions  $Fe^{3+}$  retenus sur une colonne IMAC (immobilized metal affinity chromatography). Les protéines glycosylées peuvent quant à elle, être retenues à l'aide d'une colonne d'affinité utilisant des lectines.

Les protéines peuvent également être séparé selon certaines de leurs propriétés physico-chimiques, telles que leur taille, leur PI, ... L'une des approches les plus simples à « zoomer » sur une gamme de PI étroite lors de la séparation en 1<sup>ère</sup> dimension, en choisissant une gamme de pH étroite.

Enfin, de nombreux chercheurs s'intéressent également au **sécrétome**, c. à d. à l'ensemble des protéines sécrétées par un type cellulaire donné, car il s'avère que les protéines sécrétées sont souvent finement régulées et sujettes à des modifications post-traductionnelles (telles que glycosylations, clivages protéolytiques, ...), en particulier dans des cellules stimulées ou stressées. Dans ce mémoire, nous nous intéresserons aux effets du LPA sur le sécrétome de cellules endothéliales en culture. Mais avant d'arriver aux objectifs de ce mémoire, nous allons évoquer rapidement les approches protéomiques gel-indépendantes.

### 3.2.2.2 Les techniques gel-indépendantes :

Dans ce travail, nous avons utilisé l'approche 2D-DIGE, une approche gel-dépendante. Mais il existe des alternatives à l'électrophorèse, avec des **approches protéomiques gel-indépendantes**. Elles dépassent le cadre de ce travail, mais nous allons néanmoins brièvement décrire quelques approches protéomiques de ce type, en guise d'illustration. Parmi les approches les plus prometteuses nous signalerons les approches MudPIT (multidimensional protein identification technology) et la technique ICAT (isotope-coded affinity tag).



**Figure I.12:** Principe protéomique quantitative via la technique ICAT (isotope coded affinity tag) (d'après Shio et Aeberold, 2006).

### La technologie MudPIT:

Contrairement aux approches gel-dépendantes, les approches de ce type convertissent le mélange de protéines initial (par exemple le lysat cellulaire), en peptides (par exemple par digestion à la trypsine). Ces peptides sont alors séparés par diverses techniques, souvent multidimensionnelles, avant d'être analysés par **spectrométrie de masse**. Les méthodes séparant les peptides sont par exemple la chromatographie, l'électrophorèse capillaire,... combinées ou non. Par exemple, les peptides issus d'une digestion trypsique peuvent être séparés selon 2 critères au moyen d'une colonne échangeuse de cation (SCX) et d'une colonne de phase inverse mises en série. Les peptides élués seront ensuite directement séparés et identifiés par spectrométrie de masse (Morris et Wilson, 2004 ; David et al, 2005). L'avantage majeur est que les protéines réfractaires à l'électrophorèse en gels 2D (tailles, hydrophobicité,...) ne sont plus exclues. Il s'agit d'approches extrêmement sensibles qui permettent de révéler la présence ou l'absence d'une protéine au sein d'un échantillon protéique et qui convient donc particulièrement pour faire du « profiling » c. à d. déterminer quelles sont les (toutes) protéines présentes dans le mélange initial. L'inconvénient majeur est la lourdeur des données à traiter, puisque même les protéines « inintéressantes » sont analysées. De plus, ces approches ne sont pas quantitatives.

### La technique ICAT:

En général, l'intensité d'un ion peptidique mesuré en MS, ne reflète pas de manière précise l'abondance du peptide. Pour contourner cette difficulté, on doit passer par un marquage des peptides via des isotopes : des peptides de nature chimique identique, mais différant en masse à cause de différences dans la composition isotopique, sont supposés produire un signal identique en MS. La technique ICAT exploite ce principe (Figure I.12). Le réactif employé pour cette technique, est un dérivé de la biotine, deutéré (version lourde) ou non (version légère), marquant les peptides en réagissant avec leur cystéine. Les protéines de 2 échantillons à comparer sont respectivement marquées avec le réactif lourd et léger. Les 2 préparations sont combinées, soumises à une digestion enzymatique et le mélange de peptides obtenus, enrichi par une chromatographie d'affinité avec de l'avidine. On réalise enfin l'analyse du mélange des peptides en LC (chromatographie liquide)-MS/MS. À chaque peptide contenant une cystéine, correspondent 2 signaux avec une différence de masse correspondant à la différence de masse entre le réactif ICAT lourd et léger. Le séquençage de ces peptides permet d'identifier la protéine dont ils proviennent (Figure I.12). Le rapport entre ces 2 signaux reflètera l'abondance relative de cette protéine dans les 2 échantillons comparés. On ne peut donc que détecter les protéines possédant une cystéine, soit environ 85-90 % du protéome (Morris et Wilson, 2004 ; David et al, 2005). D'autres isotopes ont d'ailleurs été exploités, tel le  $^{15}\text{N}$ .

Le principal avantage de ces deux techniques comparées à celle des gels 2D est qu'elles permettent l'analyse de l'ensemble des protéines cellulaires, et cela quelles que soient leurs propriétés physico-chimiques (PI, taille, hydrophobicité...). Cependant, ce sont des approches lourdes et plus difficiles à réaliser en routine, comparées à l'approche 2D-DIGE.

## 4 Objectif du mémoire

Le LPA est un médiateur lipidique bioactif présent en concentrations anormalement élevées au niveau des parois artérielles, lors de la formation des plaques athéromateuses. Son étude est cruciale car une compréhension plus fine des mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose, peut amener à la découverte de nouvelles cibles pharmaceutiques. C'est pourquoi, ce mémoire qui s'inscrit dans le travail de thèse de C. Gustin, s'intéresse aux effets du LPA sur un des acteurs cellulaires fondamentaux de cette pathologie, les cellules endothéliales. En effet, le dysfonctionnement de l'endothélium est à l'origine d'une pénétration accrue de LDL au niveau de l'intima artérielle ainsi que du recrutement de différents effecteurs nécessaires à l'établissement de la pathologie. Dans ce travail, deux niveaux d'études de l'effet du LPA au niveau des cellule endothéliale seront abordés.

Nous étudierons tout d'abord les effets du LPA **au niveau cellulaire**. Nous vérifierons les effets du LPA sur la capacité proliférative et migratrice des cellules endothéliales, et ce via un test *in vitro* de réparation à une blessure induite. Différentes concentrations en LPA seront testées, car dans la littérature les concentrations en LPA utilisées couvrent une très large gamme.

Nous compléterons cette étude, par une **approche biochimique, de type subprotéomique**, qui consistera à étudier les effets du LPA sur la sécrétion des cellules endothéliales. Nous comparerons donc le **secrétome** de cellules traitées ou non avec du LPA. La cellule endothéliale est une cellule sécrétrice et les modifications de son secrétome pourraient avoir une importance capitale dans le développement et le maintien de l'athérosclérose. En effet, les protéines sécrétées interviennent dans de nombreux processus telle que la chémoattraction des différents effecteurs de l'athérosclérose (monocytes/macrophages, lymphocytes, CML,...), la réponse anti-inflammatoire, la modification du milieu extracellulaire (protéases, constituants de la MEC,...) et peuvent modifier profondément l'équilibre pro-/anti-thrombotique.

Pour augmenter la résolution du secrétome, nous réaliserons des gels analytiques sur 2 gammes différentes de pH, 4-7 et 7-11. C'est pour les gels 4-11 que les résultats obtenus se sont révélés les plus prometteurs et que nous avons mis en évidence plusieurs spots présentant des variations d'abondance significative entre cellules contrôles et cellules traitées au LPA. Nous avons donc entrepris des gels préparatifs pour pouvoir identifier les protéines correspondant à ces spots. 2 protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse : la pentraxine-3 et la stanniocalcine-2. Enfin pour terminer le mémoire, nous avons essayé de voir quelle était la relevance physiologique de ces 2 protéines, dans le contexte de ce travail, et nous avons réalisé une analyse des promoteurs des gènes les encodant.

## II. MATERIELS ET METHODES

Milieu	Composition
Milieu de base	DMEM à 4500 mg/ml de glucose (DHG) ( <i>Gibco, Royaume-Uni</i> ) + Antibiotiques : Pénicilline 0,5 µg/ml et Streptomycine 50 µg/ml ( <i>Gibco, Royaume-Uni</i> )
Milieu de culture	DMEM à 4500 mg/ml de glucose (DHG) ( <i>Gibco, Royaume-Uni</i> ) + Antibiotiques : Pénicilline 0,5 µg/ml et Streptomycine 50 µg/ml ( <i>Gibco, Royaume-Uni</i> ) + 10 % Sérum de veau fœtal (FBS) ( <i>Gibco, Royaume-Uni</i> )
Milieu de stimulation	DMEM à 4500 mg/ml de glucose (DHG) ( <i>Gibco, Royaume-Uni</i> ) + Antibiotiques : Pénicilline 0,5 µg/ml et Streptomycine 50 µg/ml ( <i>Gibco, Royaume-Uni</i> ) + 0,1 % d'albumine bovine sans acide gras (BSA Fatty acid free FAF) ( <i>Sigma Aldrich, Allemagne</i> )

**Tableau II.1** : Composition des différents milieux utilisés pour la culture des cellules endothéliales EAhy926.

# 1 Culture cellulaire

Nous utilisons comme modèle cellulaire les cellules endothéliales humaines EAhy926. Il s'agit d'une lignée de cellules endothéliales issue de la fusion entre des cellules endothéliales de cordons ombilicaux humains (HUVEC) et des cellules d'un carcinome du poumon (A549), gracieusement fournies par le *Dr Cora-Jean Edgell* (Université de Caroline du Nord).

## Matériel :

- Cellules endothéliales EAhy926
- milieux de culture (voir tableau II.1)
- Boîtes de culture stériles de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, USA) = T75
- Tubes de 10 ml
- Hotte à flux laminaire
- Pipettes stériles de 2, 5, 10 et 25 ml (Sarstedt, Allemagne)
- Trypsine (0,05%) EDTA (0,53mM)
- Tampon Phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (PBS)
- Etuve à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub> (Jouan, France)
- Sérum (Gibco, Royaume-Uni)
- Centrifugeuse (Heraeus, Allemagne)

## 1.1 Repiquage cellulaire

Les cellules EAhy926 sont cultivées en boîte de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75) dans du milieu de culture (voir tableau II.1) dont le sérum permet la stimulation de la prolifération cellulaire. Le repiquage des cellules s'effectue sous une hotte à flux laminaire lorsque celles-ci ont atteint la confluence. Après un rinçage avec du PBS, les cellules EAhy926, qui sont des cellules adhérentes, sont mises en suspension à l'aide d'1 ml de trypsine-EDTA. L'inactivation de celle-ci s'effectue par l'ajout de 9 ml de milieu de culture; les 10 ml sont ensuite récupérés et centrifugés 10 minutes à 1000 rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans le milieu de culture, une proportion de cette suspension est ensuite ajoutée à une T75 contenant déjà du milieu de culture pour obtenir un volume final de 15 ml. Les T75 sont ensuite replacées dans l'étuve à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

## 1.2 Congélation des cellules EAhy926.

Les cellules à confluence sont rincées, trypsinisées et recueillies dans 9 ml de milieu de culture (voir tableau II.1). Ensuite, elles sont centrifugées 10 minutes à 1.000 rpm (centrifugeuse Heraeus, Allemagne). Le culot est resuspendu dans 1 ml de DHG avec 20 % de sérum et 10 % de DMSO. Chaque millilitre est transvasé dans un cryotube placé dans un système de refroidissement et placé pour la nuit à -70°C. Il sera ensuite placé dans l'azote liquide (-196°C).

## 1.3 Décongélation des cellules EAhy926.

Le cryotube est récupéré dans la cuve d'azote liquide et plongé dans de l'eau à 37°C. Ensuite, les cellules sont transvasées dans un T75 contenant 15 ml de milieu de culture (voir tableau II.1). Le DMSO présent dans le cryotube étant toxique, le milieu sera changé dès que les cellules deviennent adhérentes.

## 2 Test de la blessure

La capacité de l'acide lysophosphatidique (LPA) à stimuler la réparation tissulaire est mesurée par l'observation de la vitesse de recolonisation d'une zone lésée du tapis cellulaire au cours du temps. Le milieu de stimulation contient de l'albumine sérique bovine sans acide gras (*fatty acid free BSA*), car celle-ci est nécessaire à la biodisponibilité du LPA au niveau des cellules.

### Matériels :

- Boite de pétri de 35 mm (Corning, USA)
- acide lysophosphatidique-L- $\alpha$ -oléoyl (LPA 18:1) (Sigma Aldrich, Allemagne)
- Milieu de stimulation (voir tableau III.1).
- Tips (Sarstedt, Allemagne)
- Falcon (Sarstedt, Allemagne)
- Tube de 10 ml (Sarstedt, Allemagne)
- Microscope (Leitz, Allemagne)
- Camera DC100 (Leica, Allemagne).

### Méthode :

Les cellules sont repiquées à une densité d'un million de cellules par boîte de pétri. Une fois qu'elles adhèrent, elles sont mises au repos pour la nuit dans du milieu de base (voir tableau II.1). Le lendemain matin, à l'aide d'un tips, le tapis cellulaire est blessé et l'ancien milieu remplacé par du milieu de stimulation (voir tableau II.1) contenant le LPA. Pour suivre la recolonisation, une micrographie de la zone lésée sera prise toutes les deux heures par la caméra Leica montée sur un microscope équipé de contraste de phase, avec un objectif 6,3 X.

## 3 Mesure du potentiel prolifératif

L'iodure de propidium est un agent intercalant des structures doubles brins des acides nucléiques. Lors de sa fixation à l'ADN, il subit une modification de ses propriétés spectrales, avec une longueur d'onde d'absorption de 535 nm et d'émission de 617 nm. Le test de prolifération est basé sur le fait qu'une augmentation de la quantité de matériel nucléaire est corrélée à une augmentation de l'abondance cellulaire.

### Matériels :

- Plaque 24 puits (Costar, USA)
- acide lysophosphatidique-L- $\alpha$ -oléoyl (LPA 18:1) (Sigma Aldrich, Allemagne)
- Milieu de stimulation (Gibco, Royaume-Uni).
- Fluoroskan Ascent (Thermo electron corporation, USA)
- Iodure de propidium (Sigma Aldrich, Allemagne)
- Ethanol absolu (Merck, USA)
- Tampon Phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (PBS)

### Méthode :

Les cellules sont repiquées en plaque 24 puits à 50.000 cellules par puits dans du milieu de culture (voir tableau II. 1). Une fois qu'elles ont adhéré, les cellules sont mises au repos pour la nuit dans du milieu de base (voir tableau II.1). Le lendemain matin, les cellules sont stimulées en remplaçant l'ancien milieu par le milieu de stimulation (voir tableau II.1) contenant du LPA à la concentration requise. Lorsque la stimulation est terminée, le milieu de stimulation est remplacé par 500  $\mu$ l d'éthanol absolu pendant 30 minutes à température ambiante (RT, Room temperature) permettant la fixation et la perméabilisation cellulaire. Les

cellules sont ensuite rincées au PBS et incubées 30 minutes dans 500 µl d'une solution d'iodure de propidium (10 µg/ml). Ensuite la plaque est lue au Fluoroskan à une longueur d'onde d'excitation de 535 nm et d'émission de 612 nm.

## 4 Analyse du sécrétome par la technique des gels 2D

La technique des gels 2D permet une analyse sans a priori de la variation d'abondance entre différentes conditions d'un grand nombre de protéines. Pour cela les protéines sont séparées selon 2 critères; premièrement leur point isoélectrique (migration en 1<sup>ère</sup> dimension) et deuxièmement leur poids moléculaire (migration en 2<sup>ème</sup> dimension). Ainsi, théoriquement, chaque protéine se retrouvera isolée à une position unique dans le gel appelée spot. Les différents spots sont ensuite révélés par différentes techniques de coloration, nous permettant d'analyser la variation d'abondance de chaque protéine entre les conditions analysées.

La subprotéomique ne s'intéresse qu'à une partie du protéome cellulaire. Par exemple, dans ce mémoire, notre intérêt se portera sur les protéines sécrétées. Cette approche permet un enrichissement de l'échantillon à analyser grâce à un nombre plus réduit de protéines, ce qui facilite la détection des protéines moins abondantes et diminue le risque d'obtenir plus d'une protéine par spots.

### 4.1 Traitement des protéines sécrétées (sécrétome)

Le but est d'analyser la variation d'abondance des protéines sécrétées par les cellules endothéliales EAhy926 stimulées ou non par du LPA (25 µM). Afin d'obtenir un extrait protéique compatible avec les gels 2D, plusieurs étapes sont nécessaires.

#### a) Stimulation des cellules et récolte des surnageants.

##### Matériels :

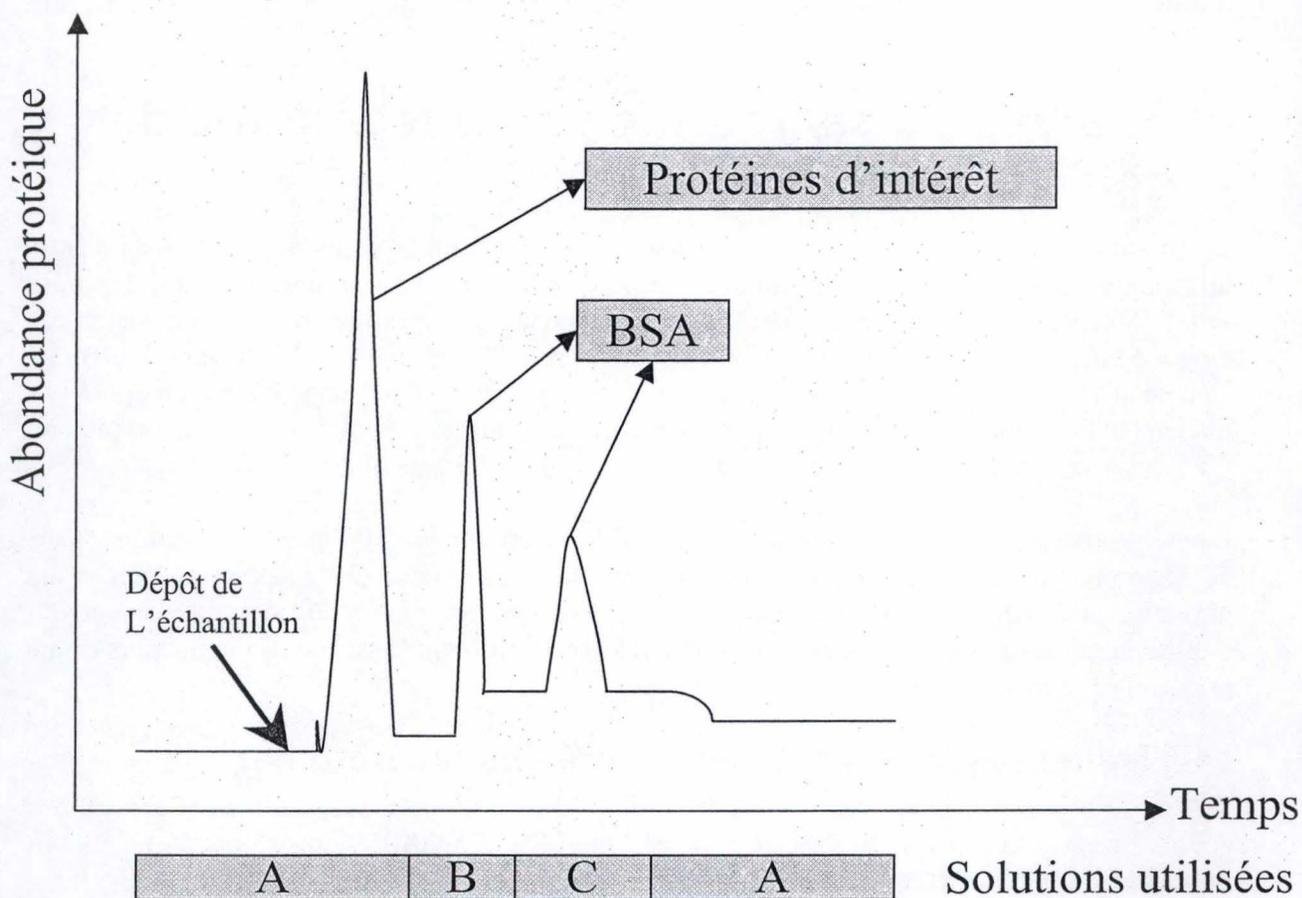
- Boîtes de culture stériles de 75 cm<sup>2</sup> (Costar, USA)
- Acide lysophosphatidique-L- $\alpha$ -oléoyl (LPA 18:1) (Sigma Aldrich, Allemagne)
- Pipettes stériles de 2, 5, 10 et 25 ml (Sarstedt, Allemagne)

##### Méthode :

Les cellules EAhy926 sont rincées une fois avec 6 ml de milieu de stimulation (voir tableau II.1) pour ôter toute trace de sérum qui pourrait contenir du LPA. Les cellules sont ensuite mises au repos 1 heure dans 6 ml de milieu de stimulation avant d'être stimulées ou non avec du LPA 25 µM. Comme dit précédemment, la présence de la BSA FAF dans le milieu de stimulation est essentielle car celle-ci intervient dans la biodisponibilité du LPA au niveau des cellules. Lorsque la stimulation est terminée les surnageants sont récupérés et congelés à - 80 °C.

#### b) Élimination de la BSA :

La BSA (*Bovine Serum Albumin*) du milieu de stimulation doit être éliminée, car très abondante, elle masquerait les protéines faiblement exprimées. Pour éliminer celle-ci, les



**Figure II.1** : Schéma représentant l'allure de la courbe d'absorbance enregistrée par le détecteur à la sortie de la colonne d'affinité pour la BSA suite au dépôt de 2 ml de surnageant. A : PBS ; B : Acide formique 1 % ; C : Tris HCl 0,5 M

surnageants récoltés seront donc passés sur une colonne d'affinité pour la BSA. L'albumine du surnageant sera retenue par les IgG (*Immunoglobuline G*) anti-BSA de la colonne tandis que le reste des protéines sera élué et récolté.

Matériels :

- Colonne d'affinité anti-BSA
- Pompe
- Détecteur (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Enregistreur (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Tube de 10 ml (Sarsted, Allemagne)
- Tris HCl (Merck, USA)
- Acide formique 99 % (Acros, Belgium)
- Tampon Phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (PBS)

Méthode :

Pour nettoyer et tamponner la colonne d'affinité, celle-ci est lavée avec 2 volumes de tampon PBS. Ensuite, 2 ml du surnageant de cellules stimulées sont déposés sur la colonne. Un détecteur couplé à la colonne permettra de détecter la présence des protéines dans l'éluat. Nous récolterons l'éluât correspondant au premier pic protéique (voir Figure II.1) correspondant aux protéines non fixées. Ensuite, la BSA sera décrochée de la colonne par un lavage avec 2 volumes d'acide formique 1 %, ce dernier sera ensuite neutralisé par un lavage de la colonne avec du Tris HCl 0,5 M. Un pic d'éluat de BSA sera observable à chacun des lavages (voir Figure II.1). La colonne est ensuite lavée avec 2 volumes de PBS pour éliminer le Tris HCl 0,5 M avant d'effectuer un nouveau dépôt de surnageant.

**c) Concentration des protéines :**

Le protocole de précipitation employé ne peut se réaliser que pour un volume inférieur à 100 µl. C'est pourquoi, l'éluat récolté sera concentré au moyen d'une colonne de concentration.

Matériels :

- Colonne de concentration retenant les protéines de plus de 5000 Da (Millipore, USA)
- Centrifugeuse (Heraeus, Allemagne)
- Tubes Eppendorf (Sarstedt, Allemagne)

Méthode :

Les fractions récoltées sont centrifugées à 4.000 rpm à 4°C dans des colonnes de concentration qui retiennent les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 5000 Da. La centrifugation se poursuit jusqu'à ce que le volume contenant les protéines soit inférieur à 100 µl. Le tout est ensuite récolté dans un eppendorf et congelé à -80°C.

**DO échantillon** = DO moyenne échantillon – DO moyenne blanc (tampon de lyse)  
**DO étalon (5 µg)** = DO moyenne étalon – DO moyenne blanc (eau)

$$\text{Concentration échantillon } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{(5 / \text{DO étalon}) \times \text{DO échantillon}}{\text{Volume de l'échantillon}}$$

**Figure II.2:** Formule permettant de déterminer la concentration protéique d'un échantillon au départ de son absorbance et de celle de 5 µg de BSA.

#### **d) Précipitation des protéines :**

Les protéines seront précipitées afin d'éliminer toute trace du milieu de culture et concentrer les protéines dans un tampon compatible avec les gel 2D, le Dige Labelling Buffer (*DLA*).

##### Matériels :

- Kit de "clean up" (*GE Healthcare, Grande-Bretagne*)
- Tubes Eppendorf (*Sarsted, Allemagne*)
- Agitateur (*Eppendorf, Allemagne*)
- Centrifugeuse (*Eppendorf, Allemagne*)
- Sonicateur (*Brason, USA*)

##### Méthode :

Suite à l'ajout de 300 µl de solution de précipitation à l'extrait protéique, celui-ci est vortexé et incubé 15 minutes sur glace. L'incubation terminée, 300 µl de solution de co-précipitation sont rajoutés et le tout est vortexé et centrifugé à 4 °C pendant 5 minutes à 13.000 rpm. Le surnageant est décanté et 40 µl de solution de co-précipitation sont déposés sur le culot. Après une incubation de 5 minutes sur glace, le mélange est centrifugé à 4 °C pendant 5 minutes à 13.000 rpm et le surnageant est décanté. Le culot est ressuspendu dans 25 µl d'eau distillée auquel sont ajoutés 1 ml de tampon de lavage préalablement incubé 1 heure à -20°C et 5 µl de « Wash additive » ; le tout est vortexé et incubé pendant minimum 2 heures à -20 °C. La solution est centrifugée à 4 °C pendant 5 minutes à 13.000 rpm, le surnageant est décanté et le culot resuspendu dans du *DLA*. Pour faciliter la resolubilisation, le mélange est agité à 4 °C 15 minutes à 1.100 rpm et soniqué 5 minutes. Ensuite, une centrifugation de 15 minutes à 13.000 rpm est effectuée pour éliminer les déchets restants et le surnageant est récupéré et congelé à -80 °C.

#### **e) Dosage protéique par la méthode du Bradford :**

Le Bradford est une technique de dosage protéique basé sur le « shift » d'absorbance du bleu de Coomassie brillant de 465 à 595 nm. Cette modification d'absorbance se produit lors de son interaction avec des résidus basiques ou aromatiques, principalement l'arginine. La concentration protéique des échantillons sera déduite au moyen de l'absorbance mesurée pour 5 µg de BSA (voir Figure II.2).

##### Matériels :

- Spectrophotomètre (*Bio-rad, USA*)
- BSA (*Bio-rad, USA*)
- Solution stock concentrée 5X de Bradford (*Bio-rad, USA*)

##### Méthode :

Un volume x de chaque échantillon est ajouté à 1 ml de solution de Bradford stock dilué 5 X. Après 5 minutes de réaction, l'absorbance de la solution est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Chaque mesure est effectuée en double.

<b>Tampon de réhydratation (stock)</b>		
Urée	7 M	
Thiourée	2 M	
CHAPS	2 %	

<b>Tampon de réhydratation (500 µl)</b>		
Solution stock	500 µl	
DTT	1,4 mg	
IPG	2,5 µl	

<b>Lysis Buffer (2X)</b>	<b>4-7/3-7</b>	<b>7-11</b>
Urée	7 M	7 M
Thiourée	2 M	2 M
CHAPS	2 %	4 %
IPG	2 %	2 %
DTT	2 %	40 mM

<b>Programme de migration 1<sup>ère</sup> D</b>	<b>4-7/3-7</b>	<b>7-11</b>
300 V	1 h	1 h
1000 V (gradient)	8 h	8 h
8000 V (gradient)	3 h	3 h
8000 V	50.000 V/h	60.000 V/h

**Tableau II.2** : Composition des solutions nécessaires à la migration en 1<sup>ère</sup> dimension et programmes de migration en 1<sup>ère</sup>D en fonction du type de gel.

## 4.2GEL 2D

### 4.2.1 Migration en 1<sup>ère</sup> dimension :

La migration en 1<sup>ère</sup> dimension permet la séparation des protéines selon leur point isoélectrique. Pour cela, la migration s'effectue en conditions non-dénaturantes sur un gel parcouru par un champ électrique. Les gels utilisés sont des gels d'acrylamide co-polymérisés avec des immobilines, qui permettent le maintien d'un gradient de pH. Les protéines déposées au niveau du gel ne se trouvent pas à leur point isoélectrique, elles sont donc globalement chargées. Grâce au champ électrique, les protéines vont migrer jusqu'au pH correspondant à leur point isoélectrique (PI) où elles s'immobiliseront, car devenues globalement neutres. Les protéines seront donc séparées selon leur point isoélectrique.

#### Matériels :

- Gel 1<sup>ère</sup> dimension 4-7, 3-7, 3-11 (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Urée (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Thiorurée (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- CHAPS (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Pince
- DTT (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Eau milli-Q
- Eau milliRO
- IPGphor (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Manifold (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- IPG 4-7, 3-7, 3-11 (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Paper wick (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Reswelling tray (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Cover fluid (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Cupules
- Destreak (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Gants (Mölnlycke Health Care AB)
- Tubes Eppendorf (Starsted, Allemagne)
- Centrifugeuse (Eppendorf, Allemagne)
- Centrifugeuse (Heraus, Allemagne)

#### Méthode :

La migration en 1<sup>ère</sup> dimension comporte deux grandes étapes :

#### **La réhydratation du gel 1D**

Les gels 1<sup>ère</sup> D sont conservés à -20°C sous une forme déshydratée, il faut donc les réhydrater pour pouvoir les utiliser. Le tampon de réhydratation (voir tableau II.2) contient du DTT pour réduire les protéines et des IPG pour faciliter l'entrée des protéines dans le gel et leur focalisation à leur PI ; 450 µl de celui-ci est déposé dans une rangée du Reswelling Tray. Le gel 1<sup>ère</sup> dimension y est déposé délicatement en évitant la formation de bulles. Après 15 minutes, celui-ci est recouvert de 3 ml de "cover fluid" (huile) pour éviter la précipitation de l'urée et le dessèchement du gel. La réhydratation dure toute la nuit.

#### **La migration en 1<sup>ère</sup> dimension.**

Une fois le gel réhydraté, il est déposé dans une rangée du Manifold contenant 110 ml d'huile placé dans l'IPGphor. La cupule de chargement est placée au niveau de la partie acide du gel. Aux extrémités du gel des « paper wick » humidifiés avec 150 µl d'eau milli-RO sont déposés ; c'est là que les électrodes sont installées. La préparation de l'échantillon, quant à elle, consiste à prélever une quantité de protéines et d'y ajouter un volume équivalent de Lysis Buffer 2X (voir tableau II.2). L'ensemble est vortexé et incubé 15 minutes à température

<b>Solution "gel 2D"</b>	<b>12 %</b>
SDS	0,45 g
H <sub>2</sub> O	145 ml
Acrylamide	187,5 ml
Tris HCl 1,5 M pH8,8	112,5 ml
TEMED	62,5 µl
APS 10%	4,5 ml
<b>Solution d'équilibration</b>	
Urée	6 M
Glycérol	69 ml
Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	6,7 ml
SDS	2 %
<b>Tampon d'électrophorèse (10X)</b>	<b>2 litre</b>
Tris HCl	60,5 g
Glycine	288 g
SDS 1 %	20 g
<b>Programme de migration 2<sup>ème</sup> D</b>	<b>12 %</b>
1 heure	5 mA/gel
16 heures	14 mA/gel
2 heures	1 mA/gel

**Tableau II.3 :** Composition des solutions nécessaires à la migration en 2<sup>ème</sup> dimension et programmes de migration en 2<sup>ème</sup> dimension.

ambiante avant d'être centrifugé 15 minutes à 13.000 rpm (centrifugeuse Heraeus). Après avoir enlevé l'excès d'huile de la cupule, l'ensemble de l'échantillon y est déposé. Une fois le montage effectué, le programme de migration (voir tableau II.2) est lancé. Lorsque la migration est terminée le gel peut être conservé à -80°C pour plusieurs mois.

#### **4.2.2 Migration en 2<sup>ème</sup> dimension**

La migration en 2<sup>ème</sup> dimension permet une séparation des protéines selon leur poids moléculaire. La migration s'effectue en conditions dénaturantes dans un gel de polyacrylamide parcouru par un champ électrique. La présence de SDS permet la dénaturation et le chargement négatif des protéines. La vitesse de migration est fonction du poids moléculaire, ce qui permet une séparation selon ce critère.

##### Matériels :

- Gels caster (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Feuille de plastique
- Plaques de verre avec ou sans espaceur
- Pince et scalpel
- Acrylamide (Bio-rad, USA)
- Ettan Dalt II (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Eau MilliQ
- SDS (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Persulfate d'Ammonium (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Agarose
- Isobutanol (UCB, Belgique)
- Pipettes pasteur (Bilbate, Grande-Bretagne)
- Glycine (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Urée (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Glycérol (Merck, USA)
- Iodoacétamide (Bio-rad, USA)
- Tris HCl 1,5M pH 8,8 (GE Healthcare, Grande-Bretagne)
- Temed (GE Healthcare, Grande-Bretagne)

##### Méthode :

#### **Polymérisation des gels.**

Dans le gel "caster", sont placées en alternance une plaque avec espaceurs, une plaque sans espaceurs et une feuille de plastique. Le gel « caster » est fermé hermétiquement à l'aide de son couvercle. La solution de polymérisation de 12% d'acrylamide (voir tableau II.3) est préparée. Avant d'être coulée, elle est dégazée et doit avoir une température comprise entre 19,5 et 20,5°C. La solution est coulée jusqu'à 1 cm du bord des espaceurs et recouverte de 2 ml d'isobutanol saturé d'eau pour éviter la présence d'oxygène. 1 heure et demi plus tard, le tout est recouvert de SDS 0,25 % et la polymérisation se poursuit toute la nuit.

#### **La migration en 2<sup>ème</sup> dimension.**

Le gel 1D, une fois lavé à l'eau distillée, va subir différents lavages en milieu réducteur pour permettre la dénaturation des protéines qu'il contient. Un premier lavage de 15 minutes avec 10 ml de solution d'équilibration (voir tableau II.3) contenant 100 mg de DTT permet de rompre les ponts disulfure. Ensuite, un second lavage de 15 minutes est effectué avec 10 ml de solution d'équilibration contenant 250 mg d'iodoacétamide, empêchant la reformation de ces ponts. Le gel est rincé dans du tampon d'électrophorèse (voir tableau II.3) 2 X et déposé sur le gel de 2<sup>ème</sup> dimension, où il sera fixé au moyen d'agarose chaud. La cassette sera ensuite placée dans la cuve de migration préalablement remplie avec 7,5 litres de tampon d'électrophorèse 1 X. Une fois l'ensemble des cassettes placées, le reste de la cuve sera rempli

Etape	Composition du bain	Durée
Fixation	Ethanol 30 %, Acide acétique 10 %	Min 6h
Lavage	Ethanol 20 %	3 x 30 min
Coloration	Ethanol 20 %, Ruthénium 100 nM	O/N
Lavage	Eau distillée	3 X 10 min

**Tableau II.4:** Composition et durée des différents bains nécessaire à la coloration au ruthénium

Sonde	$\lambda_{\text{max}}$ d'absorption	$\lambda_{\text{max}}$ d'emission	PM (Da)
Cy2	491 nm	509 nm	434
Cy3	553 nm	569 nm	466
Cy5	645 nm	664 nm	464

**Tableau II.5 :** Propriétés des différentes spectrales des différentes Cyanines utilisées

avec du tampon d'électrophorèse 2 X. La cuve sera refermée et le programme de migration lancé (voir tableau II.3).

### **4.2.3 La révélation**

L'étape de révélation permet de mettre en évidence les protéines présentes dans le gel. Au cours de ce mémoire 2 type de sondes fluorescentes différentes sont utilisées: le ruthénium Red, utilisé pour une coloration après migration et les Cy dye, greffée au sur les protéines avant la migration.

#### **Ruthénium Red:**

Il s'agit d'une sonde fluorescente avec une sensibilité moyenne qui nous permet de réaliser les mises au point de l'expérience, avant de marquer à l'aide des sondes Cy dye, fort coûteuses.

#### Matériels :

- |   |   |
|---|---|
| -Bac de plastique   | -Agitateur  |
| -Ethanol 99 % (Merck, USA)  | -Eau milliQ   |
| -Acide Acétique 96,5% (Merck, USA)  | -Scanner confocal Typhoon 9400 (GE Healthcare, Grande-Bretagne) |
| -Ruthenium Red (Fourni gracieusement par l'Université de Liège, Belgique) |   |

#### Méthode :

Le ruthénium Red est une sonde fluorescente polycationique qui se fixe au niveau des régions protéiques chargées négativement. Lorsque la migration est terminée, la cassette est placée dans un bain d'eau distillée, afin de détacher le gel des plaques. Celui-ci est récupéré et subira différents bains nécessaires à la coloration (voir tableau II.4). Une fois terminée, le gel est scanné avec le Typhoon 9400.

#### **CyDye :**

Le marquage aux cyanines vu sa grande sensibilité est utilisé pour la réalisation des gels analytiques. Le marquage aux cyanines (Cy) diffère du marquage précédent par le fait qu'il doit être réalisé avant la migration en première dimension. Les cyanines sont des sondes fluorescentes qui marquent les protéines via une liaison covalente aux lysines. Pour obtenir une information statistiquement valable, le marquage aux cyanines nécessite la réalisation de 3 gels issus d'expériences indépendantes. Chaque gel contenant une condition contrôle, une condition test et le standard interne, marquées spécifiquement au moyen de 3 cyanines différentes (voir tableau II.5). Le standard interne est un échantillon contenant une proportion égale de chaque condition et permettant la normalisation entre les 3 gels.

#### Matériels :

- |   |  |
|---|--|
| - NaOH 50 mM (Merck, USA)                     | (GE healthcare, Grande-Bretagne)                       |
| - Indicateur de pH (Sigma Aldrich, Allemagne) | - Typhoon 9400 (GE healthcare, Grande-Bretagne)        |
| - Lysine (Merck, USA)                         | - Programme DeCyder 6 (GE healthcare, Grande-Bretagne) |
| - Eppendorf (Sarstedt, Allemagne)             |  |
| - CyDye 2, 3 et 5                             |  |

-Spot picker (GE healthcare, Grande-Bretagne)

#### Méthode :

Pour un marquage optimal, les échantillons sont portés à un pH de 8,5 à l'aide de NaOH 50 mM avant de doser les protéines. Pour chaque échantillon, 25 µg de protéines sont prélevés et ajoutés à un Eppendorf contenant 1 µl de cyanine. Parallèlement, le standard interne est préparé, il contient 12,5 µg de chaque condition et 3 µl de cyanine. Après une incubation de 30 minutes sur glace, 1 µl de lysine 10 mM est ajouté aux Eppendorfs correspondant aux échantillons et 3 µl au standard interne afin d'arrêter la réaction de greffage. Après une incubation de 10 minutes, un volume équivalent de lysis Buffer 2X (voir tableau II.2) est ajouté à chaque solution. Un mélange est préparé pour chaque gel contenant 1/3 du volume total du standard interne et la totalité des solutions test et CTL. Le mélange est incubé 15 minutes à RT avant d'être centrifugé à 13.000 rpm (centrifugeuse Heraeus) pendant 15 minutes. La migration en première et en seconde dimension est ensuite effectuée.

#### **Révélation et analyse en 2D-DIGE :**

Une fois la migration en 2<sup>ème</sup> dimension terminée, les gels sont rincés à l'eau distillée et placés sur le scanner Typhoon 9400. Un premier scannage à basse résolution au 3<sup>ème</sup> longueur d'onde est effectué afin de régler les différents paramètres d'optimisation à l'aide du programme Typhoon Scanner Control. Une fois ces réglages réalisés, les 3 gels sont scannés à haute résolution aux 3 longueurs d'onde pour obtenir l'image définitive de chaque condition au sein de chaque gel. Les 3 gels sont ensuite analysés par le programme DeCyder 6, celui-ci va commencer par dénombrer le nombre de spots présents sur chaque gel afin de déterminer un gel « master » qui servira de référence à la normalisation des deux autres. Ensuite la moyenne des gels CTL et la moyenne des gels test est comparée spot par spot afin de repérer les spots présentant une variation significative (test t de Student :  $p \leq 0,05$ ) et répertoriés en liste.

## **5 Préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse va nous permettre d'identifier les protéines contenues dans les spots présentant une variation significative entre nos deux conditions. Afin d'effectuer cette identification, de nouveaux gels appelés gels préparatifs sont réalisés. Ils sont chargés avec 150 µg de protéine pour obtenir une quantité suffisante de protéines pour l'identification. Une fois la migration effectuée, ces gels sont colorés au ruthénium et l'image obtenue est ensuite comparée à celle obtenue lors de l'analyse en gel 2D-DIGE, ce qui nous permet de repérer les différents spots d'intérêts. Leurs coordonnées sont transmises à un bras robotisé (le spotpickeur) qui ira prélever les zones du gel préparatif contenant nos protéines d'intérêts. Les protéines seront extraites du fragment de gel et digérées par trypsinisation afin de permettre l'identification par spectrométrie de masse.

#### Matériels

-Isopropanol (Merck, USA)

-Ethanol (Merck, USA)

-Eau distillée

-Acide cyanhydrique (ACN) (Merck, USA)

-Agitateur (Eppendorf, Allemagne)

-Plaque 96 puits (Costar, USA)

-Acide formique (5 %) (Merck, USA)

-Alicot de Trypsine (Promega, USA) (100 µg de trypsine/ 1000 µl de HAC 50mM)

-NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, pH : 7,8 (Sigma Aldrich, Allemagne)

### Méthode

L'ensemble des étapes nécessaire à la préparation des échantillons pour la spectrométrie de masse se déroule en salle blanche pour éviter toute contamination de nos échantillons par d'autres protéines. La paillasse où la préparation des échantillons s'effectuera doit être passée à l'isopropanol et nos gants de travail à l'éthanol. Dans un premier temps, les fragments de gels récoltés dans une plaque 96 puits sont lavés 2 fois 10 minutes avec 100 µl d'eau distillée à RT sous une agitation de 1.000 rpm, ce qui permet d'éliminer les sels présent au niveau du gel. Ensuite, le gel est lavé avec 100 µl d'acide cyanhydrique (ACN) pendant 10 minutes à RT sous une agitation de 1.000 rpm avant d'incuber la plaque 20 minutes à 37°C. Le gel est ensuite recouvert avec 3 µl de trypsine diluée 7X dans du NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM (TD) et incubé 45 minutes à 4°C. 15 à 20 µl de TD 50 mM sont ensuite ajoutés et le tout est laissé incuber toute la nuit à 37 °C. Le lendemain matin, le surnageant est récupéré et placé dans un tube spécial pour spectrométrie de masse. Enfin, on ajoute 10 µl d'acide formique 5 % sur le gel avant de l'incuber 30 minutes à 37 °C avec une agitation de 1.000 rpm. Le surnageant est récupéré et regroupé dans le tube contenant le surnageant déjà récolté. Les échantillons sont finalement stockés à -20°C jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse réalisée par Marc Dieu.

## 6 Analyse bioinformatique des séquences promotrice

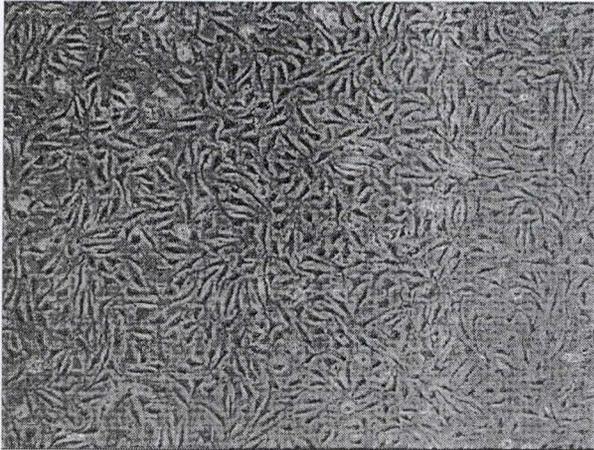
Pour réaliser l'analyse bioinformatique de la séquence promotrice, il nous faut récupérer celle-ci dans la banque de données **TRED** (Transcriptional Regulatory Element Database) accessible à l'adresse <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home>. Nous avons considéré comme séquence promotrice les 1000 pb en amont du site +1. Ensuite, le programme **TFSEARCH** (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) permet de déterminer les sites de liaison probables de différents facteur de transcription (FT) présents au niveau de cette séquence. Un score est attribué à chaque site de liaison grâce à la séquence consensus reconnue par le FT et par une matrice de score associé à cette séquence.

## 7 Analyse statistique

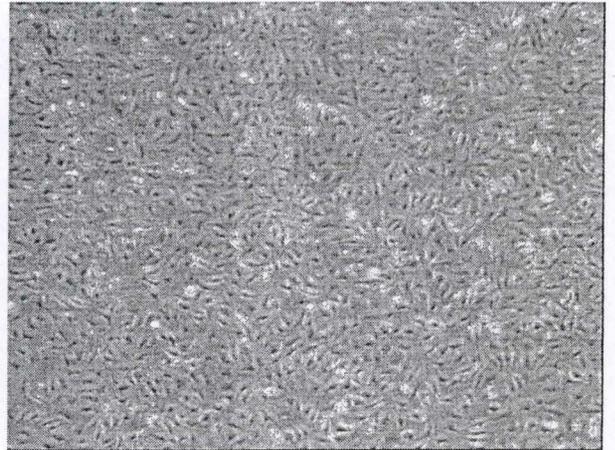
L'analyse statistique est effectuée au moyen du programme **Sigmastat**. La première étape est l'encodage des données à analyser dans le tableur du programme. Avant de réaliser le test statistique le programme vérifie si la comparaison entre les données est possible en analysant la normalité et la variance de celles-ci. Après cette vérification, nous pouvons passer à l'analyse proprement dite. Différents tests statistiques sont disponibles en fonction du type de données à analyser. Dans notre cas, nous avons utilisé une anova1 et la comparaison multiple a été effectuée par la méthode de Holm-Sidak. Les résultats ont été considérés comme significativement différents, hautement différents et très hautement différents si P était respectivement <0,05, <0,01 et <0,001.

### III. RESULTATS ET DISCUSSION

Contrôle



LPA



**Figure III.1 :** Comparaison entre la morphologie de cellules EAhy926 au repos ou stimulées 24 heures en présence de LPA 25  $\mu$ M. La micrographie a été prise en contraste de phase avec un objectif 10 X.

# 1. Avant-propos

Nous avons vu au niveau de l'introduction, que l'acide lysophosphatidique (LPA), est un médiateur lipidique détecté en concentrations anormalement élevées au niveau des plaques athéromateuses et qu'il intervenait dans de nombreux processus favorisant le développement de ces plaques. C'est pourquoi, ce travail réalisé dans le cadre de la thèse de C. Gustin, s'intéresse aux effets éventuels du LPA sur le dysfonctionnement endothélial, que l'on sait impliqué dans les étapes initiales du développement de l'athérosclérose. En effet, ce dysfonctionnement est la cause de l'acheminement au niveau de l'intima artérielle de différents effecteurs (monocytes/macrophages, LDL, lymphocytes T, ...) impliqués dans l'établissement de la strie lipidique, le premier stade de l'athérosclérose. Une meilleure compréhension du dysfonctionnement endothélial induit par le LPA, permettrait de préciser le rôle de ce métabolite dans le développement de l'athérosclérose et ouvrira peut-être la voie au développement ou à l'amélioration des traitements contre celle-ci.

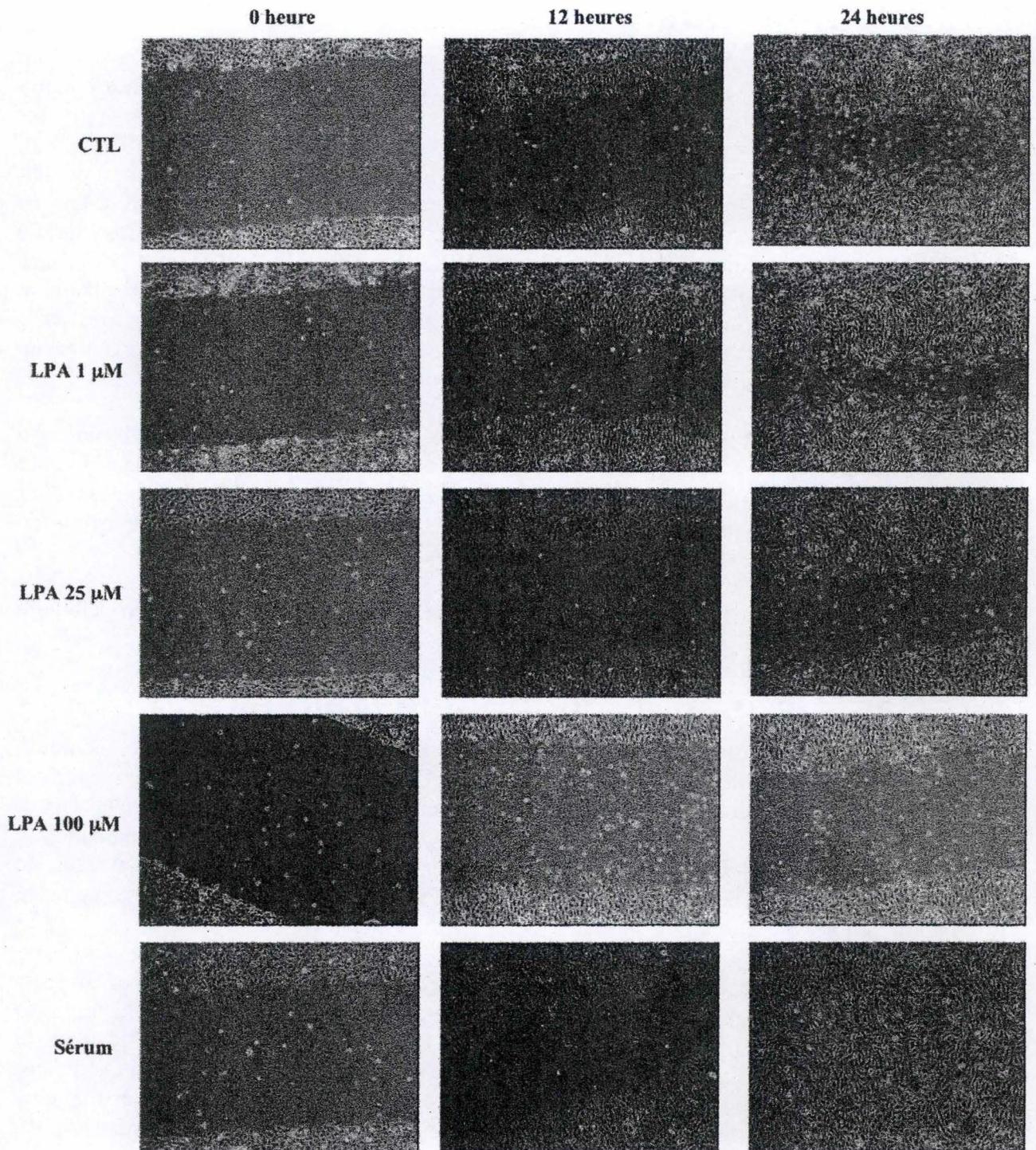
Dans ce mémoire, l'effet du LPA sur les cellules EAhy926 sera analysé à deux niveaux. Au **niveau cellulaire**, nous étudierons l'effet du LPA sur la capacité de réparer une blessure induite et sur la prolifération des cellules endothéliales *in vitro*. Au **niveau biochimique**, nous nous intéresserons via une analyse subprotéomique aux modifications de la composition du sécrétome des cellules endothéliales après stimulation au LPA.

Mais, avant d'analyser les différents résultats, une brève description du modèle cellulaire utilisé s'impose.

## 2. Caractérisation du modèle cellulaire

La lignée cellulaire utilisée lors des différentes expériences réalisées au cours de ce mémoire, est une lignée de cellules endothéliales dénommée **EAhy926**. Il s'agit de cellules hybrides issues de la fusion entre des cellules d'un carcinome pulmonaire humain déficientes pour l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (A549/8) et des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC). Cette fusion a été réalisée en 1983 au sein de l'université de Caroline du Nord par l'équipe du Prof. Cora-Jean S. Edgell, qui nous a gracieusement envoyé un lot de cellules de cette lignée.

Nous avons choisi cette lignée dans le cadre des travaux portant sur le LPA pour diverses raisons. Premièrement, il s'agit d'une lignée cellulaire d'origine humaine. L'avantage en est que la réponse induite par le LPA *in vitro* sera plus facilement extrapolable dans le contexte du développement de l'athérosclérose *in vivo* chez l'homme, que pour une lignée cellulaire d'une autre espèce. En effet, des réponses opposées ont déjà été observées entre les rongeurs et l'homme, par exemple dans la réponse à certains médicaments tels les fibrates. De plus, cette lignée est caractérisée par la présence des corps de Weibel-Palade, lesquels contiennent le facteur de von Willebrandt, qui après sécrétion, transporte et protège le facteur VIII. Ceci montre bien qu'elle conserve un caractère spécifique des cellules endothéliales (Edgell et al, 1983). Comme il s'agit d'une lignée immortalisée, elle ne subit pas les inconvénients liés au vieillissement cellulaire. Enfin, les cellules EAhy926 expriment **les différents récepteurs au LPA**. Dans le cadre de son mémoire, Laurie Bette a mis en évidence par la technique du western blot, l'expression au niveau protéique des 3 récepteurs membranaires de type EDG (LPA<sub>1,2,3</sub>), ainsi que celle de PPAR $\gamma$  au niveau de ces cellules (Bette, 2004). De plus, C. Gustin a montré la présence de transcrits codant pour le récepteur LPA<sub>4</sub> par la technique de RT-PCR en temps réel, aucun anticorps dirigé contre le récepteur LPA<sub>4</sub> n'étant disponible.



**Figure III.2 :** Effets du LPA sur la réponse de réparation des cellules endothéliales à une lésion induite, soit dans un milieu de base (CTL), soit en présence de sérum, soit en présence de LPA 1, 25 et 100 µM. Les micrographies ont été prises à l'aide d'une caméra Leica montée sur un microscope en contraste de phase, avec un objectif 6,3 X.

Vu la découverte récente en juin 2006 du récepteur LPA<sub>5</sub>, la présence de celui-ci n'as pas encore été testée au laboratoire (Lee et al, 2006).

Nous avons opté pour une stimulation des cellules à une concentration en LPA de 25  $\mu$ M, car il s'agit d'une concentration comparable aux concentrations couramment utilisées dans la littérature. Cette concentration induit l'expression du gène encodant le MCP-1 et l'IL-8 (Gustin *et al.*, article en soumission). Elle est également relevante par rapport aux concentrations en LPA plus élevées rencontrées *in vivo* en conditions patho-physiologiques. A cette concentration, on constate que la morphologie des cellules EAhy926 est tout à fait comparable à celle des cellules non stimulées, même au bout de 24 heures de traitement, comme le révèle la figure III.1.

### **3. Effets du LPA sur les cellules endothéliales EAhy926 au niveau cellulaire**

#### **3.1. Effets du LPA sur la réponse à une blessure induite**

Au niveau de l'introduction, nous avons décrit les différents effets pro- et anti- athérogènes que pouvait médier le LPA au niveau cellulaire parmi lesquels la capacité du LPA à stimuler une réparation tissulaire. Celle-ci fut mise en évidence notamment par Lee et ses collaborateurs. Ces auteurs ont montré au moyen d'un test de blessure induite, que le LPA pouvait stimuler la réponse de réparation des cellules endothéliales HUVEC et ABAEC (Adult Bovine Aortic Endothelial Cell) (Lee et al, 2000).

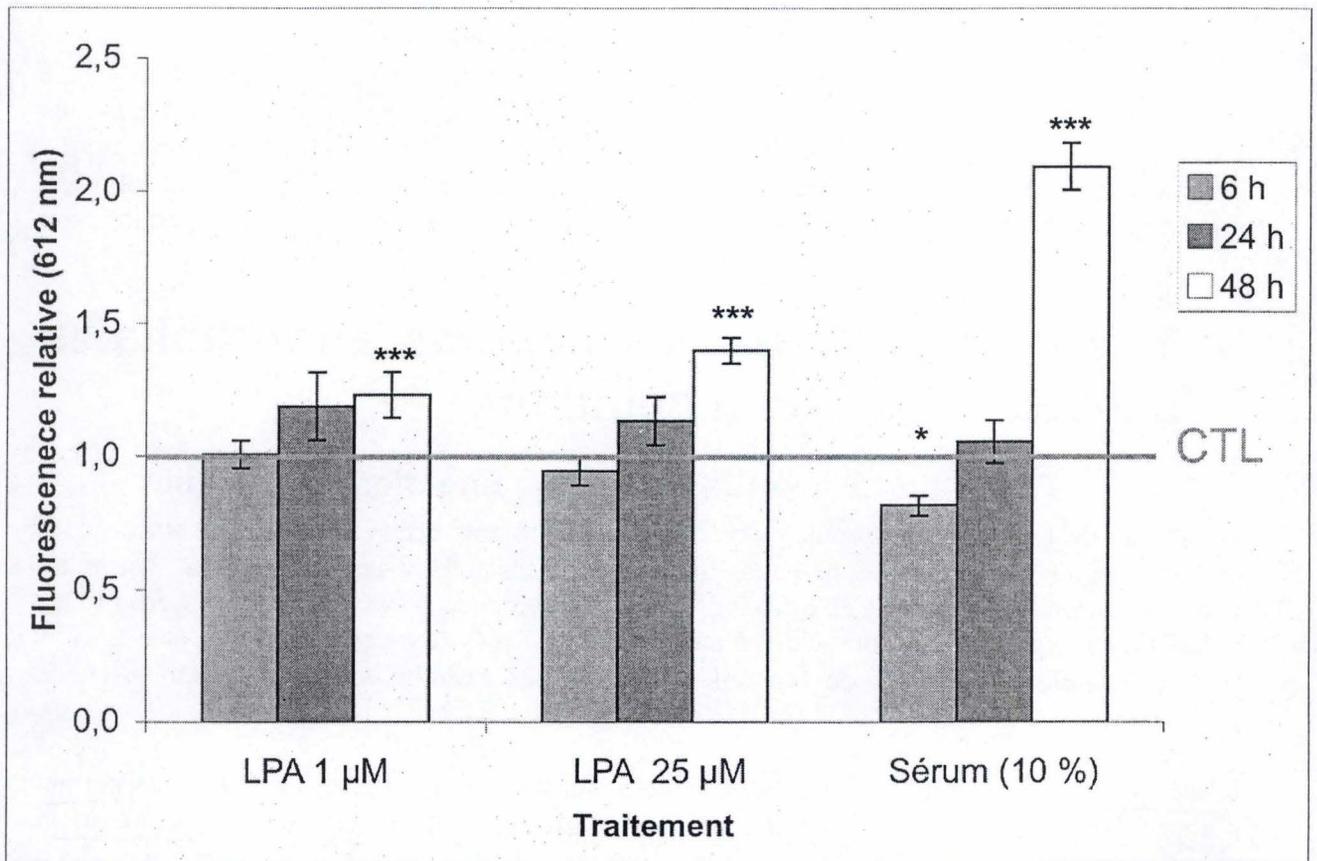
L'étude de la réparation par les cellules endothéliales est intéressante, car elle nous permet d'appréhender deux processus cellulaires complémentaires, la migration et la prolifération cellulaires. L'étude de l'effet du LPA sur la capacité des cellules endothéliales EAhy926 à réparer une lésion induite au niveau d'un tapis cellulaire, va donc nous donner une vue globale de ces deux processus en fonction de la concentration en LPA testée.

Pour commencer, nous avons défini les conditions les plus appropriées pour induire une lésion locale au niveau d'un tapis cellulaire. Nous avons donc comparé les lésions obtenues par l'intermédiaire soit d'un tips bleu de 1000  $\mu$ l, soit d'un tips jaune de 200  $\mu$ l, soit d'un racloir dont l'extrémité a été préalablement effilée. La lésion qui nous a semblé la plus appropriée a été obtenue à l'aide du racloir. En effet, celle-ci était nette, homogène et d'une taille idéale pour l'observation au microscope (figure III.2).

L'expérience a été effectuée selon le protocole décrit au point 2 des Matériels et méthodes, selon différentes conditions:

- 1 contrôle négatif : en présence du milieu de base
- 3 conditions tests : en présence de LPA 1, 25 ou 100  $\mu$ M
- 1 contrôle positif : en présence du milieu de culture contenant du FBS à 10 %

Différentes concentrations en LPA ont été choisies afin de tester l'effet du LPA sur la réparation de la lésion : la concentration sélectionnée par C. Gustin dans le cadre de sa thèse (25  $\mu$ M), mais aussi une concentration supérieure (100  $\mu$ M) et une concentration inférieure (1  $\mu$ M) à celle-ci. L'évolution de la blessure est suivie au cours du temps par prises d'images toutes les 2 heures au moyen d'une caméra Leica fixée au niveau du microscope à contraste de phase, avec un objectif 6,3 X.



**Figure III.3 :** Effet du LPA sur l'évolution de la biomasse cellulaire estimée via une mesure de la fluorescence émise par l'iodure de propidium (612nm) incorporé après 6, 24 ou 48 heures de traitement. Chaque condition est réalisée en quadruple. La valeur moyenne relative de la fluorescence associée à chaque condition correspond à la valeur moyenne de celle-ci divisée par la valeur moyenne du CTL négatif (milieu de base) +/- 1 écart-type. \*: différence significative \*\*: différence hautement significative

### Résultats :

Les micrographies de la figure III.2 nous permettent de comparer l'évolution de la lésion après 12 et 24 heures de stimulation. Celle-ci est totalement comblée après 24 heures au niveau du CTL positif (10 % de FBS), tandis qu'elle est encore bien présente au niveau du CTL négatif, même après 24 heures. Cette situation après 24 heures pour les contrôles positif et négatif est idéale, car elle nous permet de comparer les effets du LPA. Les 3 concentrations en LPA donnent des effets différents. En effet, pour une concentration de 1  $\mu\text{M}$ , le LPA tend à stimuler la réparation de la lésion, alors qu'aux concentrations supérieures et surtout à 100  $\mu\text{M}$ , le LPA semble inhiber cette réparation. Cette expérience a été reproduite 2 fois, avec des résultats similaires.

Cette variation dose-dépendante de la capacité de réparation du LPA peut avoir 2 origines. La première est une **diminution du potentiel prolifératif** qui entraîne une réduction de la quantité de cellules disponibles pour la réparation de la lésion. La deuxième est **une diminution de la migration cellulaire** qui limite l'apport actif de cellules au niveau de la lésion et celle-ci n'est donc comblée que par une prolifération des cellules du bord de la plaie. Nous avons donc testé les effets du LPA sur la prolifération cellulaire.

### **3.2. Effet du LPA sur le potentiel prolifératif**

Pour effectuer cette mesure, nous avons eu recours à un **test mesurant l'abondance relative d'ADN par incorporation d'iodure de propidium** (voir point 3 du Matériels et méthodes) plutôt qu'au test classique d'incorporation de thymidine tritiée.

En effet, dans un premier temps, nous avons voulu voir si le LPA était capable d'augmenter la biomasse cellulaire au cours du temps. Un des tests faciles pour suivre l'évolution de cette biomasse, consiste à mesurer au cours du temps l'incorporation d'iodure de propidium, qui dépend de la quantité d'ADN et donc de l'abondance ou de la biomasse cellulaire. Un effet positif sur la biomasse reflètera donc un effet positif sur la prolifération cellulaire.

Comme décrit au point 3 des Matériels et méthodes, le test est effectué en plaque 24 puits sur une population de 50.000 cellules/puitsensemencées la veille, mises au repos la nuit et stimulées le lendemain matin. Le test sera réalisé à 3 temps (6 h, 24 h et 48 h) pour chaque condition testée:

- Un contrôle négatif : en présence du milieu de base
- 2 conditions test : en présence de LPA 1 et 25  $\mu\text{M}$
- Un contrôle positif : en présence du milieu de culture qui contient du FBS à 10 %

Comme ce test présente une certaine variabilité, chaque condition est réalisée en quadruples afin de minimiser celle-ci.

### Résultats :

Les résultats obtenus pour le test de prolifération sont présentés à la figure III.3 .

**Après 6 heures** de stimulation, nous n'observons pas de différence significative entre les conditions LPA et la condition contrôle. De manière surprenante, nous avons observé que les

cellules incubées en présence de sérum présentent une biomasse légèrement inférieure à celle des cellules contrôles, et cela de manière significative.

**Après 24 heures** de stimulation, la population cellulaire est légèrement plus abondante au niveau des 2 cultures en présence de LPA, mais cet effet n'est pas significatif. La biomasse des cellules endothéliales cultivées en présence de sérum à 10 %, est comparable à celle du CTL négatif.

**Après 48 heures** de stimulation, nous observons un effet pro-prolifératif d'une stimulation à 25  $\mu\text{M}$  de LPA, avec une biomasse correspondant à 1,4 fois celle du contrôle négatif. Pour le contrôle positif (10 % de sérum), la biomasse double, par rapport à celle du contrôle négatif. Les cellules stimulées avec du LPA 1  $\mu\text{M}$  présentent aussi une croissance supérieure à celle de la population contrôle.

En conclusion, nous pouvons dire que le LPA exerce effectivement un effet pro-prolifératif sur les cellules EAhy926 et que celui-ci est dose-dépendant. Après 48 heures, il s'avère moindre que celui du sérum. L'absence d'augmentation significative de la biomasse cellulaire à 6 et 24 heures est probablement due au fait que la durée moyenne d'un cycle cellulaire est de 24 heures.

### 3.3. Discussion :

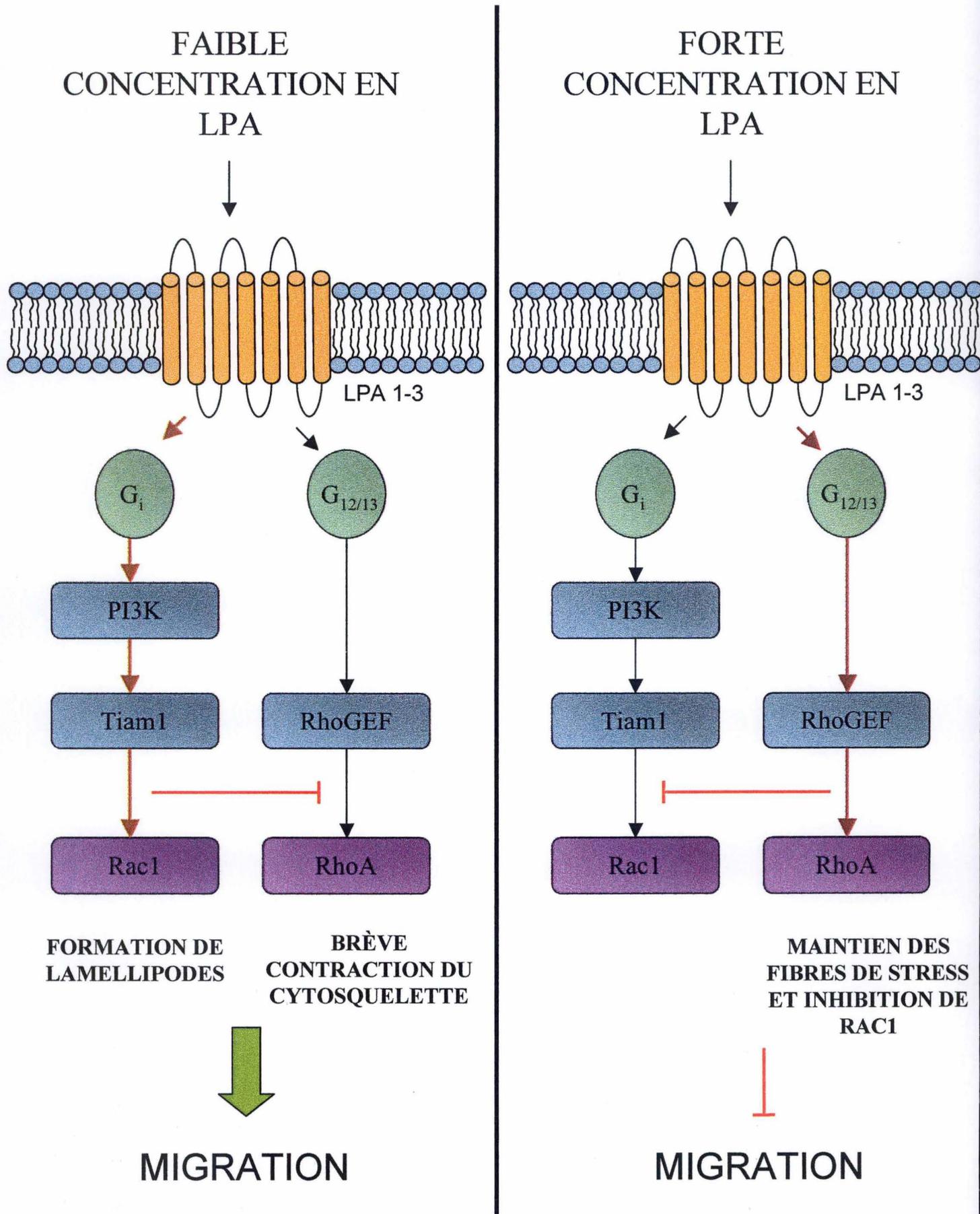
Dans cette première partie des résultats, nous nous sommes intéressés à l'action du LPA au niveau cellulaire et plus particulièrement à son effet sur les processus de réparation après induction d'une lésion.

En 2000, Lee et ses collaborateurs avaient déjà démontré que le LPA stimulait les cellules endothéliales (HUVEC et ABAEC) à réparer une blessure induite *in vitro*, à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  (Lee et al, 2000). Dans ce travail, nous avons montré que des concentrations inférieures en LPA (1  $\mu\text{M}$ ) pouvaient également stimuler cette réparation par les cellules EAhy926, mais que des concentrations plus élevées (100  $\mu\text{M}$ ) provoquent son inhibition. Cette inhibition pour des concentrations élevées en LPA peut avoir plusieurs origines, le LPA pouvant soit inhiber la prolifération cellulaire, soit diminuer la migration cellulaire.

L'interprétation des résultats observés n'est pas facile, car les effets du LPA sont dose-dépendants. En effet, l'analyse du potentiel prolifératif des cellules EAhy926 nous révèle que celui-ci présente une régulation dose-dépendante par le LPA avec un effet pro-prolifératif plus marqué pour le LPA 25  $\mu\text{M}$  que pour le LPA 1  $\mu\text{M}$ . De plus, les biomasses obtenues après 24 heures de stimulation avec le LPA 1  $\mu\text{M}$  et 25  $\mu\text{M}$  sont comparables. Par contre, la réparation est moindre pour le LPA 25  $\mu\text{M}$  comparé au LPA 1  $\mu\text{M}$ . A 25  $\mu\text{M}$ , il pourrait donc y avoir un effet négatif sur la migration cellulaire.

Nous nous sommes donc intéressés aux différents mécanismes impliqués dans la régulation de la migration cellulaire induite par le LPA décrits dans la littérature, pour tenter de comprendre pourquoi la migration cellulaire serait réduite en présence de concentrations élevées en LPA.

Indépendamment du LPA, la migration cellulaire est principalement régulée par une famille de petites protéines G, les Rho GTPases dont les 3 principales sont Cdc42, Rac1 et RhoA. Cdc42 intervient dans le contrôle de la polarité cellulaire et Rac1 régule le mouvement cellulaire et la formation des lamellipodes. Via l'expression de mutants dominants négatifs de Cdc42 et Rac, il a été démontré que ces deux protéines étaient indispensables à la migration



**Figure III.4 :** Schéma représentant le modèle hypothétique de la régulation de la migration cellulaire en fonction de la concentration en LPA

cellulaire induite par le LPA (Sugimoto et al, 2006). RhoA interviendrait d'abord dans la contraction du cytosquelette d'actine, étape indispensable à la migration cellulaire. En cas d'activation prolongée, RhoA favorise la formation de fibres de stress qui elles s'opposent à la migration (Figure III.4). Ayant décrit les 3 acteurs principaux de la migration cellulaire et leur importance relative, nous allons nous intéresser à leur régulation par le LPA.

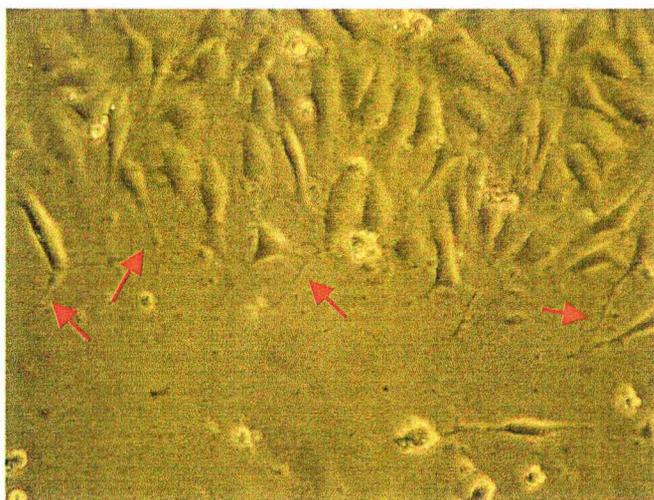
Par ailleurs, on sait que le LPA module la migration cellulaire. Pour rappel, le LPA médie ses effets au moyen de différents récepteurs et notamment via 5 récepteurs à 7 segments transmembranaires membranaires (LPA<sub>1-5</sub>) couplés à des protéines G. Chacun de ces récepteurs présente une affinité particulière pour les différentes protéines G existantes, ce qui conditionne les voies activées en aval (Ishii et al, 2004). De nombreuses études ont montré que la migration cellulaire était induite par le LPA via un processus entièrement dépendant de l'activation de la protéine G<sub>i</sub>. En effet, la toxine pertussique (un inhibiteur de la protéine G<sub>i</sub>) empêche toute induction par le LPA de la migration et cela pour de nombreux types cellulaires (Panetti et al, 2000 ; Van Leeuwen et al, 2003 ; Hama et al. 2004 ; Sugimoto et al, 2006). Il a aussi été montré au moyen de lignées cellulaires exprimant différentiellement les divers types de récepteurs au LPA, que la migration stimulée par le LPA était inductible par un seul récepteur, le LPA<sub>1</sub> (Hama et al, 2004 ; Shida et al, 2004). Ce dernier est couplé majoritairement à la protéine G<sub>i</sub>, ainsi que secondairement à la protéine G<sub>12/13</sub> (Van Leeuwen et al, 2003). C'est donc la régulation de leurs effecteurs, et en particulier des RhoGTPases, qui explique la réponse migratoire.

**L'activation de la protéine G<sub>12/13</sub>**, qui en plus d'être couplée au récepteur LPA<sub>1</sub> est également couplée au récepteur LPA<sub>2</sub>, va provoquer une activation brève et rapide de la protéine RhoA. Celle-ci va permettre au niveau de la cellule, la contraction du cytosquelette (Van Leeuwen et al, 2003). Cette étape est essentielle à la migration, car elle permet de détacher la cellule de son substrat afin qu'elle puisse se déplacer (Figure III.4).

**L'activation de la protéine G<sub>i</sub>**, quant à elle, est responsable de l'induction d'au moins deux voies importantes de signalisation impliquées dans la régulation de la migration cellulaire. Premièrement, elle va induire l'activation prolongée de la protéine G **Rac1** via une voie dépendante de la PI3K et de Tiam1, une GEF (GTP exchange factor) spécifique de Rac1 (Figure III.4). Cette activation prolongée va aboutir à la formation de lamellipodes qui sont des prolongements cytoplasmiques indispensables au mouvement cellulaire. C'est pourquoi, une inhibition de la protéine G<sub>i</sub> via la toxine pertussique, empêche l'activation de Rac1, et donc la migration cellulaire. De plus, la voie Rac1 est également responsable de la brièveté de l'activation de la voie RhoA. En effet, une inhibition de celle-ci par la voie Rac1 et dépendante de Tiam1, a été démontrée par Hama et ses collaborateurs (Hama et al, 2004) (Figure III.4).

Deuxièmement, l'activation de la protéine G<sub>i</sub> va entraîner l'activation de plusieurs voies dont la voie Ras-MEKK1. L'implication de MEKK1 dans différents mécanismes de migration repose sur différentes observations. Les fibroblastes déficients en MEKK1 sont incapables de migrer. La surexpression de MEKK1 induit la formation des lamellipodes. Enfin, il existerait une interaction entre MEKK1 et la FAK (Focal adhesion Kinase), une kinase impliquée dans la régulation des plaques d'adhérence focale (Van Leeuwen et al, 2003 ; Bian et al, 2003).

L'ensemble des mécanismes décrits ci-dessus permet d'expliquer l'induction de la migration cellulaire par le LPA, mais n'explique pas son inhibition à des concentrations plus élevées. Une étude récente menée par Sugimoto et ses collaborateurs suggère une piste possible. En



**Figure III.5 :** Micrographie mettant en évidence l'apparition de pseudopodes après 6 heures de stimulation à une concentration de LPA 1  $\mu$ M (Objectif : 40 X).

effet, ceux-ci ont démontré que la voie  $G_{12/13}$ -RhoA pouvait, par un mécanisme non encore élucidé, induire l'inhibition de la voie  $G_i$ -Rac1 et donc de la formation des lamellipodes nécessaires à la migration (Sugimoto et al, 2006). L'intensité de la migration cellulaire pourrait donc être régulée différemment selon le rapport entre l'activation de la voie  $G_i$ -Rac1 et celle de la voie  $G_{12/13}$ -RhoA. Ainsi, pour les concentrations plus faibles en LPA l'activation de la voie  $G_i$ -Rac1 serait suffisante pour provoquer l'inhibition rapide de la voie RhoA, tout en favorisant la formation des lamellipodes et donc la migration cellulaire. Par contre pour des concentrations supérieures en LPA, une activation plus importante de la voie  $G_{12/13}$ -RhoA empêcherait la migration cellulaire via l'inhibition de la voie Rac1 et la formation de fibres de stress. Cette activation supérieure de  $G_{12/13}$  pour de fortes concentrations peut peut-être s'expliquer par l'activation des différents types de récepteurs. En effet, le récepteur  $LPA_1$  médie plutôt l'activation de la voie Rac1, le  $LPA_2$ , quant à lui, active préférentiellement la voie RhoA. Ainsi une activation différentielle de ces récepteurs en fonction de la concentration de LPA, pourrait expliquer nos résultats obtenus dans le test de la réparation de la blessure induite. De plus, cette hypothèse pourrait expliquer les variations dans la réponse migratoire au LPA de différents types cellulaires via des différences d'expression des différents types de récepteurs au LPA (Panetti et Mosher, 2000).

L'observation de la morphologie des cellules bordant la lésion lors du test de blessure semble confirmer cette hypothèse. En effet, en présence de LPA  $1 \mu M$ , les cellules présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques et sont allongées perpendiculairement à la lésion (Figure III.5). Cette morphologie suggère une migration active des cellules vers le centre de la lésion ainsi qu'une activation de Rac1 grâce à la présence des lamellipodes. Par contre, aux concentrations supérieures en LPA, les cellules présentent moins de prolongements cytoplasmiques et ont une forme plus arrondie suggérant une activation de RhoA. Il est intéressant de noter que l'augmentation de perméabilité de l'endothélium aux environs d'une lésion athérosclérotique peut-être en partie liée à une modification morphologique provoquée par la formation de fibres de stress suite à l'activation prolongée de RhoA.

## 4. Effets du LPA sur l'expression génique analysée au niveau du sécrétome

Après avoir étudié les effets du LPA au niveau cellulaire, nous allons aborder la deuxième partie des résultats de ce mémoire, qui est consacrée à l'étude des effets du LPA sur l'expression génique des cellules endothéliales, en vue de mettre en évidence si oui ou non le LPA peut contribuer à provoquer un dysfonctionnement endothélial. Notre étude va porter sur l'analyse d'une fraction du protéome cellulaire, le **sécrétome**, par une approche en gels 2D-DIGE.

Nous avons opté pour l'étude du sécrétome pour diverses raisons. Tout d'abord, comme décrit au niveau de l'introduction, une approche subprotéomique entraîne une réduction de la complexité de l'échantillon protéique à analyser, ce qui permet d'étudier toutes les protéines présentes, y compris celles en faible quantité. Deuxièmement, les cellules endothéliales ont une activité sécrétrice non négligeable et de nombreuses protéines sécrétées par les cellules endothéliales sont impliquées dans des processus menant à la formation de la strie lipidique, tels que la chémoattraction des différents effecteurs cellulaires, l'établissement d'un contexte pro-inflammatoire, ... Enfin, ce mémoire s'intègre dans le projet de thèse de C. Gustin qui comporte également l'analyse comparative protéomique des lysats cellulaires totaux et du phospho-protéome pour des cellules stimulées ou non avec du LPA.

Pour pouvoir analyser le sécrétome par la technique des gels 2D, la mise au point de nombreux paramètres a été nécessaire. Celle-ci a été réalisée par C. Gustin dans le cadre de sa thèse. Nous allons rapidement les décrire, puisque ce sont ces conditions que nous avons utilisées dans ce travail.

#### **4.1. Choix des conditions expérimentales**

**Le temps de stimulation des cellules :** La sécrétion des protéines est un phénomène rapide. En effet, C.Gustin a pu mettre en évidence par ELISA que la sécrétion par les cellules endothéliales du MCP-1 et de l'IL-8, deux protéines impliquées dans le développement de l'athérosclérose, était maximale après 4 heures de stimulation avec du LPA 25  $\mu$ M. C'est pourquoi nous avons opté pour un temps court de stimulation de 4 heures pour analyser le sécrétome.

**L'élimination de la BSA :** La BSA est nécessaire à la stimulation en présence de LPA. Mais elle est problématique dans le cadre de l'analyse du sécrétome. En effet, celle-ci est présente en grande quantité dans le milieu de stimulation et par conséquent dans les surnageants récoltés. L'abondance de la BSA gêne l'analyse du sécrétome, car elle forme un énorme spot au niveau des gels, ce qui masque de nombreux spots voisins de celui-ci. En outre, au plus la BSA est abondante dans la fraction protéique déposée sur le gel, au plus le risque de perdre les protéines peu abondantes augmente. C'est pourquoi, nous devons éliminer la BSA, ce que nous réaliserons au moyen d'une colonne d'affinité pour la BSA.

La stimulation des cellules dans une T75 avec 6 ml de milieu de stimulation permet d'obtenir une quantité de protéines suffisante pour la réalisation de gels 2D. Une fois les 6 ml de surnageant récoltés, la BSA qu'ils contiennent sera éliminée par le passage par fractions de 2 ml du surnageant sur la colonne d'affinité pour la BSA. L'éluion s'effectue par fractions de 2 ml afin de ne pas saturer la colonne en BSA. La fraction protéique ainsi récoltée sera d'abord concentrée dans un volume de 100  $\mu$ l, avant d'être précipitée et ressuspendue dans du tampon DLa (voir Matériels et Méthodes point 4.1).

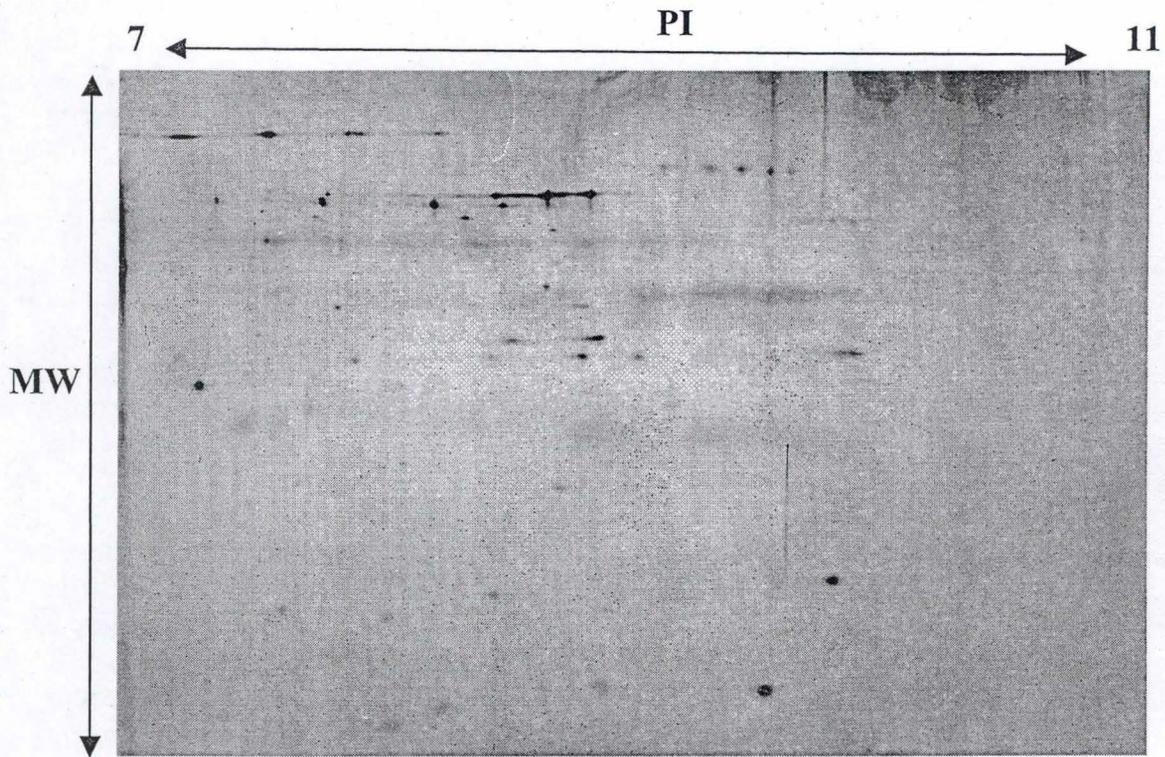
**La gamme de pH :** Afin d'augmenter la résolution des gels analytiques, nous avons décidé de réaliser deux analyses complémentaires sur des gammes de pH plus étroites (4-7 et 7-11), plutôt que d'effectuer une séparation en 1<sup>ère</sup> dimension sur une gamme de pH très large (3-11).

**Le pourcentage en acrylamide :** Les gels utilisés pour la séparation en deuxième dimension des protéines seront des gels à 12 %, ce qui permet de retenir des protéines de 10-100 kDa. Ce choix provient du fait que les protéines sécrétées sont généralement de faible poids moléculaire (ex : MCP-1 et IL-8=11 kDa, la MMP9=78 kDa) ; l'utilisation d'un gel avec un pourcentage d'acrylamide élevé et donc un maillage plus serré, permet de retenir des protéines plus légères.

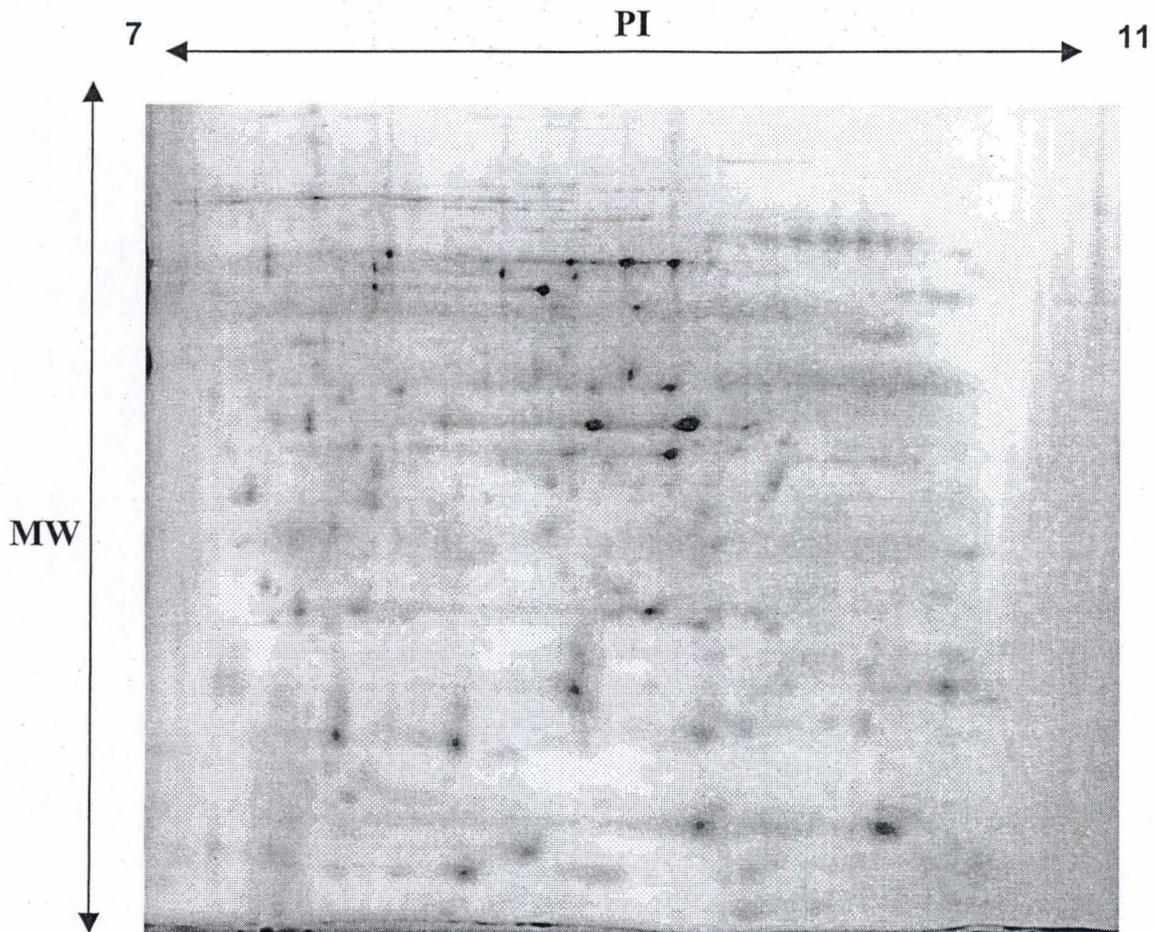
Ayant décrit les conditions expérimentales utilisées dans ce travail nous allons pouvoir passer à la présentation des résultats obtenus.

#### **4.2. Analyse du sécrétome en gels 7-11**

Nous avons commencé par les gels 7-11, car nous savions que plusieurs protéines sécrétées par les cellules endothéliales sont plutôt basiques, tels le MCP-1 et l'IL-8. Comme généralement, on ne retrouve qu'un nombre limité de protéines au niveau des pH très



**Figure III.6:** Gel de mise au point à 12 % en acrylamide sur la gamme de PI 7-11, chargé avec 50  $\mu\text{g}$  de protéines de surnageant et coloré au ruthénium. PI: Point isoélectrique; MW: Molecular Weight.



**Figure III.7 :** Gel 2D-DIGE correspondant au sécrétome de cellules EAhy926 stimulées 4 heures en présence de LPA 25  $\mu$ M. La séparation en 1<sup>ère</sup> dimension à été effectuée sur une gamme de pH de 7-11 et en 2<sup>ème</sup> dimension sur un gel d'acrylamide à 12 % et les spots sont révélés par le scanner en fluorescence.

basiques, nous avons réalisé un gel 7-11 de mise au point coloré au rouge de ruthénium afin de voir si un nombre suffisant de spots était présent pour pouvoir passer à une analyse en gel 2D-DIGE.

L'échantillon protéique nécessaire à la réalisation de ce gel provenait de 6 ml de surnageant d'une culture de cellules endothéliales non-stimulées, desquels nous avons éliminé la BSA et concentré la fraction protéique. Le gel 7-11 a été réalisé avec 50 µg de cette fraction protéique. L'allure du gel préliminaire (Figure III.6) obtenu après coloration au rouge de ruthénium, montre un nombre suffisant de spots pour que nous passions à une analyse en gels 2D-DIGE du sécrétome pour la gamme de pH 7-11.

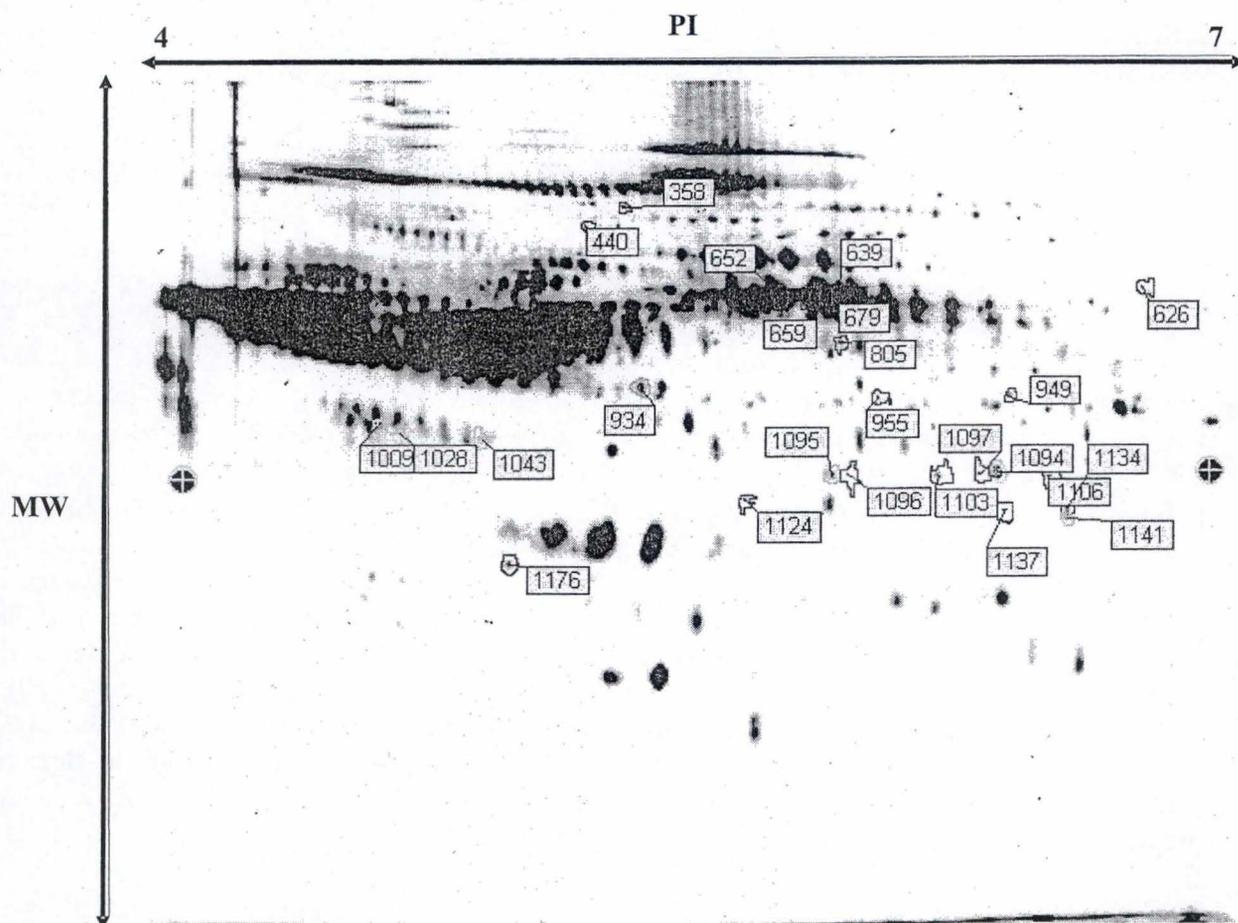
Nous avons réalisé des gels analytiques selon la technique des gels 2D-DIGE (Matériels et Méthodes Point 4.2.3). Ils vont nous permettre d'analyser très précisément les variations d'abondance entre la situation contrôle (ensemble des protéines sécrétées pendant 4 heures dans du milieu de stimulation sans LPA) et la condition test (ensemble des protéines sécrétées pendant 4 heures dans du milieu de stimulation en présence de LPA 25 µM). Comme expliqué dans la description de la technique des gels 2D-DIGE, nous avons réalisé 3 expériences indépendantes qui vont nous permettre d'obtenir les 3 gels indépendants nécessaires à l'obtention d'un résultat statistiquement exploitable. Chaque expérience indépendante comprend 2 conditions : 1 boîte test (en présence de LPA 25 µM) et une boîte CTL. Après 4 heures, les surnageants seront récoltés, la BSA sera éliminée, les protéines précipitées et ressuspendues dans 20 µl de DLa. Pour chaque échantillon, on récupère en général +/- 80 µg de protéines, desquelles on prélève 37,5 µg de protéines : 25 µg serviront au marquage de la condition (test ou contrôle) et 12,5 µg serviront à la réalisation du standard interne. Sur chaque gel de 1<sup>ère</sup> dimension 7-11, migreront donc 25 µg de protéines de la condition test, 25 µg de protéines de la condition CTL et 25 µg de protéines du standard interne avant d'être séparés en 2<sup>ème</sup> dimension sur un gel d'acrylamide à 12 % (Figure I.10). Une fois la migration terminée, les gels seront scannés par le scanner Typhoon 9400 aux trois longueurs d'ondes spécifiques des 3 cyanines utilisées, pour obtenir une image de chaque condition. Ensuite, l'ensemble des images récoltées sera digitalisé, traité et analysé à l'aide du programme DeCyder 6.

La figure III.7 montre un gel correspondant au sécrétome de cellules endothéliales stimulées 4 heures avec du LPA. Malheureusement, l'analyse comparative des gels par le programme DeCyder 6 ne nous a pas permis de mettre en évidence des variations d'abondance significatives entre la condition LPA et la condition CTL. Par ailleurs, le nombre de spots détectés sur cette gamme de pH est plutôt décevant (autour de 500 spots). Nous sommes donc rapidement passés à l'analyse du sécrétome en gels 4-7, qui se sont révélés beaucoup plus prometteurs.

### **4.3. Analyse du sécrétome en gels 4-7**

#### **4.3.1. Les gels analytiques**

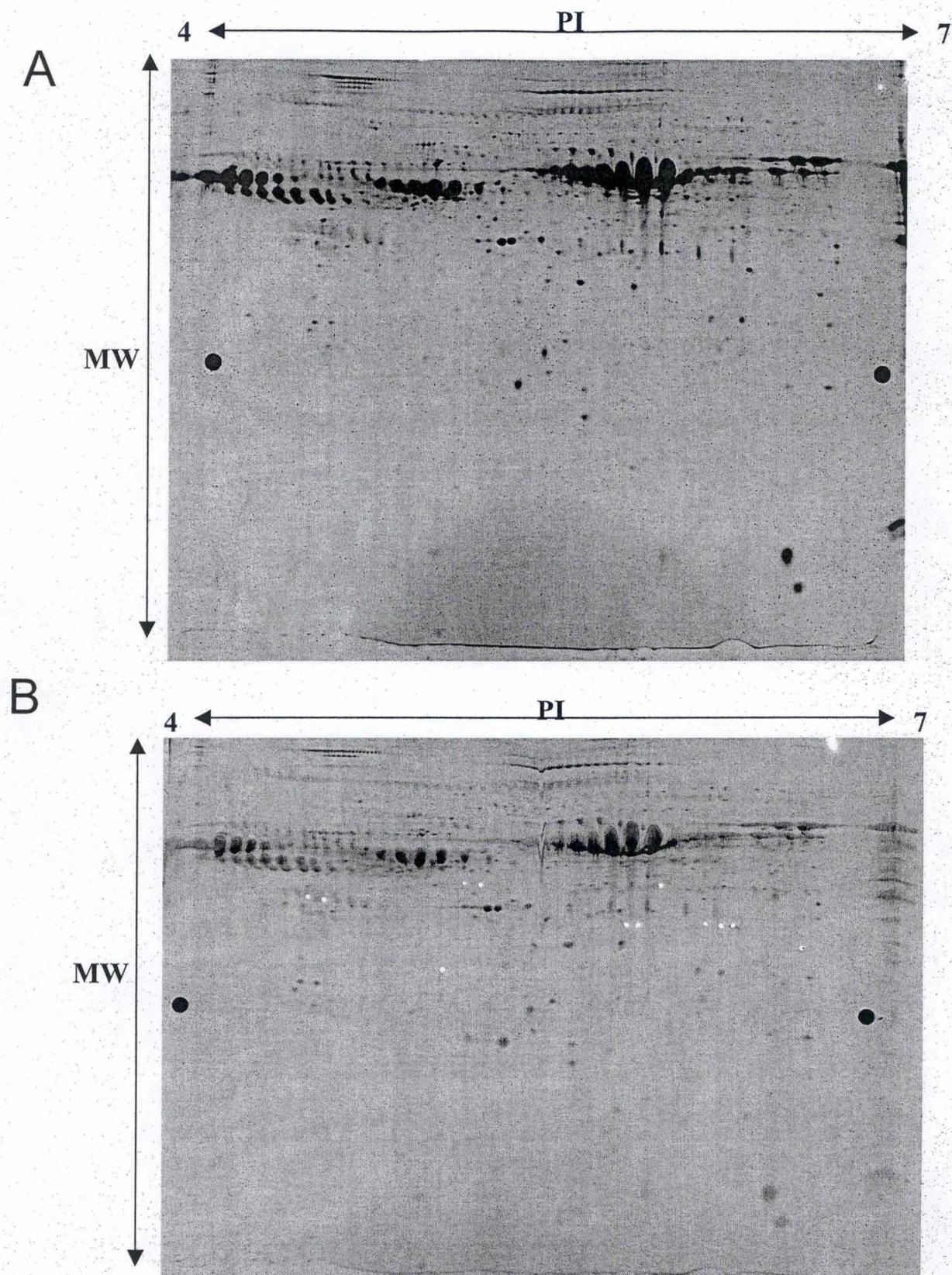
Les premiers gels réalisés correspondant à la gamme de pH 4-7 et colorés avec le rouge de ruthénium, montrent que le nombre de spots est considérablement plus important que pour la gamme 7-11. Comme expliqué dans la description de la technique des gels 2D-DIGE et pour les gels 7-11, nous avons réalisé 3 expériences indépendantes qui vont nous permettre d'obtenir les 3 gels indépendants nécessaires à l'obtention d'un résultat statistiquement exploitable.



**Figure III.8 :** Gel 2D-DIGE correspondant au sécrétome de cellules EAhy926 stimulées 4 heures en présence de LPA 25  $\mu$ M. La séparation en 1<sup>ère</sup> dimension a été effectuée sur une gamme de pH de 4-7 et en 2<sup>ème</sup> dimension sur un gel d'acrylamide à 12 % et les spots sont révélés par le scanner en fluorescence. Sur ce gel, sont représentés les 25 spots qui présentent une variation d'abondance relative supérieure à 1,5 X par rapport aux cellules contrôles.

Pos.	N° du spot	t-test	% de variation
1	358	0,013	-1,54
2	440	0,025	-1,86
3	626	0,0049	-1,57
4	639	0,03	2,47
5	652	0,038	2,27
6	659	0,026	2,09
7	679	0,025	1,82
8	805	0,046	1,74
9	934	0,03	2,07
10	949	0,0021	1,97
11	955	0,00032	1,82
12	1009	0,0076	1,54
13	1028	0,032	1,51
14	1043	0,024	1,61
15	1094	0,0074	1,95
16	1095	0,0094	1,95
17	1096	0,0049	1,64
18	1097	0,0085	1,77
19	1103	0,013	1,85
20	1106	0,04	1,75
21	1124	0,045	2,17
22	1134	0,014	2,05
23	1137	0,0041	1,70
24	1141	0,015	1,96
25	1176	0,024	-1,55

**Tableau III.1** : Tableau reprenant les 25 spots qui présentent une variation relative d'abondance supérieure à 1,5X. Il comprend pour chaque spot leur numéro, le résultat du test de Student et leur variation d'abondance relative respective



**Figure III.9 :** Gel préparatif à 12 % du sécrétome 4-7 chargé avec 150  $\mu$ g de protéines et coloré au ruthénium. A: avant le prélèvement des spots; B: après le prélèvement des spots. PI: Point isoélectrique; MW: Molecular Weight.

L'analyse des images obtenues par le Typhoon 9400 nous révèle qu'environ 800 spots sont présents par condition au niveau des gels 4-7. Ceux-ci sont présents majoritairement dans la partie supérieure du gel, bien que l'on rencontre un certain nombre de spots avec une bonne résolution dans la partie inférieure du gel. On observe également que les spots sont majoritaires dans un zone de pH allant environ de 4 à 6 (Figure III.8).

Dans ce travail, nous avons décidé de nous restreindre dans un premier temps aux spots présentant une variation relative de fluorescence d'au moins 1,5 fois : d'une part une variation d'un facteur 1,5 fois sur 4 heures de temps peut certainement avoir un impact biologiquement parlant et d'autre part ce seuil est suffisant pour pouvoir confirmer ces variations par une autre technique telle que le western blot. L'analyse du sécrétome à partir des 3 gels indépendants dans la gamme de pH 4-7 du sécrétome, nous a permis de repérer **25 spots** (Figure III.8) qui présentent de manière significative une variation relative de fluorescence d'au moins 1,5 fois (test t de Student significatif). Sur ces 25 spots, 21 présentent une augmentation d'abondance suite au traitement au LPA, tandis que 4 autres présentent une diminution de leur abondance par rapport aux cellules contrôles. Le tableau III.1 reprend le numéro des différents spots ainsi que leur variation relative d'abondance. En vue d'identifier la (ou les) protéine(s) présente(s) dans ces spots par spectrométrie de masse, nous avons dû réaliser des gels préparatifs.

#### **4.3.2. Les gels préparatifs**

Pour avoir une quantité de protéines suffisante pour leur identification en spectrométrie de masse, on réalise des gels préparatifs chargés avec une plus grande quantité de protéines (150 µg/gel), en espérant trouver les mêmes patterns de distribution de spots que pour les gels analytiques.

La préparation des échantillons protéiques des gels préparatifs est plus aisée que pour les gels analytiques. En effet, les 25 spots d'intérêt sont présents au niveau de la condition CTL, les échantillons protéiques peuvent donc être préparés au départ d'un surnageant de cellules non stimulées et donc sans BSA. L'étape d'élimination de la BSA par colonne d'affinité n'est donc pas requise.

Une fois la migration terminée, les gels sont colorés au rouge de ruthénium et scannés avec le scanner Typhoon 9400. Ensuite, le profil des gels préparatifs est comparé à celui des gels analytiques afin de repérer les spots d'intérêt ; sur ces 25 spots, nous en avons retrouvé 12 avec certitude. Ensuite, les coordonnées de ces 12 spots par rapport à 2 pastilles blanches présentes sur les gels préparatifs sont établies et transmises au « spotpicker » (le robot qui effectue le prélèvement des spots) afin qu'il puisse découper et prélever correctement les différents spots. La Figure III.9 montre un gel préparatif avant et après le prélèvement des 12 spots d'intérêt.

Les différents morceaux de gels contenant les protéines correspondantes, seront ensuite traités en salle blanche pour permettre leur digestion à la trypsine. Une analyse en spectrométrie de masse des peptides obtenus (Point 3.2.2.1.3 de l'Introduction), va nous permettre d'identifier la protéine dont ils sont issus.

Sur les 12 protéines analysées en spectrométrie de masse, 3 ont déjà pu être identifiées. Les 3 spots identifiés sont les spots 1009, 934 et 1134 qui contiennent respectivement la **pentraxine-3** (+1,54), la **fibuline** (+2,07) et la **stanniocalcine-2** (+2,05). L'identification de la pentraxine-3 s'est faite par « peptide mapping » grâce au spectromètre de masse de type

MALDI-TOF et a été confirmée par le séquençage de 8 peptides avec le spectromètre de type Q-TOF. Pour la stanniocalcine-2, l'identification s'est faite uniquement par le séquençage de 2 peptides différents avec le Q-TOF. Il en va de même pour la fibuline, mais au stade actuel du séquençage, il n'a pas été possible de préciser de quelle isoforme de la fibuline il s'agissait.

### **4.3.3. Description et relevance biologique des protéines identifiées en spectrométrie de masse, dans le cadre de la « problématique LPA »**

#### **4.3.3.1. Pentraxine-3**

Comme son nom l'indique, la pentraxine-3 (PTX3) appartient à la famille des pentraxines. Celle-ci comprend 8 membres eux-mêmes répartis en 2 sous-familles, les pentraxines courtes et les pentraxines longues. Les pentraxines comportent toutes un domaine 'pentraxine', long d'environ 200 acides aminés et comprenant une séquence caractéristique de 8 acides aminés (HXCXS/TWXS, où X est n'importe quel acide aminé) (Garlanda et al., 2005). Les pentraxines sont des protéines polymériques, avec au minimum une structure pentamérique.

La CRP (C-Reactive Protein) et la SAP (Serum Amyloid P component) constituent les 2 membres de la sous-famille **des pentraxines courtes**. Elles ont un poids moléculaire d'environ 25 kDa et partagent entre-elles un pourcentage d'identité de 51 % (Goodman et al, 1996). Il s'agit de protéines sériques dont la sécrétion est effectuée presque exclusivement par les hépatocytes au niveau du foie. Cette sécrétion est médiée principalement par l'IL-6, une cytokine présente au niveau du sang lors d'une inflammation aiguë ou d'un traumatisme (Bottazzi et al, 2006). Le taux sanguin de la CRP peut augmenter d'un facteur 1000 lors d'une inflammation systémique, ce qui explique son utilisation comme biomarqueur de l'inflammation en médecine (Pepys et Hirschfield, 2003).

La famille **des pentraxines longues**, quant à elle, comporte 5 membres, l'apexine/p50, la XL-PXN1, la pentraxine neurale 1, la pentraxine neurale 2 et la pentraxine-3 (PTX3/TSG4). La dénomination de pentraxine longue vient du fait que la longueur et le poids moléculaire de ces protéines sont doubles par rapport aux pentraxines courtes. En effet, ces protéines possèdent 2 domaines différents, le domaine 'pentraxine' C-terminal et un domaine N-terminal spécifique à chacune des protéines de cette sous-famille (Goodman et al 1996 et Garlanda et al. 2005).

**La pentraxine-3/TSG-4** (TNF $\alpha$  Stimulated gene-4) est une glycoprotéine de 381 acides aminés chez l'homme, formée de 2 domaines, le domaine 'pentraxine' C-terminal de 203 acides aminés et un domaine N-terminal de 178 acides aminés propre à la pentraxine-3. On trouve un site de N-glycosylation au niveau de l'Asn<sup>220</sup>. La migration électrophorétique révèle que la structure quaternaire de cette protéine correspond à un eicosamère, formé par des interactions entre deux décamères (Bottazzi et al, 1997).

La partie **C-terminale** de la PTX3 présente des similitudes avec la CRP et peut tout comme elle, interagir avec la protéine C1q. Dans le cas de la CRP, il s'agit d'une interaction calcium-dépendante, provoquant l'activation de la voie classique du complément. Dans le cas de la PTX3, l'interaction serait calcium-indépendante et son effet sur la voie du complément reste discuté. En effet, celle-ci est activée lorsque la protéine C1q est immobilisée, mais ne l'est pas lorsqu'elle est soluble (Nauta et al, 2003).

La partie **N-terminale** de la PTX3, quant à elle, interagit spécifiquement avec le facteur de croissance FGF2/bFGF(basic Fibroblast Growth Factor). Cette interaction permet l'inhibition

de l'activité mitotique du FGF2, en empêchant la fixation de celui-ci au niveau de son récepteur (Rusnati et al, 2004; Comazzi et al, 2006).

La production de PTX3 est régulée. Contrairement aux protéines de la sous-famille des pentraxines courtes qui sont sécrétées par les hépatocytes au niveau du sang, la PTX3 est sécrétée par une large gamme de types cellulaires, dans les tissus enflammés. Un signal pro-inflammatoire primaire (IL-1, TNF- $\alpha$  et les agonistes des différents TLR (Toll-like Receptor)) stimule en effet la sécrétion de la PTX3 par différents types cellulaires comme les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages, les adipocytes, les cellules musculaires lisses (CML), les cellules dendritiques, les cellules synoviales et les chondrocytes.

Nous avons donc recherché dans la littérature si cette protéine pouvait jouer un rôle plus ciblé dans le contexte de l'athérosclérose. Premièrement, Rolph et al. ont montré que la PTX3 était surexprimée au niveau des stades avancés des plaques d'athérosclérose. Ils ont également montré que la surexpression de la PTX3 était en grande partie liée aux cellules endothéliales et aux macrophages, mais également dans une moindre mesure aux CML (Rolph et al 2002). Cette observation semble cohérente. En effet, l'athérosclérose est une pathologie où la composante inflammatoire joue un rôle primordial. Le taux artériel en cytokines pro-inflammatoires est donc élevé et induirait la surexpression de la PTX3. Deuxièmement, il a été montré que les LDL modifiées étaient capables d'induire la sécrétion de PTX3 par les CML (Klouche et al. 2004). Nous avons donc recherché quelles pouvaient être les conséquences d'un taux anormalement élevé de PTX3 au niveau des lésions athérosclérotiques.

Il a été démontré que la PTX3 pouvait augmenter la sécrétion du facteur tissulaire (TF ou tissue factor) par les cellules endothéliales préalablement activées par un signal inflammatoire (IL-1, TNF $\alpha$ , LPS,...). La PTX3 pourrait donc augmenter la concentration du TF au niveau des plaques d'athérosclérose en augmentant la sécrétion de celui-ci par les cellules endothéliales voisines de la lésion (Napoleon et al. 2002). Or, il a été démontré que la concentration en TF au niveau de la plaque d'athérosclérose, était un bon indicateur de sa thrombogénicité (Badimon et al. 1999). En effet, lors de la rupture de la plaque, plus la concentration en TF sera importante plus la réaction de coagulation sera vive. Il est donc possible que la PTX3 augmente la thrombogénicité d'une lésion en augmentant la sécrétion de TF par les cellules endothéliales.

Il a aussi été démontré que la PTX3 pouvait se fixer au niveau des cellules apoptotiques et de ce fait diminuer l'internalisation de celles-ci par les cellules dendritiques (DC) matures. Ce phénomène est en soi intéressant, car il permet de diminuer les phénomènes d'auto-immunité (Rovere et al. 2000). Mais, la PTX3 semble également impliquée dans la modulation de l'élimination des cellules apoptotiques par d'autres types cellulaires, dont les macrophages et cela via un processus dépendant en partie de la diminution de la capacité de liaison des cellules apoptotiques aux macrophages (Van Rossum et al, 2004). Or, une diminution de l'élimination des cellules apoptotiques au niveau des plaques athéromateuses, entraîne une évolution de celle-ci d'un stade précoce à un stade plus tardif. En effet, l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques va induire de nombreux phénomènes pro-athérogéniques : une sécrétion accrue de TF par les cellules apoptotiques, ce qui augmente la thrombogénicité de la plaque ; le développement du cœur nécrotique et le relargage de la thymidine phosphorylase, un facteur pro-angiogénique lors de la nécrose secondaire des macrophages apoptotiques ; la sécrétion de protéases par les macrophages voisins du cœur nécrotique, ce

qui augmente encore l'instabilité de la plaque ; et enfin une augmentation de l'apoptose des macrophages.(Tabas 2005).

Comme mentionné ci-dessus, la PTX3 inhibe aussi l'activité mitotique du FGF2. Or on sait que le FGF2 est impliqué dans la prolifération des CML au niveau des plaques d'athérosclérose et donc dans la formation de la néo-intima (Comazzi et al, 2005). On n'exclue donc pas que la PTX3 puisse limiter l'action du FGF2, bien qu'un effet inhibiteur éventuel sur la croissance de la néo-intima reste à démontrer.

La PTX3 semble donc une protéine relevante dans le contexte de l'athérosclérose, de plus, Peri et al (2000) observant qu'elle augmente dans le sang des patients ayant fait un infarctus du myocarde, l'avaient d'ailleurs proposée comme biomarqueur de la pathologie. Nous devons encore confirmer la surexpression de la PTX3 par western blot. En cas de confirmation, il est clair que la surexpression de la PTX3 induite par le LPA, que nous avons mise en évidence par les gels 2D-DIGE, constitue une donnée nouvelle prometteuse donnant un nouvel éclairage à cette molécule ambivalente qu'est le LPA, dans le contexte de l'athérosclérose.

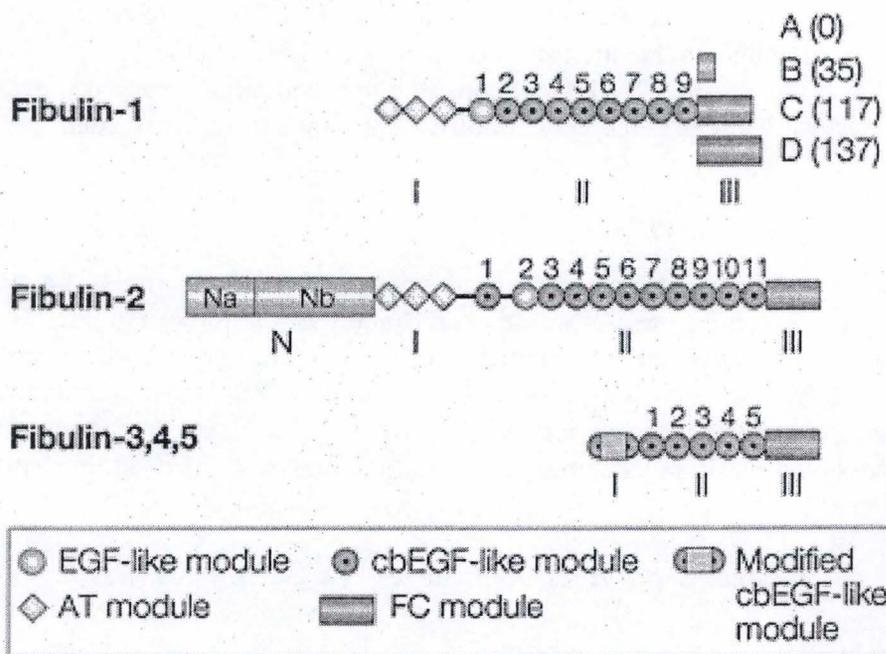
#### 4.3.3.2. La Stanniocalcine-2

La stanniocalcine (STC) est une glycoprotéine dimérique avec une fonction hormonale, sécrétée chez le poisson par les corpuscules de Stannius. Elle intervient chez le poisson dans la régulation de l'**homéostasie du calcium** (effet hypocalcémiant) et du **phosphate** via une stimulation de la réabsorption du phosphate inorganique (Pi) par les tubules proximaux du rein. L'injection de la stanniocalcine de poisson chez différents animaux terrestres dont l'homme, provoque une hypocalcémie et laisse donc penser qu'il existe un homologue chez les Mammifères.

En effet, chez l'homme, 2 protéines homologues ont été découvertes, la stanniocalcine-1 (STC1) et la stanniocalcine-2 (STC2). La STC1 est l'isoforme la mieux caractérisée, elle se rapproche de la STC du poisson et son implication dans différents processus physiologiques a été démontrée. Il existe des récepteurs à la STC1 au niveau de la membrane plasmique, mais de manière plus surprenante, également au niveau de la membrane mitochondriale interne. La fixation de la STC1 à ces **récepteurs mitochondriaux** provoque la stimulation du transport électronique mitochondrial et donc influence le métabolisme cellulaire (McCudden et al, 2002). Signalons qu'une étude a montré la surexpression de la STC1 par des cellules endothéliales, stimulées avec de la lysophosphatidylcholine (LPC) qui comme le LPA est aussi un composant des oxLDL et un précurseur du LPA. La STC1 pourrait donc avoir une implication dans le contexte de l'athérosclérose (Sato et al, 1998).

La STC2, découverte en 1998 par l'équipe de Chang et ses collaborateurs, est par contre beaucoup moins connue. La STC2 présente 41 % d'identité avec la STC1. Elle se trouve en conditions non-dénaturantes sous forme homo-dimérique, le monomère présentant un poids moléculaire 34 kDa pour une chaîne de 302 acides aminés de long, avec 2 sites de O-glycosylation. Une des particularités de cette séquence est un regroupement (cluster) d'histidines à son extrémité C-terminale, se qui laisse supposer une interaction possible avec différents ions (notamment des formes ioniques du nickel) (Chang et al, 2003).

Peu de données sont disponibles quant à ses fonctions. On peut néanmoins souligner qu'elle est fortement exprimée au niveau du cœur, des muscles squelettiques, du rein, du pancréas et de la rate. Si l'on surexprime de manière ubiquiste la STC2 humaine chez la souris, celle-ci



**Figure III.10** : Représentation schématique des différents domaines rencontrés chez les différents membres de la famille des fibulines.

présente un phénotype dit de souris naine. Ces souris présentent un retard dans leur développement ; celui-ci est lié à une perturbation de la croissance cellulaire par un mécanisme indépendant d'une modification de la voie GH/IGF. Ces souris présentent également un ralentissement du développement de leur squelette et des muscles squelettiques, ce qui suggère un rôle de la STC2 au niveau de ces 2 cibles (Gagliardi et al, 2005).

La stanniocalcine-2 joue aussi un rôle au niveau des ovaires en étant impliquée dans le développement folliculaire. En effet, la STC2 voit son expression régulée au niveau des ovaires par la gonadotropine et les estrogène. L'action paracrine de cette glycoprotéine permet notamment l'inhibition de la sécrétion de la progestérone induite par la gonadotrophine. Cette régulation de la progestérone est importante dans des processus comme la gestation et l'ovulation. De plus, une régulation de l'expression de la STC2 par les oestrogènes a été également mise en évidence dans les cellules cancéreuses du sein répondant aux oestrogènes, ce qui suppose la présence d'un ERE (Estrogen Responsive Element) dans la séquence promotrice du gène de la STC2 (Luo et al, 2005).

Tout comme la STC1, la STC2 semble aussi impliquée dans la régulation de l'homéostasie du calcium et du phosphate. Il est envisageable que cette protéine soit impliquée dans l'athérosclérose notamment en modulant le processus de calcification de la plaque athéromateuse, mais également en perturbant l'activité des différentes métalloprotéases impliquées dans le remodelage de la MEC.

Enfin, Ito et ses collaborateurs (2004) ont montré qu'une réponse UPR (Unfolded Protein Response) provoquait une surexpression de la stanniocalcine-2. Cette surexpression permet une plus grande résistance des cellules stressées à l'apoptose. Or, lors du développement des plaques d'athérosclérose, les différents types cellulaires en présence sont soumis à un stress oxydatif inducteur d'une réponse UPR, ce qui pourrait induire la surexpression de la STC2. Or, celle-ci est impliquée dans la modulation de la réponse apoptotique et pourrait donc avoir une incidence sur le développement de la plaque d'athérosclérose (Tabas, 2005).

Après avoir confirmé ou non la surexpression de la STC2 par western blot, il nous faudra donc essayer de décortiquer les fonctions que cette protéine pourrait jouer dans la réponse des cellules endothéliales au LPA, entre autres via l'approche des siRNA.

#### 4.3.3.3. Les fibulines

La famille des fibulines, dont le nom provient du terme latin *fibulina* (fibule), est un ensemble de protéines extracellulaires dont le premier membre, la fibuline-1 fut décrit en 1989. Il s'agit d'une famille de glycoprotéines composées de 6 membres, les fibulines 1-6 dont la taille varie de 367 à 1196 résidus et dont la structure comporte 3 domaines. Le domaine I présente un motif propre à chaque fibuline ; dans le cas de la fibuline-3, il s'agit d'un motif cbEGF-like modifié (calcium-binding Epidermal Growth Factor). Le domaine II pour toutes les fibulines est composé d'une succession variable de motifs cbEGF ; on en retrouve 5 pour les fibulines-3,4 et 5. Ce domaine permet l'interaction calcium-dépendante entre la fibuline et les autres constituants de la MEC (matrice extracellulaire). Le domaine III, quant à lui, est un motif de forme glomérulaire appelé FC (Fibulin Type Carboxyl terminus) qui est commun à l'ensemble des fibulines et des fibrillines. La structure générale de la fibuline 3, tout comme celle de la 4 et 5 comporte une partie linéaire (domaine I et II) reliée au domaine glomérulaire III (Timpl et al, 2003) (Figure III.10).

### Pentraxine 3

AACCTTGTAGAATAATATAATGTCCACATAATAC**CAAGTTATGAAAAGAA** -951  
ACATACCTAAATAACTAAATAAGTATATTCCTTTTTTCCCCAGCTTTTT -901  
TTCCCCATTCTAGGTTTACCCAGTTGTACTGTGTTGTTTGTATAGGCCG -851  
GGTGAGGTGGCTCACGTCTGTAATCCTAGCAATTTGGGAGGCCGAAGGCCG -801  
**CREB**  
GTGGATCGCC**TGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGCTAACATGGTGA** -751  
AACCCCTGTCTCTACTAAAAATACAAAATTA**ACTGGGTGTGGTGGCGGGT** -701  
GCCTGTAATTCCAGCTACTTGGGAAGCTGAGGTAGGAGAATCGCTTGAAC -651  
CCAGGATGCGGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACACCATTGCACTCCAGC -601  
**TATA**  
CTGGGCAACAAGAGCGAAATTCAGTCTCAAAAAAAAAAATTAT**CTATAAA** -551  
**AGTATAGGTGCAACTCCTCAAGTATTAAGACAAGATAGCTCGGATTGGA** -501  
CTTGACTTTCAGAGCCATAACTATCTTAATATGTTGGTTTATCTTGGA -451  
TCAGACCATTTTCAGTTTCAACCTGTAAACAGTGTACAAAGGAAACATG -401  
**C/EBPβ**  
GAAAGTTTTCTATATATAAAGGGTTGTGAAATAATAACAGCTCACAGAAA -351  
ATGCTGAAATGATGATTTGCTTCAGTACCCTCTGAAATTTCTCCCCTACC -301  
ACCCCTCCTTCATCCCATTGCTATCAATTCAAATTACAACAGCTAATTC -251  
TCAGGAGAACAGTAGAAGCCCAGTTTCTCTCCTCTTTCCCCTCTGACCCT -201  
**C/EBPβ**  
CCTCCAATTAATCTGACTGCAGCGTAAACCTTTGCGGTTTA**ATATTGTGC** -151  
**SP-1**  
**AACTTCCACATTTCCCTCGCTCTCCACCCAGCCCCCTCCCCACCAAAT** -101  
**NF-κB**  
TCAGGGGA**ACTCCC**GTTACCGCAGTGCCACCAGCATTACTCATT**CATCCC** -51  
CATT**CAGGCTTTCCTCAGC**ATTTATTAAGGACTCTCTGCTCCAGCCTCTC -1  
ACTCTCACTCTCCTCCGCTCAA**ACTCAGCTCACTT**GAGAGTCTCCTCCCG 49  
CCAGCTGTGGAAAGAACTTTGCGTCTCTCCAGCAATGCATCTCCTTGCGA 99

**Figure III.11** : Position des différents sites de liaison aux facteurs de transcription, désignés en gras, au niveau d'une séquence de 1000 pb en amont du site +1 du gène *ptx3*.

Comme signalé précédemment, nous n'avons pas encore pu préciser quelle isoforme de la fibuline était surexprimée au niveau du sécrétome dans les cellules endothéliales stimulées avec le LPA. Il est donc difficile d'évaluer à ce stade l'impact possible de cette surexpression. Parmi ces différentes isoformes, signalons que la fibuline-5 semble particulièrement intéressante dans le contexte de l'athérosclérose, car elle modulerait le potentiel redox vasculaire en liant la superoxyde dismutase extracellulaire (ecSOD) (Nguyen et al, 2004).

#### **4.3.4. Analyse bioinformatique du promoteur des gènes codant pour la PTX3 et la STC2**

Nous avons vu que le LPA pouvait via ses récepteurs activer un grand nombre de voies qui aboutissent à l'activation de différents facteurs de transcription. Il nous a semblé opportun d'analyser les promoteurs des deux gènes encodant les protéines identifiées présentant une variation d'abondance significative, afin de voir s'il existe effectivement une corrélation entre les voies activées par le LPA et les sites théoriques de fixation des facteurs de transcription (FT) présents au niveau des séquences promotrices de ces gènes. Ce type d'analyse devrait nous permettre d'émettre des hypothèses sur les différents mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'expression de ces protéines par le LPA.

La séquence promotrice des gènes codant pour les différentes protéines d'intérêt est récupérée grâce à la base de donnée TRED (Transcriptional Regulatory Element Database) accessible à l'adresse (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home>). Nous avons décidé de considérer comme séquence promotrice **les 1000 bases en amont du site +1**, mais il est bien évident que des éléments régulateurs peuvent se trouver dans des zones bien plus éloignées. Cette séquence est ensuite analysée par le programme TFSEARCH à l'adresse (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), qui permet de repérer les différents sites de fixation plausibles présents au niveau de la séquence promotrice, en leur attribuant à chacun un score. De l'ensemble des sites proposés, nous avons éliminé tous ceux qui ne sont pas présents chez l'homme ainsi que ceux qui présentent un score trop faible. Il nous reste donc au niveau de la séquence promotrice les sites de fixation des facteurs de transcription potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression de ces gènes dans le modèle utilisé dans ce travail.

##### **4.3.4.1. La pentraxine-3**

L'analyse de la séquence promotrice du gène codant pour la pentraxine-3 nous a permis d'identifier, une TATA BOX et 6 sites de liaison de FT putatifs (Figure III.11). Il s'agit de 3 sites de liaison pour C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein), 1 site de liaison pour CRE (cAMP responsive element), 1 site de liaison pour Sp1 (Specificity protein 1) et 1 site de liaison pour NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B). Intéressons-nous maintenant aux données de la littérature pour mieux comprendre le rôle que pourraient jouer ces différents FT dans la régulation de l'expression génique de la PTX3 par le LPA.

Le FT NF- $\kappa$ B est sans doute le candidat le plus intéressant pour expliquer la régulation de l'expression de *PTX3* orchestrée par le LPA. C. Gustin a déjà mis en évidence au laboratoire, par un test colorimétrique (le test Trans-AM), une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de ce FT après stimulation des cellules EAhy926 avec du LPA (Gustin et al., article en soumission). D'autres équipes ont également mis en évidence une translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau dans de nombreux types cellulaires stimulés en présence de LPA (Cummings et al, 2004 ; Shahrestanifar et al, 1999). L'activation de NF- $\kappa$ B par le LPA joue un rôle important dans de nombreux processus tels que la sécrétion du TF et de l'IL-8. L'activation du FT NF- $\kappa$ B passerait par diverses voies dépendantes du type cellulaire : par exemple, dans

les cellules épithéliales, c'est une voie dépendante de la PKC $\delta$  qui a été mise en évidence (Cummings et al, 2004 ;Saatian et al, 2006) . Mais dans d'autres types cellulaires, tels les fibroblastes, la voie des Rho Kinases (Shahrestanifar et al, 1999) a été décrite pour induire cette activation.

Basile et al. avaient déjà montré en 1997, la présence de ce site de liaison pour NF- $\kappa$ B et son importance dans l'induction de la *PTX3* par IL-1, le TNF- $\alpha$  et le LPS. L'importance fonctionnelle de ce site avait été mise en évidence par sa délétion, ce qui entraînait une perte totale de l'induction par le TNF- $\alpha$  de la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle de la séquence promotrice mutée du gène *PTX3*. Ces auteurs ont également démontré par retard sur gel et 'supershift', que la forme homo-dimérique p50/p50 et la forme hétéro-dimérique p65/p50 du facteur NF- $\kappa$ B se fixaient au niveau de ce site  $\kappa$ B (Basile et al, 1997).

Le facteur de transcription **Sp1** est un activateur transcriptionnel ubiquiste de 778 acides aminés appartenant à la famille des FT Sp dont 4 membres sont actuellement décrits, Sp1, Sp2, Sp3 et Sp4. Le site de liaison du FT Sp1 correspond à des régions de l'ADN riches en GC, appelées GC-BOX. Il s'y fixe par son domaine de liaison à l'ADN contenant 3 doigts de zinc. A côté de ce domaine de liaison à l'ADN situé du côté C-terminal, il existe un domaine N-terminal riche en glutamine qui permet son activation transcriptionnelle, celle-ci étant modulée par la phosphorylation et la glycosylation. Différentes interactions homotypiques et hétérotypiques de Sp1 ont été décrites, notamment avec la TBP (TATA box binding protein), différents facteurs associés à la TBP, un large complexe de coactivation appelé CRSP (cofactor required for Sp1 activation), ainsi que différents facteurs de transcription (Suske, 1999).

Le ratio Sp1/Sp3 est un autre élément important de la régulation exercée par Sp1. En effet, le FT Sp3 dont l'action répressive ou activatrice est modulée par les coactivateurs auxquels il est lié, se fixe également aux GC-BOX. C'est donc le ratio Sp1/Sp3 qui va déterminer dans quelle proportion chacun de ces FT sera lié à la séquence promotrice et donc leur influence respective sur la transcription du gène. Par exemple, il a été montré au niveau de cellules endothéliales, que l'augmentation du ratio Sp1/Sp3 augmentait la transcription du gène *KDR/flk-1*, ce qui indique que dans ce cas précis Sp3 avait un rôle de répresseur (Suske, 1999). Une modification de ce ratio Sp1/Sp3 par le LPA pourrait donc influencer le taux de transcription du gène *PTX3*.

L'analyse des LTR (long terminal repeat) du virus HIV-1 (Human immunodeficiency virus type 1) peut nous faire découvrir d'autres mécanismes possibles utilisés par Sp1 pour réguler la transcription du gène *PTX3*. En effet, au niveau de ces LTR, on trouve la séquence promotrice du gène *tat* qui contient 3 GC-BOX et dont l'analyse a révélé deux nouvelles fonctions de Sp1. Premièrement, la protéine Sp1 est responsable de l'activité transcriptionnelle basale de *tat* (Majello et al, 1994). Elle pourrait donc être également impliquée dans l'activité basale du gène *PTX3*, car celle-ci disparaît lors de la délétion de la GC-BOX au niveau de sa séquence promotrice (Basile et al, 1997). Deuxièmement, l'interaction entre Sp1 et le FT NF- $\kappa$ B semble nécessaire à l'augmentation de la transcription du gène *tat* (Majello et al, 1994). On peut donc imaginer que le LPA provoquerait la translocation de NF- $\kappa$ B au niveau du noyau, où il se lierait au site  $\kappa$ B de la séquence promotrice de *PTX3* et augmenterait sa transcription grâce à son interaction spécifique avec Sp1, qui lui était déjà présent au niveau de la séquence.

Le FT de transcription **C/EBP<sub>β</sub>/NF-IL6** (nuclear factor - interleukine 6) appartient à la famille de FT C/EBP composée de 6 membres : C/EBP<sub>α, β, γ, δ, ε, et ζ</sub>. Ils possèdent tous un domaine C-terminal 'basic leucine zipper' (bZIP), qui permet l'homo- et l'hétéro-dimérisation, ainsi que la liaison à l'ADN. Leur partie N-terminale par contre est beaucoup plus variable, sauf dans 3 sous-régions conservées qui sont les domaines d'activation. C/EBP<sub>β</sub> est impliqué dans la régulation de nombreux processus comme la différenciation cellulaire, le contrôle du métabolisme, la prolifération cellulaire, la mémoire, mais également l'inflammation. En effet, il est impliqué dans la régulation de l'expression génique de nombreux gènes encodant des protéines liées à l'inflammation, dont notamment les gènes codant pour les deux membres de la famille des pentraxines courtes (Ramji et Foka, 2002).

Le LPA peut moduler l'activité de C/EBP<sub>β</sub> soit via une régulation transcriptionnelle, via une régulation traductionnelle, soit via des modifications post-traductionnelles. Cette dernière régulation s'effectue notamment par la phosphorylation de différents résidus conduisant à une activation ou à une inhibition de la capacité transactivatrice de C/EBP<sub>β</sub>. Le LPA via les voies Ras/MAPK, PKC, Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline Kinase,... permet l'activation de C/EBP<sub>β</sub>, tandis que les voies de la PI3K, la PKC, la PKA,... provoquent son inhibition; c'est donc l'intégration de l'ensemble des différentes voies régulées qui va déterminer l'activité transactivatrice de C/EBP<sub>β</sub> (Ramji et Foka, 2002). En plus de cette action individuelle de C/EBP<sub>β</sub>, celui-ci peut interagir avec différents effecteurs de la régulation transcriptionnelle, ce qui modifie leur action. En effet, une interaction entre le domaine c-rel de NF-κB et le domaine bZIP de C/EBP<sub>β</sub>, permet une action synergique de ces deux facteurs entraînant une forte amplification de l'expression génique de l'IL-6 et de l'IL-8 (Matsusaka et al, 1993).

**CREB** forme avec CREM et ATF-1 une famille de FT activables par l'AMPc. CREB est un facteur de transcription nucléaire qui au repos se trouve fixé sous forme dimérique au niveau d'un site CRE de l'ADN (cAMP responsive element). Il sera activé par différentes voies de signalisation qui provoqueront sa phosphorylation. L'analyse de la structure de CREB révèle qu'il est composé à son extrémité C-terminale, d'un domaine bZIP permettant sa dimérisation et sa liaison au site CRE, et à son extrémité N-terminale d'un domaine KID (Kinase-inducible domain), où se trouvent les résidus phosphorylables modulant son activité et deux domaines riches en glutamine permettant l'interaction entre CREB et d'autres composants de la machine de transcription, dont CBP (CREB binding protein) (Montminy, 1997).

Le principal activateur de CREB est l'AMPc. Le LPA peut exercer un effet inhibiteur sur l'adénylate cyclase (AC) et donc empêcher une augmentation de la concentration cytosolique en AMPc. Mais d'autres voies parallèles stimulées par le LPA comme celles de Ras/MAPK, de la PI3K ou de la PLC, peuvent aussi activer la voie CREB (Carlezon et al, 2006). Récemment, il a été mis en évidence que le LPA pouvait au niveau des CML stimuler l'expression de Egr-1 via une action conjuguée de CREB et SRF (Cui et al, 2006). Ce résultat démontre que le LPA peut stimuler l'activité de CREB et que celui-ci peut agir en synergie avec d'autres facteurs de transcription.

En résumé, les divers sites de liaison décrits au niveau du promoteur du gène encodant la PTX3, sont reconnus par des TF, qui apparaissent comme des cibles potentielles des voies de signalisation activées par le LPA. Mais, la présence d'un site de liaison à un TF donné, ne démontre pas qu'il est fonctionnel dans le cas d'une stimulation par le LPA. A terme, il faudra donc envisager de déléter ces différents sites dans le promoteur authentique de *PTX3* et de voir l'impact de ces délétions sur l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur authentique muté, après stimulation avec du LPA. Cette approche se heurte

**Stanniocalcine-2**

GGAGGAGATGGAGATAACTTCCCCGATTAGCTTTTTTGTCTTTGTTTT -951  
TGTTCTCACCCTTCCATCGGATGACTGGAGAGTAAAAGGGAACCCGGAG -901  
CGGGGTGGCGAGCAGCGCTTTGAGAAAATGCAGGAGTGTGTTTGGAGACG -851  
CGTAAAGTTGCCTTTCAAGCTCTGGCCTCCGGGCACGCGATGCTCCGCGG -801  
**AP-1**  
CGGGCTGACTCAGGGCTGCCTTGGGCCTCCCTGCCACCCTCCTGGAAATG -751  
ATGCAAGTCCTGACTGTCACCTGGATCCCTGCAGCCCAGCCTGGAATGCG -701  
TCTGGATTAGGGGAAAGACGAGAAACGACACTCCAGGTGTTGCACGGCCC -651  
**GATA**  
ACCAAAGCGGGAAGATAGGGCAGTTGCTCAGACCAAATACTGTATCTAGT -601  
**GATA**  
GCTTCTGCTCCTATCTTCAATCGTGGGGTTCTTTTAAATGCAAAGTGTC -551  
**NF-KB**  
CAAGGCCAGGAATTCCCATGTGTGCTCAGTTGGCCACAGCATCATTGTG -501  
CCTAGGAACTGCTTCAATTTATCAAGTCCTCTGGGCTGGGAATCTCACT -451  
**C/EBP**  
GAATCCAAACGGCGGAAAGAGGAAACTTTCCCAACCCGATGTGGGTGTG -401  
ACGCGAGCCAGGGGCCCCAGGGACACTGTCCCAGAGCACACCGTCCCCCT -351  
TTAACAGCAACTGGAGCTTGGATTCGCTCTTATATTGTACAGTCCTTTCG -301  
ACCATTGCCCTGGAGCACCCGCACACGCGCACGCATCTCCGGCCGCGCTC -251  
ACACACACTCATAACACACGCACGCAAACGCGTGGCCGCCGCCAGGTCCGGC -201  
AACTTTGTCCGGCGCTCCAGCGGCGCTCGGCTTCTCCTGTAGTAGTTG -151  
**SP-1**  
AGCGCAGGCCCGCCTCCCGGCCGTGTTGTCAAAGGGCCGGGGTCTCGG -101  
ATTGGTCCAGCCGCGGGACAACACCTGCTCGACTCCTTCATTCAAGTGA -51  
CACCAGAGCTTCCAGGGATATTTGAGGCACCATCCCTGCCATTGCCGGGC -1  
ACTCGCGGCGCTGCTAACGGCCTGGTACATGCTCTCCGGAGAGCTACGG 49  
GAGGGCGCTGGGTAACCTCTATCCGAGCCGCGGCCGCGAGGAGGAGGGAA 99

**Figure III.12** : Position des différents sites de liaison aux facteur transcription, désignés en gras, au niveau d'une séquence de 1000 pb en amont du site +1 du gène *STC2*.

cependant à une difficulté majeure : les cellules endothéliales en général, mais aussi les cellules EAhy926, sont très récalcitrantes à la transfection.

#### 4.3.4.2. La stanniocalcine-2

Notre analyse de la séquence promotrice du gène codant pour la stanniocalcine-2 nous a permis d'identifier 6 sites de liaison de FT probables (Figure III.12). Il s'agit de 2 sites de liaison pour GATA, d'un site de liaison pour C/EBP $\beta$ , d'un site de liaison pour AP-1 (Activating protein -1), d'un site de liaison pour Sp1 et d'un site de liaison pour NF- $\kappa$ B. Signalons que parmi l'ensemble des sites probables intervenant dans la régulation de l'expression de ce gène, nous retrouvons des sites pour NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  et Sp1 déjà décrits pour le gène encodant la pentraxine-3, ce qui suggère des mécanismes de régulation en partie communs. Nous ne décrivons donc ici que les sites pour les FT AP-1 et GATA.

Les FT **GATA** forment une famille de facteurs de transcription à laquelle appartiennent 6 isoformes (GATA 1-6) dont la caractéristique commune est de posséder un domaine de liaison formé de 2 doigts de zinc qui reconnaît préférentiellement la séquence consensus (A/T)GATA(A/G). En plus de ce domaine de liaison à l'ADN, on trouve généralement une séquence NLS (nuclear localization sequence) et un domaine de transactivation. La famille GATA est divisée en deux grandes sous-familles, la première, comprend les FT GATA 1-3 qui sont principalement décrits comme des régulateurs de la différenciation des cellules hématopoïétiques. La seconde, comprend les FT GATA 4-6 dont l'expression différentielle au cours du développement dans les cellules du mésoderme et de l'endoderme intervient dans la formation de différents organes. Nous n'avons pas pu déterminer la(les)quelle(s) de ces isoformes se fixai(en)t préférentiellement au niveau du promoteur du gène codant pour la stanniocalcine-2, car les séquences de leurs sites de liaison sont fort similaires. C'est donc l'expression différentielle de ces isoformes au sein des différents types cellulaire qui va en priorité déterminer la(es)quelle(s) se fixera(ont) (Molketin, 2000). Nous ignorons à l'heure actuelle le profil d'expression des FT GATA au sein des cellules EAhy926.

Actuellement, seules les isoformes GATA 3 et 4 sont impliquées dans un processus de réponse cellulaire rapide. Par exemple, GATA 4 intervient dans la réponse hypertrophique des cellules cardiaques. Celle-ci est médiée par une activation de GATA 4 via la voie RhoA/MAPK et son interaction avec NFAT3, NKx2.5 et SRF. Le LPA pourrait donc augmenter l'expression du gène *PTX3* via la voie RhoA/MAPK. Il est intéressant de noter la présence au niveau de la séquence promotrice de *PTX3* de 2 sites de liaison pour le FT NKx 2.5 écartés lors de l'analyse bioinformatique, car ce FT n'est présent qu'au niveau des cellules musculaires cardiaques. Les interactions NKx 2.5-GATA 4 pourraient expliquer l'expression importante du gène *PTX3* au niveau du cœur (Patent et McGhee, 2002).

Le terme **AP-1** regroupe une famille de FT formés de dimères de Jun (v-Jun, c-Jun, JunB et JunD), Fos (v-Fos, c-Fos, FosB, Fra1 et Fra2) et ATF (Activating transcription factor) (ATF2, ATF3 et B-ATF) interagissant par un domaine bZIP. Il existe plusieurs sites reconnus de liaison à l'ADN, avec une affinité propre à chaque dimère. Parmi les sites reconnus par AP-1, on retrouve le site CRE présent notamment dans la séquence promotrice de la pentraxine-3 (Karin et al, 1997).

L'activité transactivatrice d'AP-1 peut-être stimulée soit par une augmentation de l'abondance d'une ou plusieurs protéines de base participant à sa formation, soit via des modifications post-traductionnelles. Parmi les différentes voies modifiant l'activité transactivatrice d'AP-1, certaines telles que celles des MAPK JNK, ERK1/2 et p38 sont

activées par le LPA (Shaulian et Karin, 2002). Cette activation d'AP-1 par le LPA a d'ailleurs été mise en évidence par C. Gustin avec des cellules HeLa transfectées avec un plasmide rapporteur sous le contrôle d'AP-1, mais également via un test Trans-AM sur les cellules EAhy926.

## IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail, mené au sein de l'équipe du Prof. M. Raes, avait pour objectif d'étudier dans un modèle *in vitro* les effets du LPA sur un des acteurs clefs de l'athérosclérose, la cellule endothéliale. En effet, le dysfonctionnement de l'endothélium au niveau des grosses et moyennes artères entraîne une pénétration accrue des LDL au niveau de l'intima, qui s'y oxydent en oxLDL. La formation des cellules spumeuses résulte de l'internalisation non-régulée de ces oxLDL par des macrophages recrutés au niveau de la paroi artérielle par l'endothélium activé. Le LPA est un médiateur lipidique présent au niveau des oxLDL et en quantités anormalement élevées au niveau des plaques d'athérome. Ce lipide bioactif a de nombreux effets, parmi lesquels l'activation et l'augmentation de perméabilité de l'endothélium (Siess, 2002). C'est pourquoi nous avons analysé, par des approches cellulaires et protéomiques, les effets du LPA sur une lignée de cellules endothéliales humaines, en vue de mieux comprendre le rôle que pourrait jouer ce lipide dans l'athérogenèse.

Au **niveau cellulaire**, nous avons pu mettre en évidence un effet positif du LPA sur la réparation d'une lésion induite au niveau d'un tapis cellulaire. Cet effet est supérieur pour une concentration en LPA de 1  $\mu\text{M}$ , comparé aux effets obtenus avec le LPA à 25 et 100  $\mu\text{M}$ . Nous avons ensuite montré que cette moindre capacité réparatrice des cellules endothéliales aux concentrations supérieures, n'était pas due à une diminution de leur potentiel prolifératif. En effet, l'analyse de l'évolution de la biomasse des cellules EAhy926 stimulées avec du LPA, montre que la croissance est supérieure après 48 heures pour les cellules incubées en présence de LPA 25  $\mu\text{M}$  par rapport aux cellules incubées avec du LPA 1  $\mu\text{M}$ .

C'est donc plutôt la **diminution de la migration cellulaire**, un autre processus nécessaire à la réparation d'une lésion induite, qui semble être la cause de l'effet réparateur moindre à des concentrations plus élevées en LPA. Pour pouvoir se déplacer, une cellule doit modifier son cytosquelette. Ces modifications sont principalement régulées par la famille des protéines G Rho. RhoA et Rac1 sont les 2 membres les mieux caractérisés. RhoA intervient dans le réarrangement du cytosquelette, tandis que Rac1 contribue à la formation des lamellipodes. La fixation du LPA au niveau de ses récepteurs permet l'activation de ces deux voies. En effet, la protéine  $G_i$  couplée aux récepteurs LPA<sub>1,2</sub> et 3 va, via la voie PI3K-Tiam1, activer Rac1, tandis que la protéine  $G_{12/13}$  couplée aux récepteurs LPA<sub>1,2</sub> permet l'activation de RhoA (Figure III.4).

Pour expliquer les effets divergents du LPA selon la concentration utilisée, nous proposons sur la base de données de la littérature, un **modèle explicatif** basé sur la modification des rapports entre l'activation de la voie RhoA et de la voie Rac1, en fonction de la concentration en LPA. Une stimulation avec une faible concentration en LPA (1  $\mu\text{M}$ ) va entraîner, via une activation rapide de la voie  $G_{12/13}$ -RhoA la contraction du cytosquelette nécessaire au décrochage cellulaire du substrat. L'activation de la voie  $G_i$ -Rac1 va entraîner, quant à elle, l'inhibition de la voie RhoA (Van Leuween et al, 2003) et la formation de lamellipodes, événements indispensables à la migration cellulaire. Par contre, des concentrations plus élevées en LPA, peuvent induire une activation plus intense de la voie RhoA, entraînant l'inhibition de Rac1 et le maintien du cytosquelette contracté via les fibres de stress (Figure III.4). L'observation morphologique des cellules EAhy926 lors du test de la blessure induite, appuie ce modèle. En effet, à une concentration de 1  $\mu\text{M}$  les cellules ont une forme allongée et présentent de nombreux pseudopodes. Par contre, en présence de LPA 25  $\mu\text{M}$ , les cellules sont plutôt arrondies avec un nombre moindre de pseudopodes. Ces 2 phénotypes sont révélateurs d'une variation du potentiel migratoire en accord avec le modèle proposé.

Afin de compléter cette étude, il faudrait tout d'abord analyser le **potentiel prolifératif** de cellules stimulées, avec du LPA 100  $\mu\text{M}$ . Cette analyse nous permettrait de savoir si la diminution de la capacité des cellules endothéliales à réparer une lésion induite entre 25 et 100  $\mu\text{M}$  est liée à une inhibition encore plus forte du potentiel migratoire ou à l'apparition d'une perturbation du potentiel prolifératif aux concentrations supérieures à 25  $\mu\text{M}$ . Il serait également intéressant de réaliser les tests de réparation et prolifération avec une gamme de **concentrations inférieures à 1  $\mu\text{M}$  en LPA**, afin de déterminer quelles seraient les concentrations optimales respectivement pour la réparation d'une lésion induite et pour la prolifération cellulaire.

Une fois l'ensemble de ces résultats réunis, il faudrait vérifier le modèle proposé par une série d'expériences. Tout d'abord, nous pourrions vérifier par un **test fonctionnel** plus ciblé sur la migration cellulaire si l'augmentation de la concentration en LPA cause effectivement une diminution de la capacité migratoire des cellules EAhy926. Cette mesure est réalisée classiquement par un test de migration au sein d'une chambre de Boyden. Ensuite, il faudrait analyser par **Western Blot** la cinétique d'activation des principaux intervenants de la migration cellulaire, ce qui permettra de tester si les mécanismes de régulation proposés dans notre modèle hypothétique se vérifie. Si cette cinétique d'activation se confirme, nous pourrions employer différents **inhibiteurs chimiques** afin de tester l'importance des différents effecteurs dans la régulation de la migration. On trouve déjà des inhibiteurs pour bon nombre des intervenants proposés : la toxine pertussique (inhibiteur de  $G_i$ ), le LY294002 et la wortmanine (inhibiteurs des PI3K), le NSC23766 (inhibiteur de Rac1), la toxine botulique C3 (inhibiteur de RhoA), ... L'observation en **immunofluorescence** (IF) de l'agencement cytoplasmique du cytosquelette d'actine pourrait aussi nous renseigner sur le maintien ou non des fibres de stress et sur la formation des lamellipodes en fonction des concentrations en LPA, confirmant ainsi leur rôle respectivement dans l'inhibition ou l'induction de la capacité migratoire.

La deuxième partie de ce mémoire était consacrée à l'étude des effets du LPA sur l'expression génique dans les cellules endothéliales. Pour voir des effets significatifs du LPA sur l'expression génique, il faut des concentrations en LPA supérieures par rapport à celles stimulant la migration et la prolifération cellulaires, comme démontré par C. Gustin dans son projet de thèse et par d'autres auteurs (Cook, 1996).

Nous avons choisi une approche subprotéomique, en nous focalisant sur le sécrétome des cellules endothéliales. Pour cela, nous avons eu recours à une approche en gels 2D-DIGE pour analyser les variations d'abondance de protéines au sein du sécrétome pour des cellules EAhy926 stimulées pendant 4 heures avec du LPA 25  $\mu\text{M}$ . Nous avons décelé des variations significatives pour 25 spots avec un seuil fixé à 1,5 X. Nous avons donc eu recours à la spectrométrie de masse pour identifier les protéines correspondant à ces spots. Nous avons déjà pu identifier 2 protéines : la pentraxine-3 et la stanniocalcine-2. Un troisième spot correspond à un membre de la famille des fibulines.

Les autres spots présentant une variation d'abondance significative doivent encore être identifiés. C'est pourquoi, la réalisation de nouveaux gels préparatifs est en cours de réalisation pour déterminer quelle isoforme de la famille des fibulines présente une variation significative d'abondance et l'identité des autres protéines encore non identifiées. Enfin, il nous faudra confirmer les variations observées pour les différentes protéines identifiées par spectrométrie de masse. Pour cela, une analyse des variations d'expression au niveau ARNm (via RT - PCR en temps réel) et au niveau protéique (via Western blot) devra être réalisée. Par

ailleurs, ces analyses sont déjà en cours de réalisation au laboratoire en ce qui concerne la PTX3.

Cindy Gustin a montré au laboratoire que c'est après 4 heures de stimulation au LPA 25  $\mu$ M que l'on observe une augmentation de la sécrétion de l'IL-8 et du MCP1. C'est l'une des raisons pour lesquelles nous avons analysé le sécrétome après 4 heures de stimulation. Mais il n'est pas exclu que le temps nécessaire à l'augmentation de la sécrétion d'autres protéines soit supérieur à 4 heures. C'est pourquoi, il serait également intéressant d'analyser les variations d'abondance des protéines du sécrétome pour des temps de stimulation plus longs, par exemple 12 et 24 heures.

Les données actuellement disponibles sur les deux protéines déjà identifiées suggèrent qu'elles pourraient jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose. A notre connaissance, c'est la première fois qu'on démontre que le LPA induit l'expression de ces deux protéines. La PTX3 est un candidat extrêmement intéressant, car il intervient dans bon nombre de mécanismes pro-athérogènes : stimulation de la sécrétion du TF, modulation de l'élimination des cellules apoptotiques et intervention probable sur la voie de complément. Au-delà de leur rôle dans le développement de l'athérosclérose, leur présence au niveau de la circulation sanguine pourrait servir de marqueur moléculaire du développement d'une plaque d'athérome et donc du risque d'infarctus du myocarde. C'est déjà le cas, pour la PTX3 qui a été proposée par plusieurs auteurs comme marqueur de risque d'infarctus (Peri et al, 2000 ; Latini et al, 2004).

L'analyse bioinformatique des séquences promotrices des gènes encodant la PTX3 et la STC2, nous a permis d'identifier une série de FT potentiellement impliqués dans la régulation de l'expression des gènes encodant ces protéines. La confirmation du rôle de ces facteurs de transcription dans la régulation de leur expression, peut se faire de plusieurs manières. On peut tout d'abord vérifier si ces FT sont bien activés en présence de LPA, en suivant leur activité de liaison à l'ADN (par retard sur gel ou test colorimétrique) ou encore mieux leur activité transactivatrice avec un système rapporteur, c'est-à-dire un plasmide contenant un gène rapporteur tel le gène encodant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant plusieurs sites de liaison pour le FT à analyser. L'activité de la luciférase reflète l'activité transactivatrice de ce FT. Enfin, l'étude de l'effet de délétions ou de mutations dirigées au niveau de la séquence promotrice authentique du gène étudié, sur l'induction d'un gène rapporteur placé sous son contrôle, permet de réellement démontrer si les séquences reconnues par un FT au niveau du promoteur sont vraiment fonctionnelles. Un tel système rapporteur, avec le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur authentique du gène encodant la PTX3, constituerait alors un outil moléculaire de premier choix pour décortiquer les voies de signalisation complexes en aval des récepteurs au LPA, via des inhibiteurs chimiques et des siRNA ciblés.

En conclusion, les données recueillies dans ce travail, donnent un nouvel éclairage sur les propriétés biologiques du LPA, elles contribuent à mieux comprendre le rôle du LPA dans les étapes précoces de l'athérosclérose et devraient permettre à plus long terme d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques plus ciblées dans le contexte de cette pathologie.

## V. BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed, N. & Rice, G.E. Strategies for revealing lower abundance proteins in two-dimensional protein maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **815**, 39-50 (2005).
- Anliker, B. & Chun, J. Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **279**, 20555-8 (2004).
- Badimon, J.J., Lettino, M., Toschi, V., Fuster, V., Berrozpe, M., Chesebro, J.H. & Badimon, L. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* **99**, 1780-7 (1999).
- Baker, R.R. & Chang, H. A metabolic path for the degradation of lysophosphatidic acid, an inhibitor of lysophosphatidylcholine lysophospholipase, in neuronal nuclei of cerebral cortex. *Biochim Biophys Acta* **1483**, 58-68 (2000).
- Bandoh, K., Aoki, J., Taira, A., Tsujimoto, M., Arai, H. & 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**, 159-65 (2000).
- Basile, A., Sica, A., d'Aniello, E., Breviario, F., Garrido, G., Castellano, M., Mantovani, A. & Introna, M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. *J Biol Chem* **272**, 8172-8 (1997).
- Bette, L. Mise au point d'un système de transfection de cellules endothéliales et épithéliales humaines, pour étudier les effets de l'acide lysophosphatidique. in *URBC 48 (FUNDP, Namur, 2004)*.
- Bian, D., Su, S., Mahanivong, C., Cheng, R.K., Han, Q., Pan, Z.K., Sun, P. & Huang, S. Lysophosphatidic Acid Stimulates Ovarian Cancer Cell Migration via a Ras-MEK Kinase 1 Pathway. *Cancer Res* **64**, 4209-17 (2004).
- Bottazzi, B., Garlanda, C., Salvatori, G., Jeannin, P., Manfredi, A. & Mantovani, A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Curr Opin Immunol* **18**, 10-5 (2006).
- Bottazzi, B., Vouret-Craviari, V., Bastone, A., De Gioia, L., Matteucci, C., Peri, G., Spreafico, F., Pausa, M., D'Ettore, C., Gianazza, E., Tagliabue, A., Salmona, M., Tedesco, F., Introna, M. & Mantovani, A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* **272**, 32817-23 (1997).
- Camozzi, M., Rusnati, M., Bugatti, A., Bottazzi, B., Mantovani, A., Bastone, A., Inforzato, A., Vincenti, S., Bracci, L., Mastroianni, D. & Presta, M. Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N-terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. *J Biol Chem* (2006).
- Camozzi, M., Zacchigna, S., Rusnati, M., Coltrini, D., Ramirez-Correa, G., Bottazzi, B., Mantovani, A., Giacca, M. & Presta, M. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1837-42 (2005).

- Carlezon, W.A., Jr., Duman, R.S. & Nestler, E.J. The many faces of CREB. *Trends Neurosci* **28**, 436-45 (2005).
- Celis, J.E. & Gromov, P. 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr Opin Biotechnol* **10**, 16-21 (1999).
- Chakraborty, T.R., Vancura, A., Balija, V.S. & Haldar, D. Phosphatidic acid synthesis in mitochondria. Topography of formation and transmembrane migration. *J Biol Chem* **274**, 29786-90 (1999).
- Chang, A.C., Jellinek, D.A. & Reddel, R.R. Mammalian stanniocalcins and cancer. *Endocr Relat Cancer* **10**, 359-73 (2003).
- Chaudhuri, J.D. Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. *Med Sci Monit* **11**, RA52-62 (2005).
- Chun, J., Goetzl, E.J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K.R., Moolenaar, W., Pyne, S. & Tigyi, G. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* **54**, 265-9 (2002).
- Contos, J.J., Ishii, I. & Chun, J. Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* **58**, 1188-96 (2000).
- Cui, M.Z., Laag, E., Sun, L., Tan, M., Zhao, G. & Xu, X. Lysophosphatidic acid induces early growth response gene 1 expression in vascular smooth muscle cells: CRE and SRE mediate the transcription. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1029-35 (2006).
- Cummings, R., Zhao, Y., Jacoby, D., Spannhake, E.W., Ohba, M., Garcia, J.G., Watkins, T., He, D., Saatian, B. & Natarajan, V. Protein kinase Cdelta mediates lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* **279**, 41085-94 (2004).
- Daaka, Y. Mitogenic action of LPA in prostate. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 265-9 (2002).
- David, D.C., Hoerndli, F. & Gotz, J. Functional Genomics meets neurodegenerative disorders Part I: transcriptomic and proteomic technology. *Prog Neurobiol* **76**, 153-68 (2005).
- Domon, B. & Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312**, 212-7 (2006).
- Edgell, C.J., McDonald, C.C. & Graham, J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3734-7 (1983).
- Essler, M., Retzer, M., Bauer, M., Heemskerk, J.W., Aepfelbacher, M. & 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**, 30361-4 (1999).
- Gagliardi, A.D., Kuo, E.Y., Raulic, S., Wagner, G.F. & DiMattia, G.E. Human stanniocalcin-2 exhibits potent growth-suppressive properties in transgenic mice independently of growth hormone and IGFs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E92-105 (2005).
- Gardell, S.E., Dubin, A.E. & Chun, J. Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling. *Trends Mol Med* **12**, 65-75 (2006).

- Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A. & Mantovani, A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* **23**, 337-66 (2005).
- Goetzl, E.J., Kong, Y. & Voice, J.K. Cutting edge: differential constitutive expression of functional receptors for lysophosphatidic acid by human blood lymphocytes. *J Immunol* **164**, 4996-9 (2000).
- Goetzl, E.J., Lee, H., Azuma, T., Stossel, T.P., Turck, C.W. & Karliner, J.S. Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **275**, 14573-8 (2000).
- Goodman, A.R., Cardozo, T., Abagyan, R., Altmeyer, A., Wisniewski, H.G. & Vilcek, J. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**, 191-202 (1996).
- Gorg, A., Weiss, W. & Dunn, M.J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4**, 3665-85 (2004).
- Hama, K., Aoki, J., Fukaya, M., Kishi, Y., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Yamori, T., Watanabe, M., Chun, J. & Arai, H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* **279**, 17634-9 (2004).
- Hama, K., Bando, K., Kakehi, Y., Aoki, J. & Arai, H. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. *FEBS Lett* **523**, 187-92 (2002).
- Haseruck, N., Erl, W., Pandey, D., Tigyi, G., Ohlmann, P., Ravanat, C., Gachet, C. & Siess, W. The plaque lipid lysophosphatidic acid stimulates platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation in whole blood: involvement of P2Y1 and P2Y12 receptors. *Blood* **103**, 2585-92 (2004).
- Hayashi, K., Takahashi, M., Nishida, W., Yoshida, K., Ohkawa, Y., Kitabatake, A., Aoki, J., Arai, H. & Sobue, K. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells induced by unsaturated lysophosphatidic acids. *Circ Res* **89**, 251-8 (2001).
- Huber, L.A., Pfaller, K. & Vietor, I. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res* **92**, 962-8 (2003).
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X. & Chun, J. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* **73**, 321-54 (2004).
- Ito, D., Walker, J.R., Thompson, C.S., Moroz, I., Lin, W., Veselits, M.L., Hakim, A.M., Fienberg, A.A. & Thinakaran, G. Characterization of stanniocalcin 2, a novel target of the mammalian unfolded protein response with cytoprotective properties. *Mol Cell Biol* **24**, 9456-69 (2004).
- Jessup, W., Kritharides, L. & Stocker, R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochem Soc Trans* **32**, 134-8 (2004).
- Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-6 (1997).
- Klouche, M., Peri, G., Knabbe, C., Eckstein, H.H., Schmid, F.X., Schmitz, G. & Mantovani, A. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **175**, 221-8 (2004).

- Kolker, E., Higdon, R. & Hogan, J.M. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trends Microbiol* **14**, 229-35 (2006).
- Kullo, I.J., Edwards, W.D. & Schwartz, R.S. Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications. *Ann Intern Med* **129**, 1050-60 (1998).
- Latini, R., Maggioni, A.P., Peri, G., Gonzini, L., Lucci, D., Mocarelli, P., Vago, L., Pasqualini, F., Signorini, S., Soldateschi, D., Tarli, L., Schweiger, C., Fresco, C., Cecere, R., Tognoni, G. & Mantovani, A. Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation* **110**, 2349-54 (2004).
- Lee, C.W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A.E. & Chun, J. GPR92 as a New G12/13- and Gq-coupled Lysophosphatidic Acid Receptor That Increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem* **281**, 23589-97 (2006).
- Lee, H., Goetzl, E.J. & An, S. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C612-8 (2000).
- Libby, P. Les maladies cardio-vasculaires. *pour la science* **296**, 60-67 (2002).
- Luo, C.W., Pisarska, M.D. & Hsueh, A.J. Identification of a stanniocalcin paralog, stanniocalcin-2, in fish and the paracrine actions of stanniocalcin-2 in the mammalian ovary. *Endocrinology* **146**, 469-76 (2005).
- Luquain, C., Sciorra, V.A. & Morris, A.J. Lysophosphatidic acid signaling: how a small lipid does big things. *Trends Biochem Sci* **28**, 377-83 (2003).
- Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-41 (2000).
- Majello, B., De Luca, P., Hagen, G., Suske, G. & Lania, L. Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res* **22**, 4914-21 (1994).
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T. & Akira, S. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10193-7 (1993).
- McCudden, C.R., James, K.A., Hasilo, C. & Wagner, G.F. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. *J Biol Chem* **277**, 45249-58 (2002).
- 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. & Prestwich, G.D. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 131-6 (2003).
- Molkentin, J.D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* **275**, 38949-52 (2000).
- Morris, C.M. & Wilson, K.E. High throughput approaches in neuroscience. *Int J Dev Neurosci* **22**, 515-22 (2004).

- Napoleone, E., Di Santo, A., Bastone, A., Peri, G., Mantovani, A., de Gaetano, G., Donati, M.B. & Lorenzet, R. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 782-7 (2002).
- Nauta, A.J., Bottazzi, B., Mantovani, A., Salvatori, G., Kishore, U., Schwaeble, W.J., Gingras, A.R., Tzima, S., Vivanco, F., Egido, J., Tijssma, O., Hack, E.C., Daha, M.R. & Roos, A. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. *Eur J Immunol* **33**, 465-73 (2003).
- Nguyen, A.D., Itoh, S., Jeney, V., Yanagisawa, H., Fujimoto, M., Ushio-Fukai, M. & Fukui, T. Fibulin-5 is a novel binding protein for extracellular superoxide dismutase. *Circ Res* **95**, 1067-74 (2004).
- Noguchi, K., Ishii, S. & 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**, 25600-6 (2003).
- Panetti, T.S. Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 190-6 (2002).
- Panetti, T.S. & Mosher, D.F. Lysophospholipid-induced cell migration. *Ann N Y Acad Sci* **905**, 326-9 (2000).
- Panetti, T.S., Nowlen, J. & Mosher, D.F. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1013-9 (2000).
- Patient, R.K. & McGhee, J.D. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* **12**, 416-22 (2002).
- Pepys, M.B. & Hirschfield, G.M. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest* **111**, 1805-12 (2003).
- Peri, G., Introna, M., Corradi, D., Iacuitti, G., Signorini, S., Avanzini, F., Pizzetti, F., Maggioni, A.P., Moccetti, T., Metra, M., Cas, L.D., Ghezzi, P., Sipe, J.D., Re, G., Olivetti, G., Mantovani, A. & Latini, R. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation* **102**, 636-41 (2000).
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C. & Ullrich, A. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* **402**, 884-8 (1999).
- Ramji, D.P. & Foka, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* **365**, 561-75 (2002).
- Rolph, M.S., Zimmer, S., Bottazzi, B., Garlanda, C., Mantovani, A. & Hansson, G.K. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, e10-4 (2002).
- Rovere, P., Peri, G., Fazzini, F., Bottazzi, B., Doni, A., Bondanza, A., Zimmermann, V.S., Garlanda, C., Fascio, U., Sabbadini, M.G., Rugarli, C., Mantovani, A. & Manfredi, A.A. The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells. *Blood* **96**, 4300-6 (2000).
- Rusnati, M., Camozzi, M., Moroni, E., Bottazzi, B., Peri, G., Indraccolo, S., Amadori, A.,

- Mantovani, A. & Presta, M. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood* **104**, 92-9 (2004).
- Saatian, B., Zhao, Y., He, D., Georas, S.N., Watkins, T., Spannake, E.W. & Natarajan, V. Transcriptional regulation of lysophosphatidic acid-induced interleukin-8 expression and secretion by p38 MAPK and JNK in human bronchial epithelial cells. *Biochem J* **393**, 657-68 (2006).
- Sato, N., Kokame, K., Shimokado, K., Kato, H. & Miyata, T. Changes of gene expression by lysophosphatidylcholine in vascular endothelial cells: 12 up-regulated distinct genes including 5 cell growth-related, 3 thrombosis-related, and 4 others. *J Biochem (Tokyo)* **123**, 1119-26 (1998).
- Saulnier-Blache, J.S. [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Med Sci (Paris)* **20**, 799-803 (2004).
- Schaeffer, H.J. & Weber, M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**, 2435-44 (1999).
- Seasholtz, T.M. & Brown, J.H. RHO SIGNALING in Vascular Diseases. *Mol Interv* **4**, 348-57 (2004).
- Shahrestanifar, M., Fan, X. & Manning, D.R. Lysophosphatidic acid activates NF-kappaB in fibroblasts. A requirement for multiple inputs. *J Biol Chem* **274**, 3828-33 (1999).
- Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-6 (2002).
- Shida, D., Kitayama, J., Yamaguchi, H., Hama, K., Aoki, J., Arai, H., Yamashita, H., Mori, K., Sako, A., Konishi, T., Watanabe, T., Sakai, T., Suzuki, R., Ohta, H., Takuwa, Y. & Nagawa, H. Dual mode regulation of migration by lysophosphatidic acid in human gastric cancer cells. *Exp Cell Res* **301**, 168-78 (2004).
- Siess, W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 204-15 (2002).
- Siess, W., Zangl, K.J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G. & 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**, 6931-6 (1999).
- Sigal, Y.J., McDermott, M.I. & Morris, A.J. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *Biochem J* **387**, 281-93 (2005).
- Sonoda, H., Aoki, J., Hiramatsu, T., Ishida, M., Bandoh, K., Nagai, Y., Taguchi, R., Inoue, K. & Arai, H. A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **277**, 34254-63 (2002).
- Stasyk, T. & Huber, L.A. Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* **4**, 3704-16 (2004).
- Steven, L. *Anatomie pathologique, générale et spéciale*, (De Boeck université, 1997).
- Sugimoto, N., Takuwa, N., Yoshioka, K. & Takuwa, Y. Rho-dependent, Rho kinase-independent inhibitory regulation of Rac and cell migration by LPA1 receptor in Gi-inactivated CHO cells. *Exp Cell Res* **312**, 1899-908 (2006).

- Suske, G. The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**, 291-300 (1999).
- Tabas, I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2255-64 (2005).
- Tedgui A., M.Z. Athérosclérose et inflammation. *Medecine/science* **17**, 162-9 (2001).
- Tigyi, G. & Parrill, A.L. Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog Lipid Res* **42**, 498-526 (2003).
- Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G. & Chu, M.L. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 479-89 (2003).
- 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 den Bergh, G. & Arckens, L. Fluorescent two-dimensional difference gel electrophoresis unveils the potential of gel-based proteomics. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 38-43 (2004).
- van Leeuwen, F.N., Giepmans, B.N., van Meeteren, L.A. & Moolenaar, W.H. Lysophosphatidic acid: mitogen and motility factor. *Biochem Soc Trans* **31**, 1209-12 (2003).
- van Rossum, A.P., Fazzini, F., Limburg, P.C., Manfredi, A.A., Rovere-Querini, P., Mantovani, A. & Kallenberg, C.G. The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages. *Arthritis Rheum* **50**, 2667-74 (2004).
- Wasserman, E.J. & Shipley, N.M. Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *Mt Sinai J Med* **73**, 431-9 (2006).
- Wu, J. & Cunnick, J.M. Trans-regulation of epidermal growth factor receptor by lysophosphatidic acid and G protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 100-6 (2002).
- Xie, Y., Gibbs, T.C. & Meier, K.E. Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 270-81 (2002).
- Xu, Y.J., Aziz, O.A., Bhugra, P., Arneja, A.S., Mendis, M.R. & Dhalla, N.S. Potential role of lysophosphatidic acid in hypertension and atherosclerosis. *Can J Cardiol* **19**, 1525-36 (2003).
- Yart, A., Chap, H. & Raynal, P. Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 107-11 (2002).
- Ye, X., Ishii, I., Kingsbury, M.A. & Chun, J. Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 108-13 (2002).
- Zhou, D., Luini, W., Bernasconi, S., Diomede, L., Salmona, M., Mantovani, A. & Sozzani, S. Phosphatidic acid and lysophosphatidic acid induce haptotactic migration of human monocytes. *J Biol Chem* **270**, 25549-56 (1995).